

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Analyse des Repressors IolR im *myo*-Inositol-Stoffwechsel von

Salmonella enterica serovar Typhimurium

JESSICA ATHINA HELLINCKX

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. T. M. Fuchs
2. Prof. Dr. W. Liebl

Die Dissertation wurde am 17.08.2017 der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.11.2017 angenommen.

Falle siebenmal und stehe achtmal wieder auf.
(japanisches Sprichwort)

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1. DIE GATTUNG SALMONELLA	1
1.1.1. <i>Salmonella Typhimurium</i>	2
1.1.2. <i>Lebensmittelinfektion "Salmonellose"</i>	2
1.1.3. <i>Infektionszyklus von Salmonellen</i>	3
1.1.4. <i>Relevanz des Metabolismus als Virulenzfaktor für Salmonella</i>	5
1.2. DER ABBAU VON MYO-INOSITOL DURCH S. TYPHIMURIUM	7
1.2.1. <i>Die genomische Insel GEI4417/4436</i>	9
1.2.2. <i>Die Regulation des Abbaus von myo-Inositol</i>	12
1.2.3. <i>Der Abbau von myo-Inositol als Virulenzfaktor</i>	15
1.2.4. <i>Besonderheiten während des Wachstums von Salmonellen mit myo-Inositol</i>	16
1.3. PHÄNOTYPISCHE HETEROGENITÄT	18
1.3.1. <i>Ursprung und Charakteristika von heterogenen Populationen</i>	19
1.3.2. <i>Die Fähigkeit Laktose abzubauen ist von Bistabilität geprägt und in Abwesenheit des abzubauenden Substrates tritt ein Hysterese-Effekt auf</i>	20
1.3.3. <i>Der Diauxie-Effekt beruht auf einer bet-hedging Strategie koexistierender metabolischer Zustände</i>	22
1.3.4. <i>Bistabilität trägt zur Erhöhung des pathogenen Potentials eines Bakteriums bei</i>	23
1.4. ZIELSETZUNG.....	25
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	27
2.1.1. <i>Bakterienstämme</i>	27
2.1.2. <i>Nährmedien und -zusätze</i>	28
2.1.3. <i>Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien</i>	29
2.2. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	29
2.2.1. <i>Plasmide und Vektoren</i>	29
2.2.2. <i>Verwendung von Nukleinsäuren und deren Anwendung</i>	31
2.2.2.1. <i>Präparation der chromosomalen DNS aus Salmonella</i>	31
2.2.2.2. <i>Isolation und Aufreinigung von Plasmiden</i>	31
2.2.2.3. <i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	32
2.2.2.4. <i>Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen</i>	32
2.2.2.5. <i>Dephosphorylierung von Nukleinsäuren</i>	33

2.2.2.6.	Verknüpfung von Nukleinsäuren durch Ligation	33
2.2.3.	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	33
2.2.3.1.	Durchführung einer Standard-PCR.....	33
2.2.3.2.	Aufreinigung von PCR-Produkten	34
2.2.4.	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	35
2.2.5.	<i>Konstruktion von Salmonella Stämmen</i>	35
2.2.5.1.	Herstellung elektrokompenter Zellen	35
2.2.5.2.	Einschleusen von Nukleinsäuren durch Elektroporation	36
2.2.5.3.	Anfertigung der Salmonella Reporterstämmen mittels Konjugation	37
2.2.5.4.	Durchführung einer Deletionsmutagenese.....	38
2.2.6.	<i>Sequenzierung</i>	40
2.2.7.	<i>Kompetitiver Wachstumsindex</i>	40
2.2.8.	<i>Durchflusszytometrie</i>	42
2.3.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	43
2.3.1.	<i>Genüberexpression zur verstärkten Synthese von Proteinen</i>	43
2.3.1.1.	Überexpressionskinetik zur Überprüfung der Funktionalität der Vektorsysteme	44
2.3.1.2.	Proteinaufreinigung und – rückfaltung	44
2.3.1.3.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung nach Bradford	46
2.3.1.4.	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	47
2.3.2.	<i>Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen</i>	48
2.3.2.1.	Qualitative Messung der Protein-DNS-Interaktion mittels Gelmobilitätsstudien	48
2.3.2.2.	Quantitative Messung der Protein-DNS-Interaktion mittels SPR.....	49
3.	ERGEBNISSE	52
3.1.	ZEITLICHE ANALYSE DER IOL-GENEXPRESSION WÄHREND DES ABBAUS VON MYO-INOSITOL	52
3.1.1.	<i>Induktion und Verlauf der iolR-Genexpression in Anwesenheit von myo-Inositol</i>	52
3.1.2.	<i>Expressionsverhalten der von IolR kontrollierten iol-Gene in Anwesenheit von myo-Inositol</i>	57
3.2.	EINFLUSS EINER KONSTITUTIVEN IOL-GENEXPRESSION AUF DIE FITNESS VON SALMONELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DER UMGEBUNGSBEDINGUNGEN	63
3.3.	SALMONELLEN, DEREN STOFFWECHSEL AN DEN ABBAU VON MYO-INOSITOL ADAPTIERT SIND, ZEIGEN EINEN GRADUELLEN GEDÄCHTNISVERLUST BEI ABWESENHEIT DES ABZUBAUENDEN SUBSTRATES.....	69
3.4.	IOLR BINDET SEINE ZIELSTRUKTUR, INDEM ES MIT ZWEI BINDESTELLEN INTERAGIERT, DEREN BINDUNG VON UNTERSCHIEDLICHEN AFFINITÄTEN GEPRÄGT IST	73
3.4.1.	<i>Proteinaufreinigung und Konzentrationsbestimmung des Repressors IolR für nachgeordnete Anwendungen</i>	74
3.4.2.	<i>Qualitative Analyse der Interaktion des Repressors mit seiner Zielstruktur mittels Gelmobilitätsstudien</i>	75
3.4.3.	<i>Quantitative Analyse der Interaktion des Repressors mit seiner Zielstruktur auf der DNS mittels Oberflächen-Resonanz-Spektroskopie</i>	78

3.4.4.	<i>Methodenetablierung zur Identifizierung der IolR-Bindestelle mittels DNA-Protektionsexperiment und anschließender Subklonierung</i>	83
3.5.	AUFREINIGUNG UND UNTERSUCHUNG VON REID	87
3.5.1.	<i>Effiziente Überexpression des Aktivators mittels pBAD-Vektorsystem im Arabinose-defizienten Hintergrund von Salmonella</i>	87
3.5.2.	<i>Aufreinigung und Rückfaltung des Aktivators unter denaturierenden Bedingungen</i>	91
3.5.3.	<i>Überprüfung der Funktionalität des Aktivators mittels Gelmobilitätsstudien</i>	92
3.6.	SCHLUSSFOLGERUNG: CHARAKTERISIERUNG DER PHÄNOTYPISCHEN HETEROGENITÄT WÄHREND DER IOL-GENEXPRESSION UND DER EINFLUSS DES REGULATORS IOLR.....	93
4.	DISKUSSION	96
4.1.	DIE BISTABILE IOL-GENEXPRESSION KANN DURCH DEN REGULATIONSMECHANISMUS VON IOLR ERKLÄRT WERDEN.....	96
4.1.1.	<i>Die Regulatoren der GEI4417/4436 übertragen das Rauschen in ihrer Genexpression auf die ihnen nachgeschalteten iol-Gene</i>	96
4.1.2.	<i>Ein mehrstufiger Regulationsmechanismus des Repressors führt bei fluktuierender Proteinmenge zu einem bistabilen Verhalten innerhalb einer isogenen Population</i>	102
4.2.	DER HYSTERESE-EFFEKT UNTERLIEGT EINEM PASSIVEN MECHANISMUS, DA EINE ANHALTENDE IOL-GENEXPRESSION IN ABWESENHEIT VON MI MIT EINEM FITNESSNACHTEIL VERBUNDEN IST.....	109
4.2.1.	<i>Der Gedächtnisverlust kann durch zelluläre Entscheidungen sowie epigenetische Einflüsse erklärt werden und ist als passiver Mechanismus anzusehen</i>	109
4.2.2.	<i>Eine unpassende iol-Genexpression geht auf Kosten der bakteriellen Fitness unter nährstoffreichen Bedingungen</i>	113
4.2.3.	<i>Eine bet-hedging Strategie konnte für die Verstoffwechslung von myo-Inositol in Salmonella ausgeschlossen werden</i>	116
4.3.	SCHLUSSFOLGERUNG	118
5.	AUSBLICK	121
6.	LITERATURVERZEICHNIS	125
7.	ANHANG	141
7.1.	DANKSAGUNG.....	153
7.2.	VERÖFFENTLICHUNGEN	155
7.3.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	156

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SALMONELLA-KLASSIFIZIERUNG MIT UNTERARTEN UND DER ANZAHL AN ZUGEHÖRIGEN SEROTYPEN (MODIFIZIERT NACH GUIBOURDENCHE ET AL., 2010; HURLEY ET AL., 2014).....	1
ABB. 2:	DER SCHEMATISCHE ABLAUF DES MYO-INOSITOL KATABOLISMUS.....	8
ABB. 3:	DARSTELLUNG DER GENOMISCHEN INSEL GEI4417/4436 IN S. TYPHIMURIUM.....	9
ABB. 4:	ANALYSE DER TRANSKRIPTIONELLEN AKTIVITÄT DES IOL ^E -PROMOTORS MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	17
ABB. 5:	URSPRUNG UND CHARAKTERISTIKA EINES BISTABILEN SYSTEMS.....	19
ABB. 6:	TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT DES REPRESSORS DES MYO-INOSITOL-STOFFWECHSLES WÄHREND DES ABBAUS DES POLYOLS.....	53
ABB. 7:	TRANSLATIONALE AKTIVITÄT DES REPRESSORS DES MYO-INOSITOL-STOFFWECHSLES WÄHREND DES ABBAUS DES POLYOLS.....	54
ABB. 8:	DER PROZENTUALE ANTEIL AN GFP-EXPRIMIERENDEN UND NICHT-FLUORESZIERENDEN BAKTERIEN FÜR DIE EXPRESSION DES HAUSHALTSGEN RPSM WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	56
ABB. 9:	DIE TRANSKRIPTIONELLE AKTIVITÄT DES AKTIVATORS REI ^D UND DAS VON IHM KONTROLLIERTE IOL ^E -IOLG ¹ OPERON WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	57
ABB. 10:	BISTABILITÄT DER IOL ^E -IOLG ¹ -GENEXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE VON S. TYPHIMURIUM WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	58
ABB. 11:	DIE GENAKTIVITÄT DES AKTIVATORS AUF BEIDEN EBENEN DER PROTEINBIOSYNTHESE WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	59
ABB. 12:	BISTABILITÄT DER IOL ^C -GENEXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE VON S. TYPHIMURIUM WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	61
ABB. 13:	GENAKTIVITÄT DER IOLT ¹ -EXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE VON S. TYPHIMURIUM WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	62
ABB. 14:	KOMPETITIVER INDEX VON S. TYPHIMURIUM GEGEN MUTANTEN MIT KONSTITUTIVER IOL-GENEXPRESSION UNTER OPTIMALEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN.....	64
ABB. 15:	WACHSTUMSVERHALTEN VON 14028, 14028 Δ IOL ^R , 14028 DACB::KAN ^R UND 14028 IOL ^R ::KAN ^R IN LB-MEDIUM.....	67
ABB. 16:	KOMPETITIVER INDEX VON S. TYPHIMURIUM GEGEN MUTANTEN MIT KONSTITUTIVER IOL-GENEXPRESSION IN ANWESENHEIT VON MYO-INOSITOL.....	68
ABB. 17:	DAS GEDÄCHTNIS VON SALMONELLEN MYO-INOSITOL UNTER NÄHRSTOFFREICHEN BEDINGUNGEN WEITERHIN ABZUBAUEN.....	70
ABB. 18:	ISOLATION DES REPRESSOR IOL ^R MITTELS NI-NTA SÄULE VON QUIAGEN.....	74
ABB. 19:	BINDUNG VON IOL ^R AN VERSCHIEDENE PROMOTORBEREICHE INNERHALB DER GENOMISCHEN INSEL GEI4417/4436.....	76
ABB. 20:	VERLAUF DER BINDUNG UND DISSOZIATION DES REPRESSORS AN DIE IOLT ¹ -, IOL ^R -, REI ^D - UND PCFA-PROMOTORFRAGMENTE.....	78
ABB. 21:	INTERACTIONMAP ANALYSE DER IOL ^R -BINDUNG AN DEN IOLT ¹ -PROMOTOR.....	81

ABB. 22: ERMITTLUNG DER MENGE AN DNASE I ZUR GEWÄHRLEISTUNG DES VOLLSTÄNDIGEN VERDAUS DER UNGEBUNDEN DNS-FRAGMENT	84
ABB. 23: BEDINGUNGEN DER HITZEINAKTIVIERUNG DER DNASE I ERZIELT EIN GLEICHZEITIGES ABLÖSEN DES IOLR-REPRESSORS VON SEINER DNS-ZIELSTRUKTUR INNERHALB DES IOLR-PROMOTORFRAGMENTES	84
ABB. 24: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ABGEWANDELTEN DNA-PROTEKTIONSEXPERIMENTES MIT DEN ETABLIERTEN BEDINGUNGEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DER IOLR-BINDESTELLE INNERHALB DER IOL-PROMOTOREN	85
ABB. 25: KAPILLARELEKTROPHORESE DER VERDAUTEN IOLR-PROMOTORREGION NACH HITZEINAKTIVIERUNG	86
ABB. 26: KONTROLLE AUF PHAGENFREIE ARABINOSE-DEFIZIENTE SALMONELLEN NACH DER PHAGENTRANSDUKTION MITTELS ÜBERKREUZAUSTRICH.....	88
ABB. 27: NACHWEIS DER DELETION DER GENE ARAA UND ARAC MITTELS PCR.....	89
ABB. 28: ÜBEREXPRESSION VON REID-HIS ₆ MITTELS PET28B-REID UND PTARA.....	90
ABB. 29: ÜBEREXPRESSION VON REID-HIS ₆ MITTELS PBAD-MYC/HISC-REID.....	90
ABB. 30: SDS-PAGE DER AUFREINIGUNG VON REID UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN MIT 6 M GUANIDIN-HYDROCHLORID NACH COOMASSIE-FÄRBUNG	91
ABB. 31: PROMOTORBINDEAKTIVITÄT VON REID NACH AUFREINIGUNG UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN UND ANSCHLIEßENDER RÜCKFALTUNG	93
ABB. 32: VORLÄUFIGES MODELL DES MOLEKULAREN BINDEMECHANISMUS DES REPRESSORS IOLR AN DIE IOL-PROMOTORREGION.....	104
ABB. 33: PLASMIDKARTE UND EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS pET28B(+) (KAN ^R).....	141
ABB. 34: PLASMIDKARTE UND EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS pBR322 (AMP ^R / TET ^R)	142
ABB. 35: PLASMIDKARTE UND EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS pTARA (CM ^R).....	143
ABB. 36: PLASMIDKARTE UND EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS PBAD/MYC-HISC (AMP ^R)	144
ABB. 37: PLASMIDKARTE UND EIGENSCHAFTEN DES VEKTORS pUTs-GFP (CM ^R)	145
ABB. 38: GEMITTELTE AUTOFLUORESCENZ DES PARENTERAL STAMMES MVP101 WÄHREND DES WACHSTUMS IN LB-MEDIUM UND MM MIT MI	150
ABB. 39: STREUUNG INNERHALB DER IOL-GENEXPRESSION WÄHREND DES WACHSTUMS VON S. TYPHIMURIUM MIT MYO-INOSITOL.....	151
ABB. 40: ISOLATION DES REPRESSOR IOLR AUS HETEROLOGEN UND NATIVEN WIRT KULTIVIERT IN LB-MEDIUM MITTELS HISTRAP-SÄULE VON GE HEALTHCARE UND DEM ÄKTA-SYSTEM	151
ABB. 41: DURCH DIE BINDUNG VON IOLR AN UNTERSCHIEDLICHE BEREICHE INNERHALB DER REID-PROMOTORREGION KONNTEN ZWEI UNABHÄNGIGE BINDESTELLEN IDENTIFIZIERT WERDEN...	152
ABB. 42: ISOLATION DES AKTIVATORS REID UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN MITTELS HISTRAP-SÄULE VON GE HEALTHCARE UND ÄKTA-SYSTEM	152
ABB. 43: ISOLATION DES AKTIVATORS REID UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN MIT 6 M GUANIDIN-HYDROCHLORID MITTELS HISTRAP-SÄULE VON GE HEALTHCARE UND ÄKTA-SYSTEM	152

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1:	ÜBERSICHT DER GENE DER GEI4417/4436 UND IHRE FUNKTION IN <i>S. TYPHIMURIUM</i> (MODIFIZIERT NACH KRÖGER & FUCHS, 2009; KRÖGER ET AL., 2010; CORDERO-ALBA ET AL., 2012; ROTHHARDT ET AL., 2014)	10
TAB. 2:	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN UND HERGESTELLTEN BAKTERIENSTÄMME.....	27
TAB. 3:	VERWENDETE NÄHRMEDIENZUSÄTZE UND IHRE EINGESETZTE KONZENTRATION	29
TAB. 4:	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PLASMIDE UND ERZEUGTEN VEKTOREN.....	30
TAB. 5:	ALLGEMEINES PROGRAMM FÜR DIE DURCHFÜHRUNG EINER STANDARD-PCR.....	34
TAB. 6:	ZUSAMMENSETZUNG DER PUFFER FÜR DIE PROTEINAUFREINIGUNG UND -RÜCKFALTUNG	45
TAB. 7:	ZUSAMMENSETZUNG DER GELE FÜR DIE SDS-PAGE (FÜR ZWEI GELE)	48
TAB. 8:	ZUSAMMENSETZUNG EINES NATIVEN POLYACRYLAMIDGELS FÜR ZWEI GELE	49
TAB. 9:	DIE VARIANZ DER IOLR-EXPRESSION IN <i>SALMONELLA</i> WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	55
TAB. 10:	VARIANZ DER reiD- UND iolE-iolG1-EXPRESSION WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL.....	60
TAB. 11:	VARIANZ DER iolT1-EXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE WÄHREND DES WACHSTUMS MIT MYO-INOSITOL	62
TAB. 12:	ÜBERSICHT DER ZELLENZAHLEN DER KOMPETITIVEN INDICES VON <i>S. TYPHIMURIUM</i> GEGEN DIE MUTANTE MIT KONSTITUTIVER IOL-GENEXPRESSION AUS ABB. 14	66
TAB. 13:	DIE TEILUNGSRATEN DER BAKTERIENSTÄMME INNERHALB DES KOMPETITIVEN INDEX.....	67
TAB. 14:	ÜBERSICHT DER ZELLENZAHLEN DER KOMPETITIVEN INDICES VON <i>S. TYPHIMURIUM</i> GEGEN DIE MUTANTE MIT KONSTITUTIVER IOL-GENEXPRESSION AUS ABB. 16	69
TAB. 15:	DER GEDÄCHTNISVERLUST MANIFESTIERT SICH IN EINER ABNAHME DER TRANSKRIPTIONELLEN AKTIVITÄT DER MYO-INOSITOL ABBAUENDEN GENE IN ABWESENHEIT DES POLYOLS	72
TAB. 16:	DER PROZENTUALE ANTEIL AN FLUORESZIERENDEN BAKTERIEN INNERHALB DER POPULATION WÄHREND DER HYSTERESE.....	73
TAB. 17:	DIE BESTIMMUNG DER GEMITTELTE „AKTIVE“ IOLR-PROTEINKONZENTRATION DURCH EINE KALIBRIERUNGSUNABHÄNGIGE KONZENTRATIONSANALYSE.....	80
TAB. 18:	WERTE FÜR DIE GLEICHGEWICHTSKONSTANTEN (K_A/K_B) UND DER AFFINITÄT (K_D) WÄHREND DER INTERAKTION VON IOLR MIT DEM iolT1-, iolR- UND reiD-PROMOTORFRAGMENTEN	82
TAB. 19:	DIE ZELLENZAHL PRO ML VON MI-ADAPTIERTEN <i>SALMONELLEN</i> WÄHREND DES WACHSTUMS UNTER NÄHRSTOFFREICHEN BEDINGUNGEN	110
TAB. 20:	WACHSTUMSNACHTEIL DER KANAMYCIN-RESISTENTEN BAKTERIENSTÄMME DES KOMPETITIVEN INDEX DURCH PARALLELES AUSPLATTIERUNG AUF LB-AGARPLATTEN MIT UND OHNE KANAMYCINZUSATZ	115
TAB. 21:	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN ANWENDUNGSGBIET.....	146
TAB. 22:	VARIANZ DER rpsM-EXPRESSION AUF TRANSKRIPTIONELLER EBENE WÄHREND DES WACHSTUMS IN MM MIT MI ODER LB-MEDIUM.....	150

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFCA	<i>calibration free concentration analysis</i>
Cm	Chlormaphenicol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	cAMP-Rezeptorprotein
Da	Dalton
DC	Durchflusszytoemtrie
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
5-DG	5-Deoxyglucuronsäure
DKG	2-Deoxy-5-Keto-D-Glucuronsäure
DKGP	2-Deoxy-5-Keto-D-Glucuronsäure-6-phosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-triphosphate (dATP,dCTP,dGTP,dTTP,dUTP)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Gelmobilitätsstudie (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>)
FastAP	thermosensitive Alkaline Phosphatase
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FI	Fluoreszenzintensität
FLU	Fluoreszenzwert (<i>fluorescence light unit</i>)
FLP	Flippase Rekombinase
FRT	FLP Bindestelle

g	Generationszeit
g	Gramm
G/C-Gehalt	DNS-Anteil an Guanin und Cytosin
GEI	genomische Insel
Gfp	grünfluoreszierendes Protein
°C	Grad Celsius
h	Stunden (<i>hours</i>)
H-NS	Nucleoid-assoziiertes Protein (<i>histone-like nucleoid structuring protein</i>)
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k_a	Assoziationskonstante
kb	Kilobasenpaar
KBE	Koloniebildende Einheit
KCl	Kaliumchlorid
k_d	Dissoziationskonstante [mol/l]
K_D	Affinitätskonstante
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Km	Kanamycin
2-KMI	2-Keto- <i>myo</i> -Inositol
kV	Kilovolt
2-KS	Zweikomponentensystem
l	Liter
LB	Luria-Bertani broth
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MI	<i>myo</i> -Inositol
MilliQ	deionisiertes Wasser
min	Minute(n)
MM	Minimalmedium
mol	Mol
MSA	Malonat-Semialdehyd
MW	Mittelwert

μl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronhydroxid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OD _{max}	maximale OD ₆₀₀
p.A.	für die Analyse (<i>pro analysis</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTS	Phosphotransferasesystem
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response unit</i>
RU _{max}	<i>maximal response unit</i>
s	Standardabweichung
s.	siehe
SAP	alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SCV	<i>Salmonella</i> enthaltende Vesikel
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
SPR	Oberflächen-Plasmon-Resonanz (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
Strp	Streptomycin
T3SS	Typ-III Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
T	Temperatur
T _A	Annealingtemperatur (<i>annealing temperature</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Puffer (Tris-buffered saline)
TBS-T	TBS mit 0,1 % Tween20
t _{Elongation}	Elongationszeit

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetrazyklin
THcHDO	3D-(3,5/4)-Trihydroxycyclohexan-1,2-dion
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TMG	Thio-Methylgalaktosid
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units [μ M Substratumsatz/min]
ÜNK	Übernachtskultur
Upm	Umdrehungszahl pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Teilungsrate
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen (<i>volume/volume</i>)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (<i>weight/volume</i>)

ZUSAMMENFASSUNG

Der Abbau von *myo*-Inositol (MI) durch *Salmonella* stellt ein Beispiel für die Verknüpfung des Metabolismus mit dem pathogenen Potential eines Bakteriums dar. Mit Hilfe dieser Fähigkeit sind sie in der Lage, während der Infektion metabolische Nischen zu erschließen und sich einen Selektionsvorteil gegenüber der ansässigen Mikrobiota zu verschaffen. Das Wachstum von *S. Typhimurium* mit dem Polyol MI ist von einer auffällig langen und variablen Anlaufphase sowie der Ausbildung eines heterogenen Phänotyps geprägt. Auf Einzelzellebene konnte die phänotypische Heterogenität auf die bistabile Genaktivität des *iolE-iolGI*-Operons zurückgeführt werden, dessen Genprodukte die initialen enzymatischen Schritte des MI-Abbaus katalysieren. Die Bistabilität stellt eine Situation dar, in der sich genetisch identische Zellen unter denselben Bedingungen unterschiedlich verhalten, d.h. eine Subpopulation zeigt eine induzierte *iol*-Genexpression, wohingegen der andere Teil in einem uninduzierten Zustand verbleibt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die einflussnehmenden Parameter charakterisiert und der molekulare Ursprung der Bistabilität von *S. Typhimurium* 14028 während der Verstoffwechslung von MI aufgedeckt werden. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Für die zeitliche Analyse der *iol*-Genexpression während des Abbaus von MI wurden chromosomale Reporter-gen-Konstrukte eingesetzt. Mittels Durchflusszytometrie wurde in Anwesenheit von MI eine bistabile Aktivität für die Gene *iolR*, *reiD*, *iolC* und *iolE* festgestellt. Die Expression dieser Gene wurde am Ende der Anlaufphase eingeleitet, wobei der Anteil der Zellen im induzierten Zustand im weiteren Verlauf des Wachstums zunahm. Für das den Haupttransporter *IolT1* kodierende Gen wurde keine Aktivität während des Abbaus von MI detektiert. Die Regulatoren der *iol*-Gene, der Repressor *IolR* und der Aktivator *ReiD*, unterlagen im Vergleich zu dem Haushalts-Gen *rpsM* enormen Fluktuationen in ihrer Expressions- und Syntheserate, die sich außerdem auf die ihnen nachgeschalteten Gene übertrugen.
- (2) In Kooperation mit Ralf Herrmann am Biozentrum der LMU München wurden Experimente mit SPR-Spektroskopie durchgeführt. Diese ermöglicht eine Interaktionsanalyse von Proteinen und anderen Biomolekülen, in der Assoziation, Gleichgewicht und Dissoziation der Verbindung in Echtzeit analysiert werden kann. Es wurde ein mehrstufiger kooperativer Bindemechanismus des Repressors *IolR* gegenüber den Promotoren P_{iolR} , P_{reiD} und P_{iolT1} aufgedeckt, der sich aus der

Identifizierung von zwei getrennten Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität ergab. Durch die hohe Bindungsstärke wurde die bereits beschriebene strikte Kontrolle der *iol*-Gene durch den Repressor genauer bestimmt. In einem Modell zur Transkriptionseinhibition der *iol*-Gene kann es durch Oligomerisierung von IolR-Molekülen zum Einschluss der RNA-Polymerase in der sich bildenden DNS-Schlaufenstruktur kommen.

- (3) Salmonellen, deren Stoffwechselweg an den Abbau von MI adaptiert sind, zeigten einen Hysterese-artigen Phänotyp bei Abwesenheit dieses Substrates. Unter nährstoffreichen Bedingungen kam die *iolE*-Genexpression von MI-adaptierten Salmonellen erst nach 4 Stunden vollständig zum Erliegen. Die Verdünnung der *iol*-Genprodukte, z.B. des Aktivators ReiD und der Transportmoleküle, infolge der Zellteilung, sowie die extra- und intrazelluläre MI-Konzentration können für dieses Phänomen verantwortlich sein. Der Gedächtnisverlust ist unabhängig von IolR, wodurch die Beteiligung anderer globaler Regulatoren wie H-Ns oder CRP in Betracht kommt. Der Verlust des zellulären Gedächtnisses an die Degradation von MI nach ungefähr zwei Zellteilungen deutet darauf hin, dass sich *S. Typhimurium* schnell an eine neue Umgebung anpassen kann.
- (4) In einem kompetitiven Index wurde die Fitness von *S. Typhimurium* mit und ohne konstitutiver *iol*-Genexpression analysiert. Durch eine integrierte Kanamycin-Resistenzkassette erfolgte die selektive Beurteilung des einen Bakterienstammes gegenüber dem anderen. Salmonellen mit einer konstitutiven *iol*-Genexpression zeigten einen Wachstumsnachteil unter nährstoffreichen Bedingungen, unter denen diese Gene normalerweise reprimiert werden. Dieser Nachteil äußerte sich in einer reduzierten Teilungsrate von 15,4 %, der mit der *iol*-Genexpression zusammenhängt. Somit können für *Salmonella* Fitness-Kosten infolge nicht ausreichend reprimierter Stoffwechselwege entstehen. In diesem Zusammenhang wurde das Auftreten von *bet-hedging* vermutet, wobei aus einer Zelle verschiedene phänotypische Varianten hervorgebracht werden, um das Überleben in einer sich verändernden Umwelt sicherzustellen. Für den MI-Metabolismus von *Salmonella* wurde allerdings die Hypothese eines *bet-hedging* widerlegt. Die transkriptionelle Regulation der *iol*-Gene erwies sich damit als das evolutionäre Ergebnis der Balance zwischen der Expression der metabolischen Kapazität, die für die Besetzung der verschiedensten Nischen erforderlich ist, und den durch den Stoffwechselweg verursachten Fitness-Kosten.

SUMMARY

Degradation of *myo*-inositol (MI) by *Salmonella* is an example of link a between metabolism and pathogenic potential of bacteria. This ability enables them to occupy metabolic niche during infection and to gain a selection advantage over the residing microbiota. Growth of *S. Typhimurium* with the polyol MI is characterized by an extended and variable lag phase as well a formation of a heterogeneous phenotype. Phenotypic heterogeneity could be attributed to bistable gene activity of *iolE-iolGI* operon at single-cell level, which gene products catalyze the initial enzymatic steps of MI degradation. Bistability represents a situation in which genetically identical cells behave differently under the same conditions, i.e. a subpopulation shows an induced *iol* gene expression, while the other part remains in an uninduced state. In this work, the influencing parameters should be characterized and the molecular origin of bistability of *S. Typhimurium* 14028 should be revealed during the degradation of MI. The following results were obtained:

- (1) Chromosomal reporter gene constructs were used for temporal analysis of *iol* gene expression during degradation of MI. A bistable activity for the genes *iolR*, *reiD*, *iolC* and *iolE* was determined by flow cytometry in presence of MI. Expression of these genes were initiated at end of lag phase, whereby a part of the cells in induced state increased during further growth. No activity was detected for the gene encoding the major transporter *IolT1* during degradation of MI. Repressor *IolR* and activator *ReiD* were subject to fluctuations in expression and synthesis compared to the housekeeping gene *rpsM*, and fluctuations were further transferred to downstream genes of the regulators.
- (2) SPR spectroscopy was conducted in cooperation with Ralf Herrmann at the LMU Munich. This technique allows an interaction analysis of proteins and other biomolecules, where association, equilibrium and dissociation can be analyzed in real time. A complex, cooperative DNA-binding mechanism for repressor *IolR* was discovered with the promoters P_{iolR} , P_{reiD} and P_{iolT1} . This was achieved by identification of two separated binding sites with different affinity. Due to the high binding affinity, the already described strict control of the *iol* genes by the repressor was specified more precisely. In a model for the transcription inhibition of the *iol* genes, the oligomerization of *IolR* molecules resulted in trapping of RNA polymerase within a DNA loop structure.

- (3) *Salmonellae* which metabolic pathway was adapted to the degradation of MI showed a hysteresis-like phenotype in absence of this substrate. Under nutrient-rich conditions, *iolE* gene expression of MI-adapted cells was completely shut down after 4 hours. Dilution of *iol* gene products, e.g. activator *ReiD* and transport molecules due to cell division, as well as the extra- and intracellular MI-concentration can be responsible for this phenomenon. Loss of memory is independent of *IolR*, whereby influence of other global regulators such as H-NS or CRP should be considered. The loss of cellular memory to degradation of MI after approximately two cell divisions suggests that *S. Typhimurium* can adapt quickly to a new environment.
- (4) Fitness of *S. Typhimurium* with and without constitutive *iol* gene expression was analyzed in a competitive index. Through an integrated kanamycin-resistance cassette, the bacterial strains could be selected and compared to each other. *Salmonella* with a constitutive *iol* gene expression showed a growth disadvantage under nutrient-rich conditions where these genes are usually repressed. The disadvantage results in a reduced rate of 15.4 %, which was related to *iol* gene expression. For *Salmonella*, insufficiently repressed metabolic pathways can result in fitness-costs. In this context, the occurrence of bet-hedging was suspected, whereby different phenotypic variants are produced from one cell to ensure survival in a changing environment. The bet-hedging hypothesis, however, was rejected with respect to MI metabolism of *Salmonella*. The transcriptional regulation of the *iol* genes thus proved to be the evolutionary result of the balance between the expression of the metabolic capacity required for the occupancy of various niches and the fitness costs caused by the metabolic pathway.

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Salmonella*

Salmonellen sind Gram-negative, stäbchenförmige, peritrich begeißelte Bakterien, die innerhalb der Abteilung der γ - Proteobakterien zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Sie weisen eine 71-prozentige DNS-Sequenzhomologie mit *Escherichia coli* (*E. coli*) auf und stammen von einem gemeinsamen Vorfahren ab (McClelland *et al.*, 2001; Jong *et al.*, 2012). Die Namensgebung der Gattung erfolgte nach dem US-amerikanischen Tierarzt Daniel Elmer Salmon, der den Erreger als Verursacher der Schweinepest beschrieb (Salmon, 1884). Die Gattung umfasst die Arten *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* (*S. enterica*), wobei letztere anhand biochemischer Reaktionen, z.B. die Verwertung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen in sechs Unterarten, gegliedert wurde (Farmer *et al.*, 1985). Anhand immunologischer Reaktionen wird die Zusammensetzung der *Salmonella*-Antigene in einer Antigenformel dargestellt und 2.610 Serovare konnten klassifiziert werden (s. Abb. 1). Die Subspezies *S. enterica* subsp. *enterica* umfasst die meisten Serotypen (Brenner *et al.*, 2000; Grimont & Weill, 2007; Guibourdenche *et al.*, 2010). Weiterhin wird diese Unterart in typhoidale Erreger, zu denen die Serovare Typhi und Paratyphi zählen, und nicht-typhoidale Bakterien, wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, eingeteilt. Die Mehrzahl der Infektionserkrankungen kann auf die beiden letztgenannten Serotypen zurückgeführt werden (RKI, 2016).

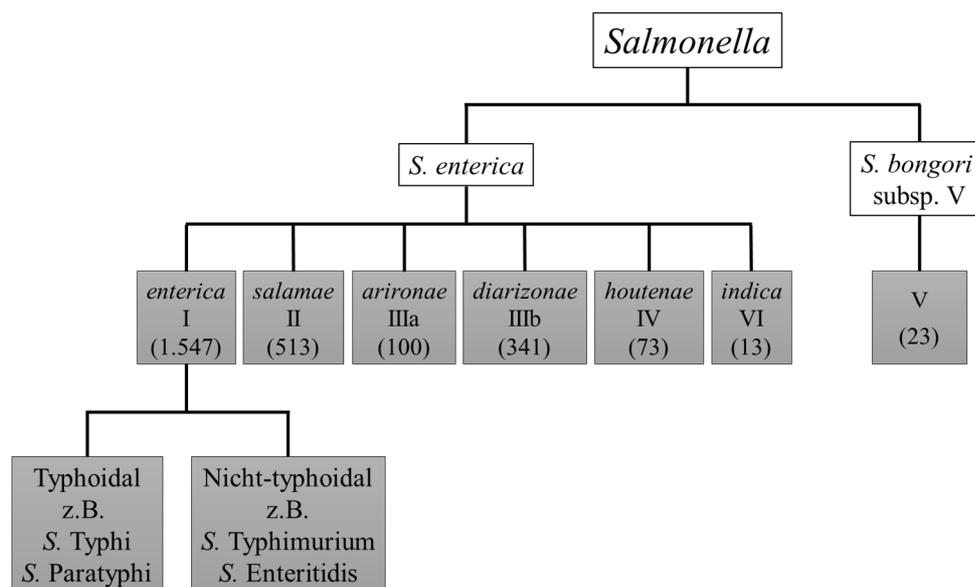


Abb. 1: Schematische Darstellung der *Salmonella*-Klassifizierung mit Unterarten und der Anzahl an zugehörigen Serotypen (modifiziert nach Guibourdenche *et al.*, 2010; Hurley *et al.*, 2014).

1.1.1. *Salmonella* Typhimurium

Das Serovar *S. Typhimurium* gehört zur Unterart *S. enterica* subsp. *enterica* und weist die Antigenformel 1,4,[5],12:i:1,2 auf, die sich aus dem somatischen O-Antigen, einem Bestandteil des Lipopolysaccharids und den beiden alternativ exprimierten flagellaren H-Antigenen ergibt (Grimont & Weill, 2007). Das Genom des attenuierten Bakterienstammes *S. Typhimurium* LT2 besteht aus einem Chromosom mit 4,857 kb und einem Virulenzplasmid (pSLT) mit 94 kb, welche einen durchschnittlichen G/C-Gehalt von 53 % aufweisen. Die Attenuierung ist auf die suboptimale Translation des *rpoS*-Gens zurückzuführen, welches für den Sigmafaktor σ^{38} kodiert (Wilmes-Riesenberg *et al.*, 1997). Das Virulenzplasmid kodiert für 108 Proteine und ist in den typhoidalen Stämmen *S. Typhi* und *S. Paratyphi* nicht vorhanden (McClelland *et al.*, 2001). Der Vergleich der *S. Typhimurium* Stämme 14028s und LT2 zeigte eine 98-prozentige Sequenzhomologie, wobei der größte Unterschied in den inkorporierten Prophagen besteht (Jarvik *et al.*, 2010). Das Chromosom von *S. Typhimurium* 14028s enthält 62 genomischen Inseln, die für insgesamt 4.489 Proteine kodieren (McClelland *et al.*, 2001). Zehn genomische Inseln sind für die Virulenz verantwortlich, von denen hauptsächlich fünf *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI) beteiligt sind (Marcus *et al.*, 2000; Hensel, 2000; Hurley *et al.*, 2014). *S. Typhimurium* zählt zu den nicht typhoidalen Erregern und verursacht eine selbstlimitierende Gastroenteritis im Menschen, als auch eine systemische typhusähnliche Erkrankung in Mäusen, wodurch es als Tiermodell für die Aufklärung einer enterischen Salmonellose herangezogen wurde (Santos *et al.*, 2001; Garai *et al.*, 2012; Jong *et al.*, 2012).

1.1.2. Lebensmittelinfektion “Salmonellose”

Die Salmonellose gehört zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten des Gastrointestinaltraktes und stellt die zweithäufigste an das RKI übermittelte bakterielle Krankheit nach der *Campylobacter*-Enteritis dar (RKI, 2016).

Bei der Erkrankung werden drei klinisch-relevante Syndrome unterschieden: die selbstlimitierende Gastroenteritis, das schwerwiegendere typhoide Fieber und die Bakteriämie (Santos *et al.*, 2001). Das allgemeine Krankheitsbild ist von Symptomen wie Durchfall, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber bis hin zu Bewusstseinsstörungen geprägt. Bei einer Infektion mit nicht-typhoidalen Salmonellen kommt es zur Gastroenteritis, bei der eine symptomatische Behandlung erfolgt und die

Symptome nach nur wenigen Stunden oder Tagen von selbst abklingen. Erfolgt eine Infektion mit typhoidalen Erregern kommt es mit dessen Eintritt in den Blutkreislauf zu einer systemischen und lebensgefährlichen Ausbreitung der Bakterien, die eine Behandlung mit Antibiotika z.B. Erythromycin erfordert. Ungefähr 90 % der über Lebensmittel übertragbaren Erkrankungen sind auf *Salmonella* zurück zu führen, die vorwiegend in Fleisch, Geflügel, sowie in Eiern, Milch und deren Erzeugnisse (RKI, 2006; WHO, 2016), aber auch in Frischware wie Obst und Gemüse vorhanden sind (Hanning *et al.*, 2009; RKI, 2012; BfR, 2013). Zudem stellen viele Nutztiere sowie der Mensch ein natürliches Reservoir für diese Bakterien dar und können in klinisch unauffälligen Dauerausscheidern kontinuierlich freigesetzt werden (Buchwald & Blaser, 1984). In Deutschland wurden im Jahr 2015 insgesamt 13.823 Salmonellosen übermittelt, wobei die Zahlen im Vergleich zu 2014 mit 16.236 Erkrankungsfällen um 15 % zurückgingen. Seit 2001 nahm die Zahl der Infektionen mit Salmonellen in Deutschland, abgesehen von einem leichten Zuwachs in den Jahren 2006 und 2007, kontinuierlich ab. Die bundesweite Inzidenz liegt bei 17 Fällen pro 100.000 Einwohner und ist damit die niedrigste seit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes (RKI, 2016). Bei den dokumentierten Erkrankungen handelt es sich zu 42 % um Infektionen mit *S. Typhimurium* und bei 38 % der Fälle um *S. Enteritidis*. Mit weiterem Abstand folgen die anderen Serovare *S. Infantis* (2,5 %), monophasische *S. Typhimurium* (1,4 %) und *S. Derby* (1,3 %). Eine deutliche Abnahme der Fallzahlen im Vergleich zum Vorjahr 2014 wurde auch in den USA beobachtet (Huang *et al.*, 2016). Dieser Rückgang der Infektionen ist auf die Abnahme der Infektion mit den Haupterregern der Salmonellose zurück zu führen. Eine hohe Dunkelziffer von Fällen, die nicht übermittelt wurden, ist anzunehmen. *Salmonella*-Ausbrüche kommen vermehrt in Gemeinschaftseinrichtungen wie Krankenhäusern und Altersheimen vor, in denen sich disponierte Menschen, namentlich Kleinkinder, immundefiziente und ältere Menschen, zusammen aufhalten.

1.1.3. Infektionszyklus von Salmonellen

Die Übertragung von *Salmonella* erfolgt in erster Linie über kontaminierte Lebensmittel oder verseuchtes Wasser, aber auch eine fäkal-orale Übertragung ist möglich (Hanning *et al.*, 2009). Die infektiöse Dosis der Bakterien variiert in Abhängigkeit des Serotyps und dem Immunstatus des Wirtes zwischen 10^2 bis 10^5 Zellen. Nachdem die Erreger den Gastrointestinaltrakt erreicht haben, induzieren sie im Dünndarm die Adhäsion und Invasion in die M-Zellen der Peyer'schen Plaques oder in nicht-

phagozytierende Epithelzellen (Clark *et al.*, 1994; Haraga *et al.*, 2008). Dieser Vorgang wird von den Genprodukten der SPI-1 und SPI-4 übernommen (Gerlach *et al.*, 2007; 2008). Die SPI-1 kodiert für ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), die über horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde (Groisman & Ochman 1997). Die Translokation bestimmter Effektormoleküle der SPI-1 in das Zytosol führen zu einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts innerhalb der Wirtszelle, wodurch sich dessen Zellmembran ausstülpt (*membran ruffling*) und die Internalisierung der Bakterien über Makropinozytose erfolgt (Hurley & McCormick, 2003; Haraga *et al.*, 2008; Worrall *et al.*, 2011). Durch eine ausgelöste Immunantwort der infizierten Zellen sammeln sich polymorph kernige Granulozyten an den Ort der Infektion und eine zunehmende Entzündungsreaktion in Form einer Gastroenteritis läuft ab. Die infizierten Epithelzellen leiten eine induzierte Apoptose ein, wodurch eine Verbreitung der Salmonellen in das darunterliegende lymphoide Gewebe ermöglicht wird (Ohl & Miller, 2001; Santos *et al.*, 2003). Dort kommen sie in Kontakt mit Zellen des Immunsystems, u.a. Makrophagen (M Φ) oder dendritischen Zellen (DC) und werden über eine Rezeptorvermittelte Phagozytose aufgenommen. Innerhalb dieser Zelle sind die Bakterien in einem Phagosom eingesperrt und wirtsspezifische Abwehrmechanismen, u.a. Bildung von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies, Senkung des pH-Werts mittels ATPasen und Rekrutierung antimikrobieller Proteinen bzw. Peptiden, werden eingeleitet (Flannagan *et al.*, 2009). Salmonellen haben viele Mechanismen entwickelt, um den antibakteriellen Abwehrmechanismen entgegen zu wirken und innerhalb des Wirtes zu überleben (Foster & Spector, 1995; Vazques-Torres & Fang, 2001; Cossart & Sansonetti, 2004; Flannagan *et al.*, 2009). Die pathogenen Bakterien verbleiben innerhalb der Wirtszelle in der membrangebundenen Vakuole, die einem Reifungsprozess unterliegt und als *Salmonella containing vacuole* (SCV) bezeichnet wird (Hensel, 2000; Haraga *et al.*, 2008). Die phagosomale Umgebung induziert die Expression der Gene der SPI-2, um einer Vernichtung der bakteriellen Zelle entgegenzuwirken (Hensel, 2000; Jong *et al.*, 2012). Die SPI-2 Effektormoleküle werden über die phagosomale Membran in das Zytosol transloziert und führen dort zu einer Umstrukturierung der wirtseigenen Zellstrukturen. Durch Bildung *Salmonella*-induzierten Filamenten treten die Bakterien in Kontakt mit dem Mikrotubuli-Netzwerk und können die wirtseigenen Motorproteine Dynein und Kinesin für die Positionierung der SCV in der Zelle nutzen, um beispielsweise Nährstoffe über abgeschnürte Vesikel des Golgi-Apparates zu akquirieren (Flannagan *et al.*, 2009). Auf Grund der Vielzahl von

Abwehrmechanismen und Veränderung der wirtseigenen Zellstrukturen sind Salmonellen in der Lage, sich innerhalb der SCV in Makrophagen zu vermehren (Holden, 2002). Die Inhibition der Antigenpräsentation in DC ermöglicht die Persistenz in diesen Zellen und die Behinderung des innate Immunsystems (van Diepen *et al.*, 2005). Erfolgt die Pyroptose der Immunzellen gelangen die Bakterien in den Blutkreislauf und lösen eine systemische Infektion der Leber, Niere und Lymphknoten aus (Santos *et al.*, 2003; Hurley *et al.*, 2014).

1.1.4. Relevanz des Metabolismus als Virulenzfaktor für *Salmonella*

Befinden sich die Salmonellen im Verdauungstrakt des Menschen, müssen mehrere Verteidigungslinien innerhalb des Wirtes für eine erfolgreiche Infektion überwunden werden. Neben dem darmassoziierten Immunsystem erschwert das dichtbesiedelte bakterielle Ökosystem den Erregern den Zugang zu den Wirtszellen. Die Pathogenen konkurrieren mit der mikrobiellen Kommensalfloora um essentielle Nährstoffe und müssen sich gegenüber dieser durchsetzen, um im Menschen dauerhaft zu überleben. Die Verfügbarkeit und Fähigkeit zur Verstoffwechslung der verschiedensten Kohlenstoff- und Energiequellen stellen wichtige Aspekte pathogener Bakterien für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes dar. Sind die Erreger in der Lage alternative Substrate zu verstoffwechseln, die von den kommensalen Bakterien nicht verwendet werden können, kann dieser Umstand ihr pathogenes Potenzial erhöhen, da sie in der Lage sind, spezifische ökologische Nischen erfolgreich zu besetzen. Durch Koevolution mit dem Wirt und der kommensalen Darmflora haben pathogene Bakterien verschiedene metabolische Anpassungsstrategien entwickelt, um ihren Lebensraum für sich einzunehmen (Kamada *et al.*, 2013). Während der Infektion mit *Salmonella* wurde beobachtet, dass sie eine Vielzahl von Genen stoffwechselphysiologischer Natur in Abhängigkeit der einwirkenden Stressfaktoren hochregulieren, und dass der bakterielle Metabolismus unmittelbar mit der Virulenz des Erregers verknüpft ist (Rollenhagen & Bumann 2006; Harvey *et al.*, 2011; Rosenkrantz *et al.*, 2013). Die metabolische Kapazität des zentralen Kohlenstoffmetabolismus ist bei *Salmonella* im Vergleich zu vielen anderen Pathogenen sehr vielseitig und ermöglicht dem Erreger flexibel und in synergistischer Weise auf die jeweiligen Umgebungsbedingungen im Wirt zu reagieren (Eisenreich *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2012). Alle potentiellen Kohlenstoff- und Energiequellen, die dieses Pathogen während der Infektion nutzt, um den Wirt erfolgreich zu kolonisieren, wurden noch nicht aufgedeckt. Jedoch sind durch die

Nahrung im Darmlumen, sowie die mechanische Barriere des Mukus eine Vielzahl von potentiellen Metaboliten vorhanden. In Salmonellen wurden viele spezifische metabolische Inseln gefunden, die den Erreger während der Infektion als metabolischen Generalisten enttarnte (Rohmer *et al.*, 2011; Dandekar *et al.*, 2015; Holtkötter & Hensel, 2016). Für die Ausbildung seiner Virulenz benötigt *Salmonella* eine Vielzahl von Nährstoffen, die nur in suboptimaler Menge während der Infektion zur Verfügung stehen und daher simultan abgebaut werden (Steeb *et al.*, 2013). Neben der Verstoffwechslung von Glukose konnte für den Abbau anderer Substrate wie Ethanolamin, 1,2-Propandiol, Ribose, Glycerol, Fucose und Sialinsäure eine *in vivo* Relevanz für die Salmonellen beschrieben werden (Götz & Goebel, 2010; Srikumar & Fuchs, 2011; Faber *et al.*, 2017; Rollenhagen & Bumann, 2006; Harvey *et al.*, 2011; Steeb *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2013). Während des Infektionszyklus des Erregers wird beispielsweise durch eine Subpopulation mit aktivierten T3SS eine Entzündung im Wirt ausgelöst, die nicht nur die im Darm befindliche Konkurrenz beseitigt, sondern gleichzeitig das Nährstoffangebot durch dessen Zelllyse erweitert (Ackermann *et al.*, 2008). Durch die Entzündungsreaktion wird Tetrathionat als exogener Elektronenakzeptor der anderen Subpopulation mit inaktivem T3SS zur Verstoffwechslung von 1,2-Propandiol und Ethanolamin zur Verfügung gestellt (Price-Carter *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 2010; Thiennimitr *et al.*, 2011). Die genetischen Determinanten für die Tetrathionat-Atmung sind im *ttrRSBCA*-Operon zusammengefasst, welches sich in der SPI-2 lokalisiert ist (Hensel *et al.*, 1999) und mit der Pathogenität in Zusammenhang gebracht werden konnte (Srikumar & Fuchs, 2011; Staib & Fuchs, 2015; Ng *et al.*, 2013; Faber *et al.*, 2017). Des Weiteren kann eine Vielzahl von Nährstoffen aus dem Mukus, der aus Glykoproteinen mit kovalent gebundenen Oligosacchariden oder acetylierten Neuraminsäure-Derivaten besteht, gewonnen werden. Beispielsweise werden die Sialinsäuren N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin durch Neuraminidasen der kommensalen Bakterien vom Mukus abgespalten und den Pathogenen als Substrat zur Verfügung gestellt. Durch die Verstoffwechslung von Sialinsäure kann die Virulenz von *Salmonella* positiv beeinflusst werden (Ng *et al.*, 2013). Weiterführend konnte für den Abbau von Galaktitol eine *in vivo* Relevanz ermittelt und die Regulation des zuständigen *gat*-Operons in *Salmonella* aufgeklärt werden (Chaudhuri *et al.*, 2013; Nolle *et al.*, 2017).

Die Nutzung alternativer Substrate stellt eine effiziente Strategie der Erreger dar, um der Nährstofflimitierung zu entgehen. Infolge der Akquisition metabolischer Inseln eigneten

sich die Salmonellen die Fähigkeit an, eine Vielzahl von Kohlenstoff- und Energiequellen zu nutzen und durch eine synergistische Wirkungsweise der Stoffwechselwege einen robusten Kohlenstoffmetabolismus innerhalb der spezifischen Nischen im Wirt zu etablieren (Fuchs *et al.*, 2012). Durch eine konvergente Evolution der regulatorischen Netzwerke gelang es *Salmonella* seine Virulenz mit dem Metabolismus zu verknüpfen, um seine extrazelluläre als auch eine intrazelluläre Lebensweise innerhalb des Wirtes zu begünstigen (Wilharm & Heider, 2014).

1.2. Der Abbau von *myo*-Inositol durch *S. Typhimurium*

Eine weitere virulenzrelevante metabolische Eigenschaft von *Salmonella* stellt der Metabolismus von *myo*-Inositol (MI) dar, dessen Relevanz für die Infektion in Mäusen, Schweinen, Hühnern und Kälbern nachgewiesen wurde (Carnell *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2009, 2013; Lawley *et al.*, 2006). Bei diesem Substrat handelt es sich um einen zyklischen Zuckeralkohol, der ubiquitär in der Umgebung vorhanden ist. In seiner phosphorylierten Form dient er als Inositolhexaphosphorsäureester oder Phytat als Phosphatspeicher für Pflanzen (Rodriguez & Fraga, 1999; Joshi-Saha & Reddy, 2015). Die Phytinsäure befindet sich in den äußeren Randschichten von Getreide, Hülsenfrüchten und vielen anderen Samen und wird täglich vom Mensch und Nutztier mit der Nahrung aufgenommen (Reddy, 2001). Im Darm wird Phytat durch die Phytaseaktivität anderer kommensaler Bakterien, wie z.B. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* hydrolytisch abgebaut und MI im Darmlumen pathogenen Bakterien zur Verfügung gestellt (Haros *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2012). Als Phospholipid-Derivat ist MI auch in der eukaryontischen Zellmembran vorhanden (Martin *et al.*, 2009). Durch spezifische Phospholipasen kann Inositol von der Membran gespalten und beispielsweise als Signalstoff für die Zellapoptose dienen. Die Fähigkeit MI zu nutzen ist im bakteriellen Reich weitverbreitet. Das Wachstum in Anwesenheit von MI wurde für Gram-positive Enteropathogene wie *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* und *Listeria monocytogenes* nachgewiesen (Kawsar *et al.*, 2004; Staib & Fuchs, 2014). Aber auch Gram-negative Erreger wie *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia liquefaciens*, *S. Marcescens*, und *S. Typhimurium* sind in der Lage MI zu verstoffwechseln (Kröger & Fuchs, 2009; Staib & Fuchs, 2014; Manske *et al.*, 2016). Die Nutzung von MI als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wurde 1969 in *S. Typhimurium* entdeckt (Gutnick *et al.*, 1969). Der

Ablauf des Abbaus des Polyols ist für *S. Typhimurium* mit den beteiligten Enzymen in Abb. 2 schematisch aufgeführt.

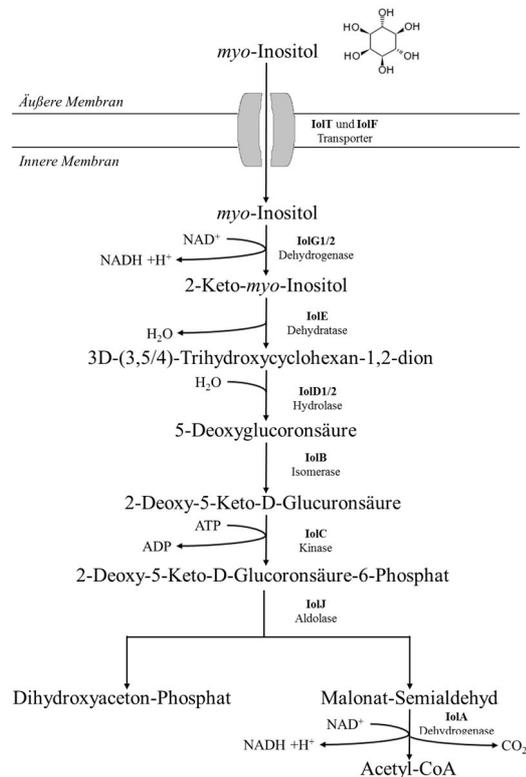


Abb. 2: Der schematische Ablauf des *myo*-Inositol Katabolismus. *Myo*-Inositol wird über die Zellmembran durch IolT und IolF transportiert und durch sieben enzymatische Reaktionen zu Dihydroxyaceton-Phosphat, Acetyl-CoA und CO₂ abgebaut. Dabei werden zwei Moleküle NAD⁺ reduziert und ein Molekül ATP verbraucht. Die Endprodukte werden dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus zugeführt (adaptiert nach Yoshida *et al.*, 2008; Kröger & Fuchs, 2009).

Der Abbau von MI wurde zuerst in *Enterobacter aerogenes* experimentell aufgezeigt, wobei nur die Ausgangs- und Endprodukte identifiziert wurden (Berman & Magasanik, 1966; Anderson & Magasanik, 1971). Der vollständige Abbauweg wurde für die Gattung *Bacillus* beschrieben (Yoshida *et al.*, 2008). In *Bacillus subtilis* sind die Gene für den Abbau des Polyols in einem *iol*-Divergon enthalten, das das Operon *iolABCDEFGIJ* und *iolRS* umfasst, das Gene *iolT* ist an anderer Stelle auf dem Chromosom lokalisiert. Das Gen *iolR* kodiert dabei für einen Repressor, der in Abwesenheit von dem Substrat die Expression des *iol*-Operons und des Gens *iolT* inhibiert (Yoshida *et al.*, 1997; 2002; 2004; 2008). Die Gene *iolF* und *iolT* wurden der MFS (*major facilitator superfamily*) Proteinfamilie zugeordnet und fungieren als Transportproteine von MI in die Zelle (Yoshida *et al.*, 1999; 2002; 2004; 2008). Zunächst wird die Hydroxylgruppe am C₂-Atom durch die Inositol-Dehydrogenase (IolG) dehydriert, wobei 2-Keto-*myo*-Inositol (2-KMI) entsteht und NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Im nächsten Schritt wird 2-KMI

ein Molekül H_2O durch die Dehydratase (IoIE) abgespalten und es entsteht 3D-(3,5/4)-Trihydroxycyclohexan-1,2-dion (THcHDO). Der Ring dieses Moleküls wird durch die Hydrolase (IoID) unter Einbau eines Moleküles H_2O zu 5-Deoxyglucuronsäure (5-DG) aufgespalten. Anschließend wird 5-DG durch IoIB zu 2-Deoxy-5-Keto-D-Gluconsäure (DKG) isomerisiert und durch die IoIC-Kinase unter Verbrauch eines Moleküls ATP phosphoryliert. Das entstehende Intermediat 2-Deoxy-5-Keto-D-Gluconsäure-6-Phosphat (DKGP) wird durch eine Aldolase (IoIJ) in Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) und Malonat-Semialdehyd (MSA) gespalten. Das Dihydroxyaceton-Phosphat wird anschließend der Glykolyse zugeführt. Das Malonat-Semialdehyd wird in einem letzten Schritt durch IoIA dehydriert, wobei NAD^+ zu NADH reduziert, ein Molekül CO_2 abgespalten und der Acetyl-Rest auf Coenzym A übertragen wird. In sieben enzymatischen Reaktionen entsteht pro Molekül MI ein Molekül Dihydroxyacetonphosphat, CO_2 und Acetyl-CoA, wobei zwei Moleküle NAD^+ und ein Molekül ATP verbraucht werden (Yoshida *et al.*, 2008; Kröger & Fuchs, 2009).

1.2.1. Die genomische Insel GEI4417/4436

In *S. Typhimurium* LT2 sind die Gene für den Abbau von MI auf einer 22,6 kb genomischen Insel (GEI4417/4436) lokalisiert, die im Chromosom den Nukleotidbereich von 4.658.556 bis 4.681.141 umfasst (s. Abb. 3). Die Insel beinhaltet 19 Gene, beginnend mit *iolR* (STM4417) und endend mit *iolH* (STM4436), die im Vergleich zu den entsprechenden Determinanten in Gram-positiven Bakterien komplexer organisiert sind (Kröger & Fuchs, 2009). Der G/C-Gehalt der genomischen Insel weicht mit 50,7 % nur leicht vom restlichen Chromosom ab, was eine Akquisition der GEI4417/4436 über horizontalen Gentransfer in Frage stellt bzw. über einen evolutionär langen Zeitraum in das Chromosom integriert wurde.

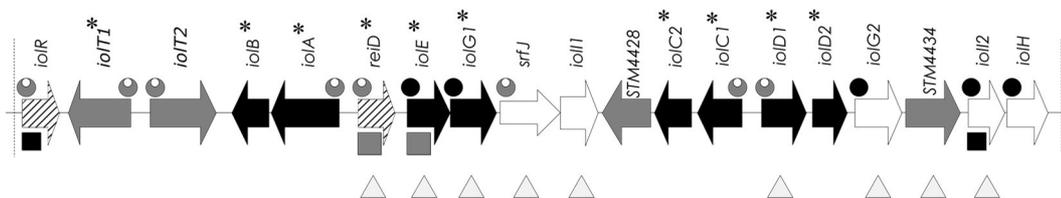


Abb. 3: Darstellung der genomischen Insel GEI4417/4436 in *S. Typhimurium*. Schwarz markierte Gene kodieren für abbaue Enzyme, grau markierte für Transportproteine, gestreift markierte für die transkriptionellen Regulatoren und weiß markierte konnte bisher keine bekannte Funktion zugewiesen werden. Die Bindung der Regulatoren an die Promotorbereiche wurde für *IolR* (grauer Kreis) und *ReiD* (graues Quadrat) bereits nachgewiesen. Bei keiner nachgewiesenen Bindung wurden diese mit jeweiligen schwarzen Symbolen der Regulatoren versehen. Essentielle Gene für den Abbau sind mit einem Sternchen und die mit einer *in vivo* Relevanz mit einem Dreieck gekennzeichnet (adaptiert nach Kröger & Fuchs, 2009, Kröger *et al.*, 2010, Cordero-Alba *et al.*, 2012; Rothhardt *et al.*, 2014 mit Genehmigung von John Wiley & Sons Ltd.).

Durch Sequenzvergleich mit *B. subtilis* und *in vivo* Studien wurden den meisten Genen der genomischen Insel eine Funktion zugeordnet und die Regulation der Gene weitreichend aufgeklärt (Kröger & Fuchs, 2009; Kröger *et al.*, 2010; 2011; Rothhardt *et al.*, 2014). Eine Übersicht der Gene der genomischen Insel GEI4417/4436 mit ihrer Funktion ist in Tab. 1 zusammengefasst. Neben den Genen, die für die abbauenden Enzyme kodieren, enthält die genomische Insel vier Gene für putative Transportproteine, wobei *IolT1* als Haupttransporter fungiert (Kröger *et al.*, 2010), zwei Gene mit regulatorischer Funktion, den Repressors *IolR* (Kröger & Fuchs 2009) bzw. den Aktivators *reiD* (Rothhardt *et al.*, 2014) und das Gen *srfJ*, welches für eine putative lysosomale Glykosylceramidase kodiert (Worley *et al.*, 2000). Die Expression von *srfJ* wird durch das Zweikomponentensystem SsrAB induziert und steht gleichzeitig unter der Kontrolle von *IolR*, wobei das Protein nicht beim Abbau des Polyols beteiligt ist (Cordero-Alba *et al.*, 2012). Durch Verschiebung der offenen Leserahmen sind *iolC*- und *iolD*-Homologe entstanden, die als *iolC1/2* und *iolD1/2* annotiert wurden. Die Enzyme *IolG2*, *IolD1* und *IolD2* benötigen für ihre Aktivität Thiaminpyrophosphat als Kofaktor. Es wurden die fünf separaten transkriptionellen Einheiten *iolA-iolB*, *iolE-iolG1*, *iolC1-iolC2*, *iolD1-iolD2-iolG2* und *iolI-iolH* identifiziert, die für den Abbau von Inositol relevant sind (Kröger & Fuchs, 2009).

Tab. 1: Übersicht der Gene der GEI4417/4436 und ihre Funktion in *S. Typhimurium* (modifiziert nach Kröger & Fuchs, 2009; Kröger *et al.*, 2010; Cordero-Alba *et al.*, 2012; Rothhardt *et al.*, 2014).

Gen	Annotation	Protein	Funktion	Essentiell*
<i>iolR</i>	STM4417	Transkriptionsregulator	Hauptrepressors des Inositolabbaus	nein
<i>iolT1</i>	STM4418	Permease	<i>myo</i> -Inositol Transporter	ja
<i>iolT2</i>	STM4419	Permease	<i>myo</i> -Inositol Transporter	nein
<i>iolB</i>	STM4420	Isomerase	5DG/DKG Isomerisierung	ja
<i>iolA</i>	STM4421	Dehydrogenase	MSA Konvertierung zu Acetyl-CoA und CO ₂	ja
<i>reiD</i>	STM4423	Transkriptionsregulator	Aktivator des Inositolabbaus	ja

Fortsetzung Tab. 1

<i>iolE</i>	STM4424	Dehydratase	2KMI/THcHDO Dehydratation	ja
<i>iolG1</i>	STM4425	Dehydrogenase	MI/2KMI Dehydrierung	ja
<i>srfJ</i>	STM4426	putative lysosomale Glykosylceramidase	Effektormolekül der SPI-2 durch SsrB induziert	nein
<i>iolI1</i>	STM4427	Isomerase	2KMI/1-Keto-DCI Isomerase	nein
STM4428		Permease	unbekannt	nein
<i>iolC2</i>	STM4429	Kinase	Phosphorylierung von DKG zu DKGP	ja
<i>iolC1</i>	STM4430	Kinase	Phosphorylierung von DKG zu DKGP	ja
<i>iolD1</i>	STM4431	Hydrolase	Ringbruch THcHDO/5DG	unbekannt
<i>iolD2</i>	STM4432	Hydrolase	Ringbruch THcHDO/5DG	ja
<i>iolG2</i>	STM4433	Dehydrogenase	unbekannt	nein
STM4434		Permease	unbekannt	nein
<i>iolI2</i>	STM4435	Isomerase	2KMI/1-Keto-DCI Isomerase	nein
<i>iolH</i>	STM4436	Isomerase/ Dehydratase	unbekannt	nein

* essentiell für das Wachstum in Minimalmedium mit *myo*-Inositol als einzige Kohlenstoffquelle bei 37 °C

Die GEI4417/4436 wurde in den *S. enterica* Serotypstämmen Typhimurium LT2, 14028, D23580, UK-1, T000240, ST4/74 und SL1344; Serovar Agona SL483; Serovar Saintpaul SARA23; Serovar Weltevreden HI_N05-537 und Serovar Paratyphi B SPB7 entdeckt (Kröger & Fuchs, 2009; Cordero-Alba *et al.*, 2012). In acht untersuchten typhoidalen *Salmonella* Stämmen ist die genomische Insel nicht zu finden, weshalb die Expression der *iol*-Gene für eine systemische Infektion offenbar nicht von Bedeutung ist (Staib & Fuchs, 2014).

1.2.2. Die Regulation des Abbaus von *myo*-Inositol

Bei der Regulation der Gene für den Abbau von MI sind in *S. Typhimurium* spezifische als auch globale Regulatoren beteiligt. In der genomischen Insel sind zwei Gene enthalten, die als Transkriptionsfaktoren an der Regulation beteiligt und als STM4417 bzw. STM4423 annotiert sind. Beide Proteine besitzen ein *helix-turn-helix*-(HTH)-Motiv für Wechselwirkungen mit der DNS und eine zweite Domäne, in der sich die Regulatoren voneinander unterscheiden. Beide Regulatoren nehmen eine Schlüsselrolle bei der Verstoffwechslung von MI ein (Kröger & Fuchs, 2009; Rothhardt *et al.*, 2014).

Das Protein IolR (STM4417) hat ein Molekulargewicht von 30,6 kDa und wird von den Nukleotiden 4.658.541 – 4.659.374 in *S. Typhimurium* LT2 kodiert. Dieses regulatorische Protein reprimiert die *iol*-Genexpression unter nährstoffreichen Bedingungen und wirkt autoreglativ auf seinen eigenen Promotor (Yoshida *et al.*, 1999; 2008; Kröger & Fuchs, 2009; Kröger *et al.*, 2011). IolR bindet an die Operatorstruktur der DNS von vier Operons, die die Gene des Abbaus von MI beinhalten (s. Abb. 3), mit Ausnahme des *iolE-iolG1* Operons (Kröger & Fuchs, 2009). Der Repressor gehört zur MurR/RpiR Proteinfamilie mit C-terminaler Zuckerphosphat-bindenden SIS-Domäne (*sugar isomerase domain*) und N-terminalem DNS-bindendem HTH-6 (*helix turn helix*) Motiv (Kröger & Fuchs, 2009; Kohler *et al.*, 2011). Über das HTH-Motiv bindet das Protein an die Operatorbereiche der *iol*-Gene und übt seine repressorische Funktion durch Transkriptionseinhibition der RNA-Polymerase aus. Im Allgemeinen sind SIS-Domänen an der Isomerisierung oder Bindung von Zuckerphosphaten beteiligt und als Bestandteil von Transkriptionsregulatoren im bakteriellen Reich weit verbreitet. Durch die Wahrnehmung der zellulären Zuckerkonzentration über die SIS-Domäne wird die spezifische DNS-Bindung und Repression der Genexpression reguliert (Bateman, 1999). Das Protein IolR weist eine hohe Sequenzhomologie zu dem RpiR in *E. coli* auf, nachdem die Proteinfamilie benannt wurde. RpiR inhibiert die Expression des *rpiB*-Gens, welches als Ribose-Phosphat-Isomerase die reversible Reaktion von Ribose-5-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat katalysiert (Sørensen & Hove-Jensen, 1996). Zur MurR/RpiR-Proteinfamilie zählen eine Vielzahl von bakteriellen Transkriptionsfaktoren, die für katabole Stoffwechselwege entweder eine aktivierende, reprimierende oder duale Funktion ausüben können (Zhu *et al.*, 2011; Daddaoua *et al.*, 2009; Leyn *et al.*, 2011). Eine nicht-kompetitive Hemmung über die Bindung des Intermediat 2-Deoxy-5-Keto-Glucuronsäure-6-Phosphat (DKGP) an die SIS-Domäne des IolR-Proteins wurde bereits

beschrieben, wodurch die *iol*-Genexpression in Anwesenheit von MI induziert wird (Yoshida *et al.*, 1999; 2002; 2004; 2008; Kohler *et al.*, 2011). Für den Repressor konnte außerdem eine übergreifende aktivierende Funktion außerhalb der GEI4417/4436 für andere Stoffwechselwege u.a. die Enzyme der Gluconeogenese, sowie dessen Einfluss auf posttranslationale Regulationsmechanismen beobachtet werden (Klaffl *et al.*, 2013; Hentchel *et al.*, 2015).

Das Protein ReiD (STM4423) weist ein Molekulargewicht von 33,5 kDa auf und wird von den Nukleotiden 4.665.835 – 4.666.710 von *S. Typhimurium* LT2 kodiert. Der *Salmonella*-spezifische Aktivator ReiD (*regulation essential for inositol degradation*) ist essentiell für den Abbau von MI und taxonomisch auf einzelne Serotypen von *Salmonella enterica* u.a. *S. Typhimurium* 14028, LT2 und ST4/74, sowie die Serovare Agona, Paratyphi B, Weltevreden, Infantis und Enteritidis begrenzt. Das Gen *reiD* weist keine Homologien zu Genen anderer Abstammungslinien auf, so dass seine Akquirierung und funktionale Einbindung in das bestehende Regulon noch ungeklärt ist. Das Protein ReiD induziert die Genexpression des *iolE-iolGI* Operons, das für die initialen Enzyme für den Abbau von MI kodiert, sowie seine eigene Expression in Anwesenheit des Polyols, wobei das Gen *reiD* unter der Kontrolle von IolR steht. Somit initiiert der Regulator die Expression der MI-abbauenden Gene bei ausbleibender IolR-Repression in Anwesenheit des Polyols, wobei der auslösende Stimulus für diese Reaktion noch identifiziert werden muss. Der C-Terminus des Aktivators weist Homologie zur AraC-Superfamilie und der N-Terminus zur Cupin-2 Superfamilie, mit einer kleinen β -Faltblatt-Supersekundärstruktur, auf (Rothhardt *et al.*, 2014). ReiD scheint eine Relevanz bei der Infektion zu spielen, da er vermehrt während einer Enteritidis im murinen Modell produziert wird (Lawley *et al.*, 2006; Rollenhagen & Bumann, 2006; Chaudhuri *et al.*, 2013; Rothhardt *et al.*, 2014). Der Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren deutet auf einen komplexen Regulationsmechanismus hin, der einzigartig für den MI-Metabolismus ist und nur in einzelnen *Salmonella enterica* Stämmen vorkommt (Rothhardt *et al.*, 2014).

Durch genomweite Analysen wurde die Beteiligung der globalen Regulatoren H-NS und SsrB an der Steuerung der Gene innerhalb der genomischen Insel GEI4417/4436 bestätigt (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Das Zweikomponentensystem (2-KS) SsrA-SsrB ist eines der wichtigsten

Regulationsmechanismen für die Expression der Gene der SPI-2, wobei eine übergreifende Funktion außerhalb der Pathogenitätsinsel mehrfach beobachtet wurde (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Bei einem 2-KS kommt es infolge eines einwirkenden Umweltsignales, z.B. der pH-Werterniedrigung im umgebenen Medium, zur Autophosphorylierung der membranassoziierten Sensor kinase SsrA, die im nächsten Schritt die Phosphatgruppe auf den transkriptionellen Regulator SsrB überträgt und dieser eine zelluläre Reaktion auslöst (Cirillo *et al.*, 1998, Miao *et al.*, 2002; Fàbrega & Vila, 2013). Das Nukleosom-assoziierte Protein H-NS besitzt eine unspezifische DNS-Bindeaktivität und die Fähigkeit die Topologie der Nukleinsäure zu verändern, um die Expression verschiedener Operons zu beeinflussen. H-NS hindert vor allem die Gene in ihrer Expression, die über horizontalen Gentransfer erworben wurden (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006). Diese grundsätzlich reprimierende Wirkung von H-NS dient dazu, neu erworbene Gene in ihrer Expression zu kontrollieren, bis ein positiver Regulator für die Expression dieser Gene oder ein auf H-NS antagonistisch wirkendes Protein im Laufe der Evolution *de novo* gebildet bzw. erworben wurde, um die Repression unter induzierenden Bedingungen aufzuheben (Fàbrega & Vila, 2013). Ein weiterer globaler Regulator ist CRP (cAMP-Rezeptorprotein), welcher cAMP-abhängig in Abwesenheit von Glukose die Transkription von über 100 Genen in Bakterien, über die direkte Interaktion mit der RNS-Polymerase aktiviert (Kolb *et al.*, 1993). Die Beteiligung von CRP an der Regulation der MI-abbauenden Gene konnte verteilt über die gesamte genomische Insel identifiziert werden (Nihashi & Fujita, 1984; Yoshida *et al.*, 1997, 2001; Miwa & Fujita, 2001; Yebra *et al.*, 2007; Kröger & Fuchs, 2009). Ebenfalls wurden drei sRNS-Gene, die für die regulatorische sRNS STnc1750, RssR (STnc2160) und STnc1740 kodieren, innerhalb der genomischen Insel GEI4417/4436 identifiziert, wobei nur die beiden letzteren exprimiert werden (Kröger *et al.*, 2013). Diese sRNS sind 50 bis 150 bp lang und interagieren als nicht-kodierende RNS-Fragmente mit 5'-UTR-Regionen anderen RNS-Molekülen z.B. der mRNA, wodurch sie dessen Stabilisierung oder Degradation beeinflussen (Waters & Storz, 2009). Das RNS-bindende Protein Hfq kann in Verbindung mit sRNS ebenfalls eine regulatorische Funktion auf die genomische Insel ausüben und wurde für die Interaktion mit der kodierten sRNS RssR bereits beschrieben (Chao *et al.*, 2012; Kröger *et al.*, 2012, 2013). Eine essentielle Funktion von Hfq wurde für die Regulation der Virulenzfaktoren in *S. Typhimurium* bereits bestätigt (Sittka *et al.*, 2007).

1.2.3. Der Abbau von *myo*-Inositol als Virulenzfaktor

Myo-Inositol ist als Bestandteil pflanzlicher Futtermittel im Darmlumen von Nutztieren als auch als Phospholipid-Derivat in der eukaryotischen Zellmembran in ausreichender Menge vorhanden. Viele Enteropathogene, wie *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* und *Clostridium perfringens*, haben sich ebenfalls auf den Abbau von MI spezialisiert. Eine Induktion der *iol*-Genexpression wurde während der Infektion von Mäusen mit *Enterococcus faecalis* bereits festgestellt (Lindenstrauß, 2012). Eine Verbindung dieses Stoffwechselweges mit der Virulenz von *S. Typhimurium* wurde ebenfalls in Mäusen, Schweinen, Hühnern und Kälbern aufgedeckt (Carnell *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2009, 2013; Lawley *et al.*, 2006, Rothhardt *et al.*, 2014). Die putative lysosomale Glykosylceramidase SrfJ wurde als Effektormolekül der SPI identifiziert und wird über den globalen Regulator SsrAB, sowie den Repressor IolR in seiner Expression kontrolliert. Die Deletion von SrfJ führt zu einer attenuierten Virulenz im Mausmodell (Worley *et al.*, 2000; Ruiz-Albert *et al.*, 2002; Cordero-Alba *et al.*, 2012).

Die Beteiligung an der Regulation und *in vivo* Funktion der Transkriptionsfaktoren IolR und ReiD ist einzigartig für den MI-Metabolismus und kommt nur in einzelnen *Salmonella enterica* Stämmen vor (Rothhardt *et al.*, 2014). Für den Regulator IolR konnte eine Relevanz während der Infektion festgestellt werden (Chaudhuri *et al.*, 2013). Ebenso steht der Aktivator ReiD im Zusammenhang mit der Virulenz, da er vermehrt während einer Enteritidis produziert wird (Rollenhagen & Bumann, 2006, Lawley *et al.*, 2006, Chaudhuri *et al.*, 2013, Rothhardt *et al.*, 2014). Zudem wurde ein positiver Effekt auf den Abbau von Inositol durch $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ festgestellt, der den Bakterien den Aufenthalt im Wirt signalisiert und in Verbindung mit der Induktion von Virulenzgenen in einigen Organismen steht (Kröger *et al.*, 2011; Abel *et al.*, 2001; Abuaita & Withey, 2009). Die Feststellung, dass die genomische Insel GEI4417/4436 in den Serovaren Typhi, Gallinarum, Dublin und Choleraesuis abwesend, aber in den nicht-typhoiden *S. enterica* Serotypstämmen Typhimurium und Enteritidis vorhanden ist, weist daraufhin, dass MI-abbauende Salmonellen einen Wachstumsvorteil während der Vermehrung im Darm seiner Wirte haben könnten (Kröger & Fuchs, 2009; Staib & Fuchs, 2014). Die Verstoffwechslung von MI ist ein Beispiel für einen adaptiven metabolischen Abbauweg mit einer potentiellen *in vivo* Funktion, da es die Proliferation der Salmonellen innerhalb seiner Wirte begünstigt.

1.2.4. Besonderheiten während des Wachstums von Salmonellen mit *myo*-Inositol

Das Wachstum von *S. Typhimurium* 14028 in Minimalmedium (MM) mit MI als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle ist von mehreren Merkmalen geprägt. Bei der Kultivierung von *S. Typhimurium* in flüssigem MM mit MI wurde eine lange Anlaufphase von 40 bis 60 Stunden dokumentiert, die unter den gleichen experimentellen Bedingungen mit einer sehr hohen Variabilität unterlag (Kröger & Fuchs, 2009). Beim Eintritt der bakteriellen Kultur in die stationäre Wachstumsphase ist eine Braunfärbung des Medium zu erkennen, die nur bei Anwesenheit von Sauerstoff auftrat (Old, 1972; Kröger & Fuchs, 2009). Zusätzlich wurde ein außergewöhnlich heterogener Phänotyp auf festem Medium mit MI erkannt, der sich in Form von schnellwachsenden Kolonien im Vordergrund und langsam wachsenden Kolonien im Hintergrund zeigte (Kröger *et al.*, 2011). Bei erneuter Passagierung der sich unterscheidenden Phänotypen auf festem Medium mit dem Polyol wurde nur für die langsam wachsenden Kolonien eine phänotypische Heterogenität beobachtet, wohingegen die schnellwachsenden Kolonien einen einheitlichen Phänotyp zeigten. Eine Revision zum heterogenen Phänotyp erfolgte durch drei Passagen in LB-Medium, wodurch dieses Phänomen nicht auf eine genetische Mutation zurückzuführen ist. Des Weiteren deutet dieses Ergebnis auf ein Gedächtnis der Zellen in Abwesenheit von MI hin. Die Länge der Anlaufphase während des Wachstum in MI wurde durch die Deletion des Repressors *IolR* oder in Anwesenheit von 0,55 % Kohlenstoffdioxid, sowie durch Induktion der Gene *iolE*, *iolG* oder *reiD* reduziert (Kröger *et al.*, 2011; Rothhardt *et al.*, 2014). Durch Untersuchungen auf Einzelzellebene konnte die phänotypische Heterogenität von *S. Typhimurium* auf die bistabile Aktivität des *iolE-iolGI*-Operon während des Wachstums mit MI innerhalb der Population zurückgeführt werden (Kröger *et al.*, 2011). Das *iolE-iolGI* Operon kodiert die Enzyme *IolE* und *IolG1*, die die initialen enzymatischen Schritte des MI-Abbaus katalysieren. Mittels Durchflusszytometrie wurde ein gradueller Wechsel der transkriptionellen Aktivität des *iolE*-Gens in MM mit MI beim Übergang der Anlaufphase in die logarithmische Wachstumsphase in einer Subpopulation nachgewiesen (s. Abb. 4). Es wurden unterschiedliche Ausprägungen der *iolE*-Transkription innerhalb der Population beobachtet. Entweder wiesen die Zellen keine, eine geringe oder eine hohe P_{iolE} -Aktivität während des Wachstums mit MI auf.

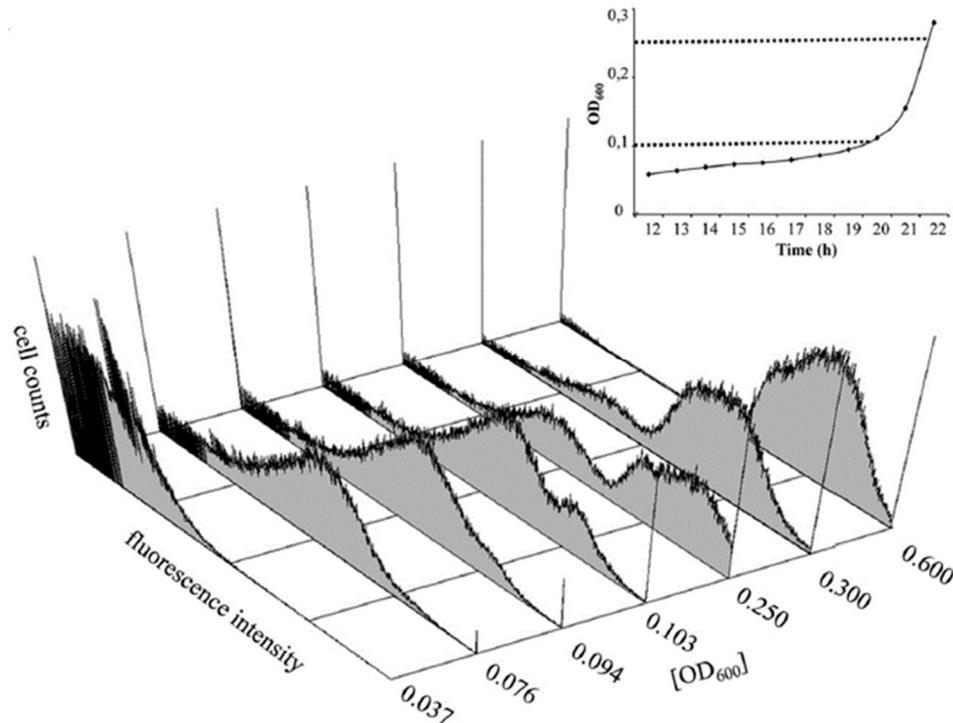


Abb. 4: Analyse der transkriptionellen Aktivität des *iolE*-Promotors mittels Durchflusszytometrie. Gemessen wurde *S. Typhimurium* 14028 pNT-*P_{iolE}* in MM mit MI. Die *gfp*-exprimierenden Zellen wurden mit dem LSR II Zytometer quantifiziert. Die Abszisse des Histogramms repräsentiert die Fluoreszenzintensität des Gfp-Proteins bei 515 bis 545 nm in logarithmischer Skalierung und die Ordinate die gemessenen Zellen. Die Zeitpunkte und die Werte der optischen Dichte bei 600 nm sind mitangegeben. Die Wachstumskurve wurde zur Identifizierung der Wachstumsphase der bakteriellen Kultur mit abgebildet (Kröger *et al.*, 2011).

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde ein vorläufiges Modell für die Regulation des MI-Metabolismus in *S. Typhimurium* 14028 postuliert. Durch die basale Expression des Haupttransporters ist eine geringe Menge an IolT1 in der bakteriellen Zellmembran vorhanden. In Anwesenheit von MI wird der Zucker über IolT1 in das Zytoplasma der Zelle transportiert und zu DKGP abgebaut. Das Intermediat bindet an IolR, so dass der Repressor von den *iol*-Promotoren ab dissoziiert. Ist ein bestimmter Grenzwert von DKGP erreicht kann die Repression nicht mehr aufrechterhalten und die *iol*-Genexpression durch den Aktivator ReiD mit einer positiven Rückkopplungsschleife vermehrt induziert werden (Rothhardt *et al.*, 2014). Durch suboptimale Mengen des Intermediates wird die Expression nicht einheitlich innerhalb der Population induziert, wodurch eine Bistabilität in Erscheinung tritt (Kröger *et al.*, 2011).

1.3. Phänotypische Heterogenität

Um ökologische Nischen erfolgreich zu besetzen müssen Bakterien in der Lage sein, sich an viele verschiedene Bedingungen anzupassen, z.B. pH-Wert, Osmolarität, Temperatur, Nährstoffverfügbarkeit und mikrobielle Konkurrenz. Die Fähigkeit der Adaptation wird durch die genetische Kapazität der Bakterien begrenzt, so dass regulatorische Mechanismen und genetische Netzwerke entwickelt wurden, um auf eine vielfältige Weise auf die Umwelt zu reagieren. Dadurch werden die zur Verfügung stehenden Ressourcen optimal genutzt und das Überleben der Spezies gesichert. Dank einer beständigen Entwicklung neuester Technologien auf dem Gebiet der Einzelzellanalyse konnten mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie einzelne Zellen innerhalb einer Population analysiert und eine ungewöhnliche Variation innerhalb einer Merkmalsausprägung aufgedeckt werden (Ozbudak *et al.*, 2002; Elowitz *et al.*, 2002). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass in einer isogenen Population die Genaktivität einheitlich ist. Untersuchungen zeigten jedoch, dass genetisch identische Zellen sich unter denselben Bedingungen unterschiedlich verhalten. Dieses Phänomen wurde als phänotypische Heterogenität beschrieben und geht auf genetische Veränderung z.B. adaptive Mutagenese oder Phasenvariation (Moxon *et al.*, 1994) und auf einen nicht genetischen Ursprung, wie epigenetische Modifikation der DNS-Methylierung (Low *et al.*, 2001; Bennett & Hasty, 2007; Casadesús & Low, 2013), Zellzyklus-abhängige Variation oder auf das Alter der Zellpole zurück (Bergmiller & Ackermann, 2011). Die Genregulation über Rückkopplungsmechanismen stellt einen weiteren Mechanismus unabhängig von genetischen Veränderungen dar (Ferrell, 2002; Smits *et al.*, 2008). Durch diese Vorgehensweise der Bakterien werden verschiedene Nachkommen bzw. Phänotypen aus einer Generation hervorgebracht, die zwar genetisch identisch sind, sich aber in ihrer Anpassung an die Umwelt unterscheiden. Diese Strategie wird als „*bet-hedging*“ bezeichnet und stellt durch Ausbildung mehrerer Varianten eine Art Risikostreuung der Bakterien dar (Philippi & Seger, 1989). Ein Teil der Population hat unter gleichbleibenden Bedingungen zwar geringere Überlebenschancen, aber der Fortbestand der eigenen Art ist in einer sich schnell ändernden Umwelt, in der eine Anpassung über Regulation der Genexpression zu langsam wäre, gesichert (Veening *et al.*, 2008b; Ackermann, 2015).

1.3.1. Ursprung und Charakteristika von heterogenen Populationen

In biologischen Systemen unterliegt die Expression eines Gens zufälligen Fluktuationen in der Synthese- und Abbaurate des Genproduktes (s. Abb. 5 A), die auch als „Rauschen“ bezeichnet wird (Ozbudak *et al.*, 2002; Ferrell, 2002; Smits *et al.*, 2006). Dabei wird zwischen intrinsischem und extrinsischem Rauschen unterschieden, die beide zur phänotypischen Variation führen können (Swain *et al.*, 2002; Elowitz *et al.*, 2002). Faktoren des intrinsischen Rauschens stellen beispielsweise stochastische Ereignisse während der Transkription und Translation des betroffenen Gens z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den Promotor oder die Bindung der mRNA an die Ribosomen dar. Auf der anderen Seite können globale Einflüsse z.B. die Menge, Aktivität und Lokalisation anderer molekularer Spezies wie die RNA-Polymerase oder Ribosomen als extrinsisches Rauschen die Expressionsstärke beeinträchtigen. Wird infolge starker Fluktuationen der Grenzwert für die Konzentration eines Reaktanten z.B. eines Regulators überschritten, wird eine nichtlineare Zellantwort der ihm unterliegenden Gene ausgelöst (Smits *et al.*, 2006). In diesem Zustand steht die Expression eines Gens in keiner direkten Korrelation zur intrazellulären Regulatorkonzentration, d.h. das System weist eine Hypersensibilität gegenüber dem Regulator auf. Dieser Prozess wurde bereits für das Alles-oder-Nichts Prinzip der Enzyminduktion erkannt (Novick & Weiner, 1957).

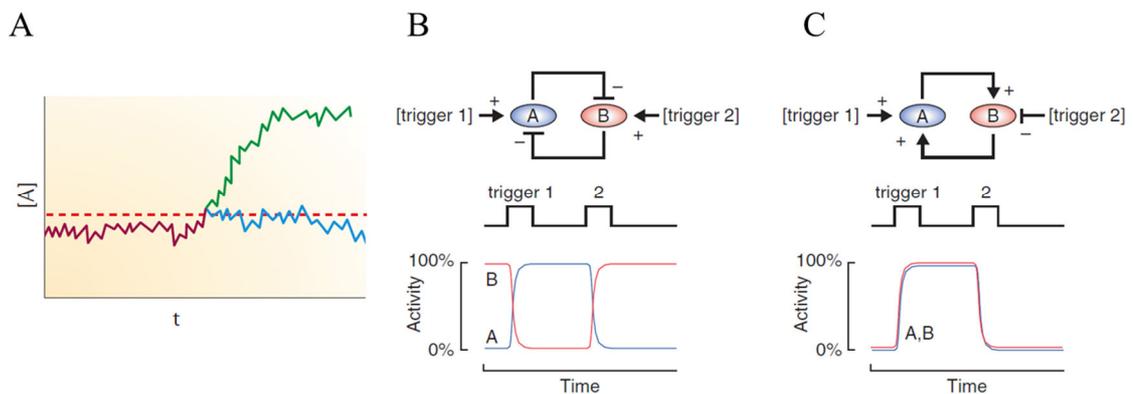


Abb. 5: Ursprung und Charakteristika eines bistabilen Systems. (A) Durch den Einfluss des Rauschens kommt es zu Fluktuationen in der Synthese- und Abbaurate eines Regulator-Proteins A über die Zeit. Bei einer Grenzwertüberschreitung (unterbrochene rote Linie) wird in einem bistabilen System eine nichtlineare Zellantwort ausgelöst (grüne Linie), wodurch der Regulator in der Zelle akkumuliert (Darstellung aus Smits *et al.*, 2006 mit Genehmigung der Nature Publishing Group). Bistabile Signaltransduktionswege werden durch Rückkopplungsmechanismen generiert, die von einer doppelt negativen (B) oder positiven Regulation (C) gekennzeichnet sind. Beide Kreisläufe können zu einer stabilen und anhaltenden Zellantwort, auch in Abwesenheit des induzierenden Stimulus führen (Darstellung aus Ferrell, 2002 mit Genehmigung von Elsevier Science Ltd.).

Durch das Rauschen wird der Grenzwert in den einzelnen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten überschritten, wodurch sich die Population in zwei koexistierende Zustände

einer Merkmalausprägung aufspaltet, die jeweils eine stabile Genexpression aufweisen (Smits *et al.*, 2006). Die Existenz von zwei stabilen Subpopulationen einer genetisch identischen Bakterienkultur wird auch als Bistabilität bezeichnet. Das Rauschen kann sowohl genspezifisch, als auch unabhängig von regulatorischen Mechanismen sein (Fraser *et al.*, 2004; Raser & O'Shea, 2004), wodurch dieses Phänomen einem stochastischen und epigenetischen Effekt unterliegt (Casadesús & D'Ari, 2002). Ein weiteres Anzeichen für den Einfluss der Epigenetik ist die Generierung der Ausgangspopulation durch den überlebenden Phänotyp (Smits *et al.*, 2006). Durch Modellierungen und Konstruktion synthetischer Gen-Netzwerke wurde die Beteiligung von Rückkopplungsmechanismen entdeckt (Gardner *et al.*, 2000; Elowitz & Leibler, 2000; Becskei *et al.*, 2001). Es werden zwei Arten von Rückkopplungsschleifen dabei beschrieben, die doppelt-negative und die positive Rückkopplung (Ferrell, 2002), die aber nicht zwingend das Auftreten von Bistabilität zur Folge haben (Acar *et al.*, 2008). Bei der doppelt-negativen Rückkopplung reprimieren die beteiligten Proteine gegenseitig ihre transkriptionelle Genexpression, wodurch es zu einem kippschalterartigen Wechsel in der Proteinproduktion kommt (Gardner *et al.*, 2000). Der extrinsisch einwirkende Stimulus beeinflusst dabei den vorliegenden Zustand der Genexpression (s. Abb. 5 B). Bei der positiven Rückkopplung kommt es zu einer gegenseitigen transkriptionellen Induktion der Genexpression der Regulatoren (s. Abb. 5 C). Als Voraussetzung muss die Stärke der Interaktionspartner ausgeglichen sein, damit zwei stabile Zustände entstehen können. Rückkopplungsmechanismen führen zu einer kontinuierlichen Proteinproduktion, auch wenn der für den Zustand benötigte Stimulus nicht mehr auf das System einwirkt. Dieses Phänomen wird als Hysterese bezeichnet.

1.3.2. Die Fähigkeit Laktose abzubauen ist von Bistabilität geprägt und in Abwesenheit des abzubauenden Substrates tritt ein Hysterese-Effekt auf

Das Phänomen der Bistabilität wurde zuerst im Lactoseabbau von *E. coli* aufgedeckt. Nur ein Teil der Population induziert die *lac*-Expression für den Abbau von Laktose, wohingegen der andere Teil in einem uninduzierten Zustand bleibt (Novick & Weiner, 1957; Ozbudak *et al.*, 2004). Das *lac*-Operon enthält die Strukturgene, die für eine β -Galactosidase (*lacZ*), eine Laktose-Permease (*lacY*) und eine Acetyltransferase (*lacA*) kodieren. Die Laktose und verwandte Zuckermoleküle werden über LacY und andere unspezifische Transporter in das Zytosol der Zelle transportiert und dort von LacZ in Allolaktose umgewandelt oder in Galaktose und Glukose gespalten.

Die Transacetylase LacA acetyliert Galactoside, Glucoside und Lactoside und steht im Zusammenhang mit einer Detoxifikation der Zelle und einer Induktion der *lac*-Gene (Roderick, 2005; Marbach & Bettenbrock, 2012). Die Expression der Laktose-abbauenden Gene wird durch zwei transkriptionelle Regulatoren kontrolliert, den Repressor LacI und Aktivator CRP, die erst nach Multimerisierung ihre Funktion ausüben können. Durch den transkriptionellen Regulator CRP steht das *lac*-Operon in *E. coli* unter einem cAMP-abhängigen System der Katabolitrepression, da das Protein durch die intrazelluläre cAMP-Konzentration in seiner Aktivität beeinflusst wird. Die cAMP-Konzentration wird durch die Aktivität der membranassoziierten Adenylatzyklase (AC) kontrolliert, die wiederum von der Beteiligung des Phosphotransferasesystems reguliert wird. Bei einer hohen Zuckerverfügbarkeit von Glukose, Mannose oder Fruktose bleibt die AC inaktiviert und die intrazelluläre cAMP-Konzentration nimmt ab. Eine CRP-Aktivierung bleibt aus und LacI kann die *lac*-Genexpression inhibieren. Der Laktoseabbau unterliegt einer positiven Rückkopplungsschleife über die Permease LacY, d.h., wenn die intrazelluläre Konzentration der Laktose einen Grenzwert überschreitet, wird durch LacZ vermehrt der Induktor Allolaktose gebildet, der durch Bindung von LacI dessen Dissoziation von der DNS bewirkt und die *lac*-Genexpression induziert. Es wird vermehrt LacY gebildet und durch seine Aktivität Laktose in die Zelle aufgenommen. Durch diese Rückkopplung wird die *lac*-Genexpression in einen induzierten Zustand gehalten (Ozbudak *et al.*, 2004). Bistabilität tritt in diesem System auf, wenn innerhalb der Zellen eine suboptimale Konzentration an Laktose oder Induktor vorliegt und durch stochastische Fluktuationen die autostimulatorische Schleife in vereinzelt Zellen der Population induziert wird. Des Weiteren konnte das Auftreten von Hysterese in diesem System in Form eines Zustandswechsels der Zellen zum Laktoseabbau bei geringer Induktorkonzentration beobachtet werden, wenn sie sich zuvor bereits in einem induzierten Zustand für die *lac*-Genexpression befunden haben (Ozbudak *et al.*, 2004). Dieses Phänomen stellt dabei eine Art „Gedächtnis“ an den Abbau von Laktose dar, der in Abwesenheit des Disaccharides aufrechterhalten wird. Die Hysterese scheint für die epigenetische Vererbung des Expressionzustandes verantwortlich zu sein und wurde auf die Abundanz und Stabilität der LacY-Permease zurückgeführt (Novick & Weiner, 1957; Cohn & Horibata, 1959a; 1959b; Ozbudak *et al.*, 2004; Marbach & Bettenbrock, 2012). Wenn *lacY* nur gering exprimiert ist, wird weniger Laktose in die Zelle transportiert, wodurch eine höhere Konzentration an Induktor für die Autostimulation erforderlich ist, als wenn LacY vermehrt in der bakteriellen Zellmembran vorliegt.

1.3.3. Der Diauxie-Effekt beruht auf einer *bet-hedging* Strategie koexistierender metabolischer Zustände

Mikroorganismen können mehrere Substrate als Kohlenstoff- und Energiequellen nutzen, wobei der energieeffizientere Zucker zuerst verstoffwechselt wird. Ist dieser nicht mehr verfügbar, wird in einer Phase des Wachstumsstillstandes der Metabolismus der Bakterien auf den Abbau der anderen Energiequelle umgestellt. Dieses Phänomen wurde als Diauxie bezeichnet und von Jacob Monod während des Wachstums von *E. coli* mit Glukose und Laktose in Form von zwei exponentiellen Wachstumsphasen beobachtet (Monod, 1949). Untersuchungen auf Einzelzellebene deckten auf, dass das diauxische Wachstum durch phänotypische Heterogenität innerhalb einer isogenen Population zu erklären ist. Während der Inkubation in Anwesenheit von Glukose und Cellobiose zeigte *Lactococcus lactis* eine bistabile *celB*-Genaktivität innerhalb einer Population, nachdem der energieeffiziente Nährstoff nicht mehr vorhanden war (Solopova *et al.*, 2014). Das Protein CelB ist die IIC-Komponente des beteiligten Phosphotransferasesystems und transportiert den Zucker über die bakterielle Membran ins Zytosol der Zelle. Der Anteil der Cellobiose-abbauenden Bakterien ist dabei von der Glukosekonzentration abhängig, die in der vorangegangenen Inkubation vorgeherrscht hat. Dieser Einfluss auf das diauxische Wachstum wurde bereits mehrmals nachgewiesen (Loomis & Magasanik, 1967; Robert *et al.*, 2010). In der Arbeit von Solopova *et al.* konnte jedoch der epigenetische Ursprung auf die Anzahl der CelB-Proteine in der Zellmembran zurückgeführt werden, die von der auf die Progenitorzellen einwirkenden Umgebung beeinflusst wurde (Solopova *et al.*, 2014). Werden die Zellen zuvor mit Cellobiose inkubiert ist die Anzahl an CelB-Proteinen in der Zellmembran hoch und diese nimmt nach Überführung in ein Medium mit Glukose bei fortwährender Zellteilung langsamer ab. In Abhängigkeit der Anzahl an CelB-Proteinen in der Zellmembran ist die Dauer des detektierbaren Wachstumsstillstandes der bakteriellen Kultur während der Diauxie zu erklären. Die Beteiligung des Proteins CcpA (*catabolite control protein A*), ein Regulator der Katabolitrepression, an der phänotypischen Heterogenität konnte ebenfalls bestätigt werden (Solopova *et al.*, 2012, 2014). Der metabolische Zustand der Zelle spielt bei der bistabilen *celB*-Genexpression ebenfalls eine Rolle. Wenn die Zelle einen schlechten metabolischen Zustand in Folge eines Nährstoffmangels aufweist, wird die stringente Antwort induziert und eine Stoffwechselumstellung inhibiert. Die Diauxie geht somit nicht auf eine Stoffwechselumstellung der gesamten Population zurück, sondern zeichnet sich durch zwei koexistierende Subpopulationen mit unterschiedlicher

Anpassungsstrategie aus, von denen nur eine zu einem fortwährenden Wachstum führt. Die Entscheidung der Einzelzelle wird von der Katabolitrepression und von der mit der metabolischen Fitness zusammenhängenden stringenten Antwort, sowie von den vergangenen Umgebungsbedingungen diktiert und somit auf zellulärer Ebene getroffen. Eine mathematische Modellierung zeigte, dass die Strategie der Risikostreuung durch Ausbildung verschiedener Phänotypen eine hohe durchschnittliche Teilungsrate mit geringerer Varianz mit sich bringt (Solopova *et al.*, 2014). Dieses Phänomen blieb im Verlauf der natürlichen Selektion erhalten, so dass Bakterien in der Lage sind, sich unter schnell verändernden Umgebungsbedingungen durchzusetzen.

1.3.4. Bistabilität trägt zur Erhöhung des pathogenen Potentials eines Bakteriums bei
Die phänotypische Heterogenität kann in einer Population als eine Form der Arbeitsteilung der individuellen Zelle mit gemeinnützigem Vorteil angesehen werden (Ackermann, 2015). Unter nährstofflimitierenden Bedingungen synthetisiert eine Subpopulation von *Bacillus subtilis* die Exoprotease Bacillopeptidase und Subtilisin E und versorgt die ganze Population damit. Die Kosten der Produktion dieser Exoenzyme für die ganze Population weist auf ein soziales Verhalten hin, von dem die ganze Population profitiert (Veening *et al.*, 2008b). Diese Form der sozialen Interaktion ist auch für Cyanobakterien beschrieben worden, in denen gewisse Zelltypen für die Stickstofffixierung oder die photosynthetische Kohlenstofffixierung zuständig sind (Reuven & Eldar, 2011). Die Bakterien können diese Form der Arbeitsteilung ebenfalls nutzen, um ihr pathogenes Potenzial im Verlauf einer Infektion zu erweitern.

Die Resistenz gegenüber Antibiotika spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenität eines Bakteriums. Eine nicht auf Mutationen basierende Resistenz wurde zuerst in *Staphylococcus aureus* belegt. Nach der Zugabe von Penicillin überlebte ein Teil der Population, der aber nach erneuter antibiotischer Behandlung wieder sensitiv auf das Antibiotikum reagierte (Bigger, 1944). Das Überleben der Bakterien während der Behandlung mit Antibiotika wird durch sogenannte „Persister“ gewährleistet, diese Zellen weisen ein reduziertes Wachstumsverhalten auf. Wurde die Antibiotikabehandlung unterbunden, wuchsen diese Zellen wieder und bildeten eine Population aus Antibiotika-sensitiven Erregern und Persisterzellen (Balaban *et al.*, 2004; Lewis, 2007). Die Untersuchung der Persistenz in *E. coli* belegte einen stochastischen Wechsel einer Subpopulation in einen Zustand, der von reduziertem Wachstum geprägt

ist, um gegen Antibiotika gewappnet zu sein, die z.B. wie Ampicillin in die bakterielle Zellwandsynthese von sich teilenden Zellen eingreifen (Keren *et al.*, 2004). Das reduzierte Wachstum wird über einen Toxin-Antitoxin-Komplex reguliert, wobei das Toxin HipA in der Zelle akkumuliert und die Makromolekülsynthese inhibiert. Das Antitoxin HipB hingegen reprimiert die Expression der *hipAB*-Gene und behindert dadurch die Funktion von HipA. Durch die Instabilität des Antitoxins kommt es zur stochastischen Abnahme und bei Unterschreitung eines Grenzwertes zur erneuten Akkumulation von HipA, wodurch der Wechsel in den Persistenz-Zustand ausgelöst wird. Die Fähigkeit zur Bistabilität ermöglicht die Resistenz der Erreger gegenüber Antibiotika (Dubnau & Losick, 2006; Graumann, 2006; Lewis, 2007; Rotem *et al.*, 2010).

Eine extreme Form der Arbeitsteilung wurde durch ein selbstdestruktives Verhalten von *S. enterica* serovar Typhimurium im Verlauf der Infektion nachgewiesen (Ackermann *et al.*, 2008). Durch die heterogene Genexpression des T3SS-1 teilt sich die Population in eine invasive bzw. selbstzerstörerische und eine nicht-invasive Subpopulation auf. Der invasive Phänotyp (T3SS-1⁺) löst im Wirt eine Entzündungsreaktion aus und durch die Immunreaktion werden die eindringenden Zellen und ein Teil der Kommensalfloora abgetötet. Die Besiedlung des Darms wird durch die intestinale Mikrobiota behindert und durch dieses selbstdestruktive Verhalten wird die Konkurrenz beseitigt und den nicht-invasiven Salmonellen (T3SS-1⁻) ermöglicht, in tiefere Gewebeschichten des Wirtes vorzudringen. Die nicht-invasiven Salmonellen profitieren von dem selbstdestruktiven Verhalten der anderen Subpopulation, die den Weg für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes ebnet (Ackermann *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2011; Diard *et al.*, 2013).

Diese ausgewählten Beispiele des Auftretens von phänotypischer Heterogenität belegen, dass es sich um ein weitverbreitetes Phänomen im bakteriellen Reich handelt und sich diese Strategie im Verlauf der natürlichen Selektion bewährt hat. Das Phänomen des *bet-hedging* basiert in einzelnen Zellen auf zellulären Entscheidungen, die unabhängig von genetischer Modifikationen reguliert werden. In einigen Beispielen konnten der Hysterese-Effekt bzw. der resultierende Phänotyp auf einen epigenetischen Ursprung zurückgeführt werden. Diese Anpassungsstrategie trägt dazu bei, die Überlebensfähigkeit der Bakterien und das Spektrum an besetzbaren Nischen zu erhöhen, um den Fortbestand der Art zu sichern (Thattai & van Oudenaarden, 2004).

1.4. Zielsetzung

Der Darm dient einer Vielzahl von Mikroorganismen als Habitat, wobei die ansässige kommensale Mikrobiota einen wichtigen Beitrag für unsere Gesundheit leistet, indem sie die Eintrittspforte für pathogene Bakterien verteidigt und dadurch schwerwiegende Infektionserkrankungen verhindert. Die kommensale Mikrobiota stellt neben den wirtseigenen Abwehrmechanismen eine natürliche Barriere für pathogene Erreger dar, wobei es den verschiedensten Pathogenen trotzdem gelingt, den Wirt erfolgreich und dauerhaft zu infizieren. Die Salmonellose stellt die zweithäufigste bakterielle Infektionserkrankung des Gastrointestinaltraktes dar und ist dadurch von großem Interesse für die gegenwärtige Forschung. Durch Koevolution der Erreger mit dem Wirt oder der kommensalen Darmflora haben sie Anpassungsstrategien entwickelt, um der Nährstofflimitierung durch die Mikrobiota oder des Wirtes zu überwinden und viele metabolische Nischen erfolgreich zu kolonisieren. Durch zusätzliche Stoffwechselwege können alternative Substrate als Kohlenstoff- oder Energiequelle verwendet und das Spektrum an besetzbaren Nischen innerhalb des Wirtes erweitert werden, wodurch die bakterielle Fitness des Erregers gesteigert wird. Das Lebensmittel-Pathogene *S. Typhimurium* ist in der Lage, die verschiedensten Substrate im Darm, wie 1,2-Propandiol, Ethanolamin und MI als Kohlenstoffquelle zu nutzen sich gegenüber der Konkurrenz einen Wachstumsvorteil zu verschaffen und dadurch in der Lage sind, ihr pathogenes Potential zu erweitern. Der Stoffwechselweg und die genetischen Determinanten für den Abbau von MI wurde bereits beschrieben und die Regulation in *Salmonella* weitestgehend aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die phänotypische Heterogenität von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium während des Wachstums mit MI als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht werden, um die Schlüsselparameter und die Regulationsmechanismen dieses Phänomen aufzudecken. Dazu wurden *Salmonella* Stämme mit chromosomalen Promotor- oder Genfusionen mit dem Reporter gen *gfp* hergestellt, um ausgewählte *iol*-Gene in ihrer Aktivität auf Einzelzellebene unter selektiven Bedingungen zu analysieren. Für diese Untersuchungen musste aufgrund der Laborrichtlinien der herabgestufte *S. Typhimurium* Stamm MvP101 als parenteral Stamm verwendet werden. Durch seine stabile Attenuierung aufgrund einer Mutation des Gen *sseD*, das für ein Transmembranprotein der T3SS der SPI-2 kodiert, wurde der *S. Typhimurium* Stamm in die Risikogruppe 1 eingeordnet (ZKBS, 1998). Während der

Aufnahme quantitativer Wachstumskurven der *Salmonella* Stämme, sollte eine zeitliche Analyse der *iol*-Genexpression während des Abbaus von MI mit Hilfe der Durchflusszytometrie dargestellt und die Heterogenität der Merkmalsausprägung innerhalb einer isogenen Population näher charakterisiert werden. Unter anderem sollte die Aktivität der Genexpression von *iolR* und die von ihm kontrollierten *iol*-Genen während des Wachstums mit MI dargelegt werden. Ebenso sollte der beobachtete Hysterese-Effekt in *Salmonella*, der in Form eines anhaltenden heterogenen Phänotyps in Abwesenheit des induzierenden Stimulus beobachtet wurde, auf Einzelzellebene verifiziert und dessen Entstehung und Stabilität beschrieben werden. Der Einsatz von Deletionsmutanten sollte zur Aufklärung des molekularen Ursprungs des Gedächtnisses der Salmonellen in Abwesenheit des induzierenden Stimulus beitragen. Des Weiteren sollte der Einfluss einer konstitutiven *iol*-Genexpression auf die bakterielle Fitness mit Hilfe eines kompetitiven Index unter nicht induzierenden Bedingungen dokumentiert und der Kosten-Nutzen-Faktor dieser *bet-hedging* Strategie beurteilt werden. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkungsweise des Repressors IolR auf die *iol*-Promotorregionen mittels qualitativer Gelmobilitätsstudien und quantitativer SPR-Spektroskopie examiniert werden. Die Zielstrukturen des Repressors innerhalb der Promotorregion sollte mittels Subklonierung identifiziert werden. Anhand der gewonnenen Daten der Bindungskinetik der Protein-DNS-Interaktion sollte ein Modell des molekularen Bindemechanismus aufgestellt werden, der die transkriptionale Repression der *iol*-Genexpression erklärt.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, DE), Merck (Darmstadt, DE), Roth (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich (München, DE) und Thermo Scientific (Waltham, USA) bezogen. Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn, DE) hergestellt und mit einem 0,22 µm Membranfilter (Millipore, Eschborn, DE) sterilfiltriert.

2.1. Mikrobiologische Methoden

2.1.1. Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten und hergestellten Bakterien sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten und hergestellten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Beschreibung/Genotyp	Referenz/Herkunft
<i>S. Typhimurium</i>		
14028	<i>S. Typhimurium</i> Wildtyp Stamm 14028	ATCC
14028 <i>dacB</i> ::Kan ^R	<i>S. Typhimurium</i> mit Austausch des Gens <i>dacB</i> mit einer Kanamycin-Resistenzkassette	Diese Arbeit
14028 <i>iolR</i> ::Kan ^R	<i>S. Typhimurium</i> mit Austausch des Gens <i>iolR</i> mit einer Kanamycin-Resistenzkassette	Diese Arbeit
14028 $\Delta iolR$	<i>S. Typhimurium</i> mit nicht-polarer <i>iolR</i> (STM4417) Deletion	Diese Arbeit
14028 $\Delta iolR$ - <i>iolH</i>	<i>S. Typhimurium</i> mit nicht-polarer <i>iolR</i> (STM4417) bis <i>iolH</i> (STM4436) Deletion	Diese Arbeit
14028 $\Delta iolT1$ - <i>iolH</i>	<i>S. Typhimurium</i> mit nicht-polarer <i>iolT1</i> (STM4418) bis <i>iolH</i> (STM4436) Deletion	Diese Arbeit
14028 $\Delta araA$	<i>S. Typhimurium</i> mit nicht-polarer <i>araA</i> (STM0102) Deletion	Diese Arbeit
MvP101	<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023 mit <i>sseD</i> Allelaustausch durch <i>aphT</i> -Kassette	Medina <i>et al.</i> , 1999
MvP101 $\Delta iolR$	MvP101 mit nicht-polarer <i>iolR</i> (STM4417) Deletion	Diese Arbeit

Fortsetzung von Tab. 2

<i>E. coli</i>		
TOP10	F ⁻ mcrA, D(mcr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7679, galU, galK, rpsL (Str ^R), endA1, nupG	Invitrogen, Karlsruhe, DE
S17.1 λ <i>pir</i>	Λ- <i>pir</i> lysogen of S17.1 (Tp ^R Sm ^R <i>thi pro hsdR</i> ⁻ M ⁺ <i>recA</i> RP4::2-Tc::Mu:Km Tn7	Simon <i>et al.</i> , 1983
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Studier <i>et al.</i> , 1990

2.1.2. Nährmedien und -zusätze

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien sind mit ihrer Zusammensetzung aufgeführt und die verwendeten Nährmedienzusätze sind aus Tab. 3 zu entnehmen. Die hergestellten Medien werden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei Festmedium mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt. Nachdem die Medien abgekühlt sind werden weitere Zusätze steril filtriert zugegeben.

<u>Luria-Bertanie (LB)-Medium</u> [Bertanie, 1951]	10 g/l 5 g/l 5 g/l ad 1000 ml MilliQ, pH = 7,5 (mit NaOH)	Trypton Hefeextrakt NaCl
<u>Minimal-Medium (MM)</u> [Sambrook & Russell, 2001]	800 ml 100 ml 2 ml 0,1 ml 100 ml	MilliQ 10 × M9-Salze 1 M MgSO ₄ 1 M CaCl ₂ 10 % (w/v) <i>myo</i> -Inositol 20 % (w/v) Glukose
<u>10 × M9-Salze</u> [Sambrook & Russell, 2001]	70 g/l 30 g/l 5 g/l 10 g/l	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl NH ₄ Cl

Tab. 3: Verwendete Nährmedienzusätze und ihre eingesetzte Konzentration.

Zusätze	Lösungsmittel	Konzentration	Hersteller
L(+)-Arabinose	MilliQ	1 mmol/l	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
IPTG	MilliQ	0,1 mmol/l	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Chloramphenicol	100 % Ethanol	20 µg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Tetrazyklin-Hydrochlorid	70 % Ethanol	12 µg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ampicillin Natriumsalz	MilliQ	150 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Streptomycin Sulfate	MilliQ	100 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kanamycinsulfat	MilliQ	50 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.1.3. Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

Für die Kultivierung von Bakterien wird ein Reinigungsausstrich angefertigt, von dem eine Einzelkolonie in 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika- oder anderen Nährmedienzusätzen versetzt und unter aeroben Bedingungen bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert wird. Von dieser über-Nacht-Kultur (ÜNK) wird für eine langfristige Lagerung der Bakterienstämme 900 µl mit der gleichen Menge einer sterilfiltrierten 50 % (v/v) Glycerin/LB-Lösung in einem Cryo-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, DE) vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.2. Molekulargenetische Methoden

2.2.1. Plasmide und Vektoren

Die in Tab. 4 aufgeführten Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Plasmide und erzeugten Vektoren.

Plasmide	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pKD4	<i>pir</i> -abhängig, FRT-Erkennungsschnittstellen Kan ^R	CGSC, Yale, USA (Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Lambda-Red-Helfer-Plasmid; <i>repA101ts</i> , <i>oriR101</i> , Amp ^R	CGSC, Yale, USA (Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	FLP-Rekombinase-Plasmid; <i>repAtr</i> , <i>clts</i> , λ <i>pir</i> , FLP, <i>agp</i> , Amp ^R , Cm ^R	CGSC, Yale, USA (Datsenko & Wanner, 2000)
pET28b(+)	Expressionsvektor; T7 Promotor, pBR322 <i>origin</i> , N- und C-terminaler Polyhistidin-Anhang, Kan ^R	Novagen, Madison, USA
pET28b- <i>iolR</i> _{6xHis}	Klonierung von <i>iolR</i> in den pET28b-Vektor (mit <i>XhoI</i> und <i>NcoI</i>); Kan ^R	Kröger & Fuchs, 2009
pET28b- <i>reiD</i> _{6xHis}	Klonierung von <i>reiD</i> in den pET28b-Vektor (mit <i>XhoI</i> und <i>NcoI</i>); Kan ^R	Diese Arbeit
pBR322	Klonierungsvektor; <i>oriV</i> , Amp ^R , Tet ^R	Bolivar <i>et al.</i> , 1977
pBR- <i>iolR</i>	Klonierung von <i>iolR</i> mit Promotor-Bereich (~300 bp) in pBR322 (mit <i>EcoRI</i> und <i>Sall</i>); Amp ^R	Kröger & Fuchs, 2009
pBR- <i>reiD</i>	Klonierung von <i>reiD</i> mit Promotor-Bereich (~300 bp) in pBR322 (mit <i>PstI</i>); Tet ^R	Rothhardt <i>et al.</i> , 2014
pTARA	pBAD33-Derivat; T7 RNA-Polymerase, Cm ^R	Addgene, Cambridge, USA (Wycuff & Matthews 2000)
pBAD-Myc/HisC	Expressionsvektor; Promotor des <i>araBAD</i> Operon und <i>araC</i> -Regulator, Amp ^R	Invitrogen, Kalifornien, USA
pBAD-Myc/HisC- <i>reiD</i>	Expressionsvektor; <i>reiD</i> in pBAD-Myc/His C (mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i>), Amp ^R	Rothhardt <i>et al.</i> , 2014
pUTs- <i>gfp</i> (Cm ^R)	Suizidvektor, Austausch von <i>luxCDABE</i> mit <i>gfp</i> aus pPROBE-NT in Transposase-negatives Derivat von pUT mini-Tn5 <i>luxCDABE</i> Km2, <i>mobRP4</i> , <i>ori R6K</i> , <i>gfp</i> , Cm ^R	Starke <i>et al.</i> , 2013
pUTs-P _{<i>iolX</i>} :: <i>gfp</i>	Klonierung der <i>iol</i> -Promotor-Bereiche (~500 bp) von <i>iolR</i> , <i>iolT1</i> , <i>reiD</i> , <i>iolE</i> und <i>iolC</i> vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit

Fortsetzung von Tab. 4

pUTs-P _{xxxX} :: <i>gfp</i>	Klonierung der Promotor-Bereiche (~500 bp) von <i>argS</i> und <i>rpsM</i> vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit
pUTs- <i>iolX</i> :: <i>gfp</i>	Klonierung der letzten 500 bp von <i>iolR</i> , <i>reiD</i> und <i>iolE</i> vor <i>gfp</i> (mit <i>KpnI</i>)	Diese Arbeit

2.2.2. Verwendung von Nukleinsäuren und deren Anwendung

Durch die folgenden molekulargenetischen Methoden wurde die Desribonukleinsäure (DNS) aus den Bakterien isoliert, modifiziert und dadurch für verschiedene Anwendungen nutzbar gemacht.

2.2.2.1. Präparation der chromosomalen DNS aus *Salmonella*

Aus einer ÜNK (s. 2.1.3) werden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellbestandteile für 5 Minuten bei 13.200 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet in 400 µl Lyse-Puffer (100 mM Tris pH 8,0, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl) resuspendiert. Anschließend werden 100 µl Lysozym (Amersham Pharmacia Biotech, Nümbrecht, DE) mit einer Konzentration von 10 mg/ml zugegeben und der Reaktionsansatz für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer 10-prozentigen SDS-Lösung und 5 µl Proteinase K (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) wird der Ansatz über Nacht bei 55 °C inkubiert. Zur Fällung der DNS werden 500 µl Isopropanol zugegeben und die ausgefallene Nukleinsäure mit einer gelben Spitze entnommen und jeweils in 96-prozentigen bzw. 70-prozentigen Ethanol (J.T. Baker, München, DE) gewaschen. Anschließend wird die DNS in einem Eppendorfgefäß bei 37 °C im Heizblock bei 55 °C über Nacht luftgetrocknet. Zuletzt erfolgt das Lösen der DNS mit 150 µl MilliQ versetzt mit 10 mg/ml RNase A aus Rinderpankreas (Merck KGaA, Darmstadt, DE).

2.2.2.2. Isolation und Aufreinigung von Plasmiden

Durch alkalische Lyse und chromatographischer Aufreinigung der plasmidialen DNS über einen Anionenaustauschersäule können Plasmide aus Bakterienzellen isoliert und für weitere Versuche genutzt werden. Ausgehend von einer ÜNK erfolgt die Plasmid-Präparation nach Herstellerangaben mit den Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Präparationsreagenzien (Stratec Molecular, Berlin, DE). Abweichend wird mit 100 µl

55 °C warmen MilliQ und nach fünfminütiger Inkubationszeit die plasmidiale DNS von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Konzentration im NanoDrop (s. 2.2.2.3) bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäure zu bestimmen, wird der NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Wilmington, USA) herangezogen. Durch die spektrophotometrische Bestimmung wird die Extinktion bei 260 nm (Absorptionsbereich von Nukleinsäure), bei 230 nm (Absorptionsbereich von Salzen) und bei 280 nm (Absorptionsbereich von Proteinen) gemessen. Die Angaben zur Reinheit der Nukleinsäure ergeben sich durch die Quotienten der Extinktionswerte Ex_{260}/Ex_{280} für Proteinverunreinigungen und Ex_{260}/Ex_{230} für Kontaminationen durch Zucker, Salze oder organische Lösungsmittel. Für die Bestimmung werden 1 µl MilliQ als Referenz und anschließend 1 µl DNS oder 1 µl Plasmid aufgetragen.

Die Reinheit und Konzentration von PCR-Fragmenten kann ebenfalls durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.4) erfolgen. Nachdem die Banden mittels UV-Transillumination sichtbar gemacht werden, kann anhand der Anzahl der sichtbaren DNS-Fragmente spezifischer Länge auf den Verunreinigungsgrad und durch densitometrische Auswertung der Bandenintensität im Vergleich zum eingesetzten Längenmarker auf die Konzentration der DNS geschlossen werden.

2.2.2.4. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Für einen Restriktionsverdau werden 1 µg aufgereinigte DNS mit 1 µl *KpnI* (10 U/µl) und 1 × *KpnI*-Puffer mit BSA (Fermentas, Erlangen, DE) nach Herstellerangaben angesetzt. Der Verdau wird bei 37 °C im Heizblock für 3 Stunden inkubiert und anschließend wird das Restriktionsenzym bei 80 °C für 20 Minuten inaktiviert. Die verdaute Nukleinsäure wird mit dem MSB[®] Spin PCRapace aufgereinigt (s. 2.2.3.2). Nach dem Verdau von Plasmiden werden diese mittels „Schwimmfilterdialyse“ entsalzen, damit die entfernten Ionen die nachfolgenden Anwendungen nicht stören. Dazu wird der gesamte Ansatz auf einen MF-Millipore[™]-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,025 µm pipettiert und dieser in einer Petrischale mit 5 ml MilliQ gegeben. Nach 30 Minuten wird das entsalzte Plasmid abpipettiert.

2.2.2.5. Dephosphorylierung von Nukleinsäuren

Der Reaktionsansatz besteht aus 250 ng/ μ l zuvor verdautem Plasmid, einfacher thermosensitive Alkine Phosphatase FastAP (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, DE) und 1 \times Alkine Phosphatase Puffer. Dieser Ansatz wird für 10 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert und im Anschluss findet eine Hitzedeaktivierung des Enzyms für 5 Minuten bei 75 °C statt.

2.2.2.6. Verknüpfung von Nukleinsäuren durch Ligation

Durch den Einsatz von Ligasen ist es möglich, eine freie 5'-Phosphat-Gruppe eines DNS-Doppelstranges mit der freien 3'-OH-Gruppe eines anderen kovalent zu verbinden. Dazu werden mehrere Ligations- und Kontrollansätze benötigt. Das zuvor gespaltene Plasmid wird im Verhältnis 1:1, 1:2 bzw. 1:5 mit dem ebenfalls verdauten DNS-Fragment in einem PCR-Reaktionsgefäße zusammengeführt. Den Ansätzen werden 1 U/ μ l T4 Ligase, 1 \times Ligase-Puffer (Invitrogen, Darmstadt, DE) zugesetzt und mit MilliQ auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Die Kontrollansätze enthalten keine DNS und einer wird ohne Ligasezusatz mitgeführt, um die Religationsrate des Vektors beurteilen zu können. Die Ligationsansätze werden bei RT für 1 Stunde oder bei 16 °C über Nacht ligiert.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung von DNS-Fragmenten bedient man sich der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Durch den Einsatz einer hitzestabilen DNS-Polymerase und zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotiden können DNS-Abschnitte amplifiziert und durch gezielte Veränderung modifiziert werden.

2.2.3.1. Durchführung einer Standard-PCR

Ein PCR-Standardansatz mit 50 μ l Gesamtvolumen besteht aus 1 \times *Taq* Buffer (Fermentas, Erlangen, DE), 100 mM dNTP Mix (Fermentas, Erlangen, DE), 25 mM MgCl₂, 0,5 μ l *Taq* DNS-Polymerase (5 U/ μ l), jeweils 1 μ l Oligonukleotid (10 pmol/ μ l) und sterilem MilliQ. Als DNS-Matrize kann chromosomale DNS (50 – 100 ng), plasmidiale DNS (20 – 50 ng) oder 6 μ l einer in MilliQ gelösten Einzelkolonie verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 21 im Anhang aufgelistet und werden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg, DE) oder Sigma-Aldrich (München, DE) bezogen. Die Oligonukleotide werden in MilliQ gelöst und auf

eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Die Amplifikation von DNS-Abschnitten erfolgt in drei Schritten: dem Aufschmelzen der doppelsträngigen DNS durch Hitzeeinwirkung (Denaturierung), der spezifischen Anlagerung der Oligonukleotide an die DNS-Matrize (Hybridisierung) und deren Verlängerung in 5'-3'-Richtung durch die DNS-Polymerase (Elongation). Das Programm einer Standard PCR folgt unter in Tab. 5 aufgeführten Bedingungen.

Tab. 5: Allgemeines Programm für die Durchführung einer Standard-PCR.

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95 °C	5 Minuten
Denaturierung		95 °C	10 Sekunden
Hybridisierung	35 Zyklen	T_m der Oligonukleotide	30 Sekunden
Elongation		72 °C	1 Minute/1.000 bp
Finale Elongation	1 Zyklus	72 °C	8 Minuten

Die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide wird mit dem Internetprogramm IDT Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) von Integrated DNA Technologies bestimmt, dem folgende Faustregel zur Berechnung zugrunde liegt:

$$T_m = 2^\circ\text{C} * (\text{Adenin oder Thymin}) + 4^\circ\text{C} * (\text{Cytosin oder Guanin})$$

Die gewählte Hybridisierungstemperatur entspricht der des Oligonukleotides mit der niedrigeren Schmelztemperatur. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Bereiches und auch limitiert durch die Leistung der *Taq* DNS-Polymerase von 1.000 bp pro Minute. Die PCR-Produkte werden anschließend auf Länge und Reinheit mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.4) überprüft.

2.2.3.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Für weitere Durchführungen wurden die Amplifikate aus der PCR entweder einzeln oder zusammen bei einem Mehrfachansatz der Standard-PCR mit dem MSB[®]Spin PCRapace (Stratec Molecular, Berlin, DE) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers, jedoch wird die Elution mit 50 µl 55 °C erwärmten MilliQ durchgeführt. Die Konzentration der Nukleinsäure wird im NanoDrop ND-1000 (s. 2.2.2.3) bestimmt.

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Separation von DNS-Molekülen wird eine Gelelektrophorese in horizontalen Gelelektrophoresekammern durchgeführt. Die DNS trägt durch ihre Phosphatreste eine negative Ladung und kann dadurch in einer ionischen Pufferlösung unter Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach in einer Agarose-Gelmatrix aufgetrennt werden. Dazu wird ein 1-prozentige (w/v) Agarosegel aus Seakem[®] LE Agarose (Biowhittaker Molecular Applications, Maine, USA) in 1 × Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) hergestellt.

<u>50 × TAE-Puffer</u>	2 M	Tris Base
	50 mM	EDTA
	pH 8,0 eingestellt konzentrierter Essigsäure	

Es werden jeweils 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl 6 × Loading Dye (Fermentas, Erlangen, DE) versetzt, in die Taschen des auspolymerisierten Agarosegels pipettiert und 5 µl 0,5 µg/µl GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, DE) als Standard mit auf das Agarosegel aufgetragen. Bei einer maximalen Stromstärke von 100 mA werden die DNS-Fragmente für etwa 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel in einer GelRed-Färbelösung (50 µl GelRed Stain, BIOTIUM Hayward, Kalifornien, USA) mit 0,1 M NaCl für 20 Minuten inkubiert, wobei sich der interkalierende Farbstoff an die DNS anlagert. Die Dokumentation erfolgt mittels UV-Transillumination im UVsolo TS von Biometra (Götting, DE).

2.2.5. Konstruktion von *Salmonella* Stämmen

Durch die Konstruktion verschiedener Mutantenstämme, die von Deletionen ganzer Gene oder das Einfügen von Reportergenen reichen, können u.A. die Funktion von Genen im regulatorischen Netzwerk aufgedeckt oder Stoffwechselforgänge nachvollzogen werden. Die folgenden verwendeten Anwendungen auf das bakterielle Genom stellen analytische Hilfsmittel dar, die zur näheren Aufklärung des regulatorischen Netzwerkes innerhalb der bakteriellen Genetik dienen.

2.2.5.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Von einer ÜNK werden 5 ml entnommen, in 100 ml LB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Die bakterielle Kultur wird für 15 Minuten auf Eis gestellt und alle darauffolgenden Schritte werden auf Eis bzw. in einer auf 4 °C gekühlten

Zentrifuge und unter Verwendung vorgekühlter Lösungen und Materialien durchgeführt. Die gekühlte Kultur wird aufgeteilt und bei 6.500 Upm für 7 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in insgesamt 50 ml einer 5-prozentigen Glycerinlösung resuspendiert und die Suspension wieder zentrifugiert. Dieser Schritt wird mehrfach wiederholt, jedoch wird das Resuspensionsvolumen der 5-prozentigen Glycerinlösung auf 25 ml bzw. anschließend auf 2,5 ml reduziert. Das Pellet wird im letzten Resuspensionsschritt in 0,5 ml einer 10-prozentigen Glycerinlösung aufgenommen und à 40 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert. Diese Aliquots werden bei -80 °C weggefroren. Um die Vitalität und Sensitivität der elektrokompetenten Zellen vor jeder Elektroporation zu testen, werden die Zellen ohne weitere Behandlung auf LB-Platten ohne bzw. mit den jeweiligen Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5.2. Einschleusen von Nukleinsäuren durch Elektroporation

Das Einbringen von Fremd-DNS in eine Bakterienzelle erfolgt unter Verwendung eines Elektroimpulses, der zu einer kurzfristigen Permeabilitätserhöhung in der bakteriellen Zellmembran führt und die Zellmembran durchlässig für DNS-Moleküle macht. Ein Aliquot der zuvor hergestellten elektrokompetenten Zellen (s. 2.2.5.1) wird zunächst auf Eis aufgetaut und mit 40 µl gekühltem MilliQ und 4 – 10 µl Plasmid bzw. DNS-Fragment versetzt. Der Reaktionsansatz wird in eine gekühlte 0,2 mm Elektroporationsküvette pipettiert und einem Spannungsimpuls von 2,5 kV ausgesetzt. Parallel wird eine Kontrolle ohne Plasmid bzw. DNS mitgeführt, um die Rate einer eventuell auftretenden Spontanresistenz zu bestimmen. Sofort im Anschluss werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und für 45 Minuten bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Die Verdünnungsstufen 10^0 und 10^{-1} der transformierten Zellen werden auf den entsprechenden Selektivmedien ausplattiert. Sind nach 24 Stunden keine Kolonien zu erkennen, wird der komplette Transformationsansatz bei 4.000 UpM für 5 Minuten abzentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien werden mehrfach auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen als Reinigungsausstrich ausplattiert, um eine klonale bakterielle Reinkultur zu erhalten.

<u>SOB-Medium</u>	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	0,5 g/l	NaCl
	0,2 g/l	KCl
	autoklaviert & steril zugeben	
	5 ml/l	1 M MgSO ₄
	5 ml/l	1 M MgCl ₂
<u>SOC-Medium</u>	960 ml	SOB-Medium
	20 ml/l	1 M MgSO ₄
	20 ml/l	1 M Glukose

2.2.5.3. Anfertigung der *Salmonella* Reporterstämme mittels Konjugation

Bei einer Konjugation werden Plasmide von einem Spenderorganismus (Akzeptor) zu einem Empfängerorganismus (Donor) übertragen. Dieser Mechanismus ermöglicht Plasmide in einen ausgewählten Bakterienstamm zu übertragen. Die Konjugation wird entweder auf LB-Agarplatten (Plattenkonjugation) oder in LB-Medium (Flüssigkonjugation) durchgeführt.

Bei der Plattenkonjugation werden von einem Reinigungsausstrich des Donors und des Akzeptors Zellmaterial entnommen und dieses in einem Verhältnis 1:3 auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotika miteinander vermischt. Die LB-Agarplatte wird für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach die Zellmasse in 1 ml LB-Medium überführt und verschiedene Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit Antibiotikazusatz ausplattiert. Die Flüssigkonjugation hingegen wird ausgehend von ÜNKs der jeweiligen Bakterienstämme angesetzt. Dabei werden 3 ml Donor und 2 ml Akzeptor in jeweils 50 ml vorgewärmtem LB-Medium mit Antibiotikazusatz inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Es werden 2,5 ml des Donors und 2,5 ml des Akzeptors in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben, für 5 Minuten bei 7.500 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in 10 ml LB-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen und auf einem MFTM-Membranfilter (Porengröße 0,43 µm) pipettiert, welcher auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum platziert ist. Nachdem die Flüssigkeit ausgetrocknet ist, wird die Agarplatte für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden danach in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁰ und 10⁻¹ auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikazusatz ausplattiert. Anschließend wird

eine PCR zur Kontrolle einer erfolgreichen Konjugation in den Empfängerorganismus durchgeführt.

2.2.5.4. Durchführung einer Deletionsmutagenese

Die Deletion von Genen dient der gezielten Veränderung des Erbgutes, um die Funktion des Gens im regulatorischen Netzwerk des Bakteriums aufzudecken. Die angewendete Deletionsmutagenese wurde nach Datsenko und Wanner durchgeführt (Datsenko & Wanner, 2000), jedoch um den Zwischenschritt der Phagentransduktion erweitert. Die Transduktion dient dazu, ungewünschte sekundäre chromosomale Modifikationen (Murphy & Campellone, 2003; Poteete *et al.*, 2004; Hobman *et al.*, 2007) durch die λ -Red-Rekombinase des pKD46 Plasmid zu verhindern.

Zunächst werden elektrokompetente Salmonellen mit dem Plasmid pDK46 transformiert und bei einer permissiven Temperatur von 30 °C passagiert. Von einem Kandidaten werden elektrokompetente Zellen hergestellt (s. 2.2.5.1), welche im nächsten Schritt mit dem linearen Fragment zur Deletion transformiert werden. Für die Amplifikation des linearen DNS-Fragmentes werden die Oligonukleotide aus Tab. 19 für die Standard-PCR (s. 2.2.3.1) herangezogen. Das Fragment besteht aus den Randbereichen des zu deletierenden Gens und der vollständigen Kanamycin-Resistenzkassette des pKD4 Plasmides. Das DNS-Fragment wird durch homologe Rekombination der komplementären Randbereiche des zu deletierenden Gens eingebaut. Abweichend wurde nach der Überführung in SOC-Medium der Ansatz bei einer nicht permissiven Temperatur für 60 Minuten inkubiert. Zur Selektion werden die Transformanten auf selektive Nährböden bei nicht permissiver Temperatur inkubiert, wodurch das Plasmid pKD46 nicht mehr vervielfältigt und aus der Zelle entfernt wird. Anschließend erfolgt die Phagentransduktion mit der Übertragung der Kanamycin-Resistenzkassette in den wildtypischen *Salmonella* Hintergrund. Hierfür wird zunächst ein Phagenlysat hergestellt, welches Phagen enthält, die den chromosomalen Bereich mit eingebauter Kanamycin-Resistenzkassette in ihren Kapsiden tragen. Eine ÜNK der Bakterien mit zu transduzierender Antibiotika-Resistenzkassette wird angefertigt. Am nächsten Tag wird eine 1:100 Verdünnung der ÜNK in 10 ml LB-Medium mit Kanamycinzusatz angefertigt und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,15 - 0,2 inkubiert. Der Ansatz wird in ein 5 ml Reagenzglas überführt und mit 5 μ l P22(WT) Stocklösung versetzt. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei 37 °C für 6 Stunden. Anschließend wird die Suspension in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für weitere 2 Stunden

bei 4 °C inkubiert. Die Bakterien werden bei 7000 UpM, 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand mit den entstandenen Phagen sterilfiltriert und bis zu seiner weiteren Verwendung bei 5 °C gelagert. Von dem parenteral Stamm MvP101 wird eine ÜNK hergestellt, von der am nächsten Tag 200 µl mit 10 µl Phagenlysat vermischt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert wird. Anschließend wird der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten mit Kanamycinzusatz ausplattiert. Als Negativkontrolle werden 100 µl des paranteralen Stammes und 50 µl des Phagenlysates jeweils auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert, um auszuschließen, dass der Wildtypstamm bereits eine intrinsische Kanamycinresistenz besitzt und die Phagenlysate nicht mit Bakterien verunreinigt sind. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsenen Kolonien werden auf selektive Indikator-Platten ausgestrichen und weiter inkubiert. Diese Indikatorplatten dienen der Identifizierung von phagenfreien Einzelkolonien. Die enthaltenen Farbindikatoren Alizarinrot und Anilinblau färben bei niedrigen pH-Wert die Kolonien grün, was als Anzeichen für vermehrter Zellyse infolge des lytischen Zyklus der Viren dient. Diese Kolonien sind noch von Phagen befallen, daher werden nur weiße Kolonien weiter passagiert. Zuletzt wird ein Überkreuzausstrich als Kontrolle durchgeführt, um die Konstrukte einem Sensitivitätstest gegenüber dem P22(WT) Phagen zu unterziehen. Diese Untersuchung dient zur Kontrolle, ob die Zellen sich von den Phagen befreit haben. Dazu wird das Phagenlysat mittig auf einer Indikatorplatte in vertikaler Richtung ausgestrichen und die Kandidaten horizontal von einer zur anderen Seite der Agarplatte durch die eingetrocknete Phagensuspension ausgestrichen. Ist ein Bakterium noch mit einem temperenten Phagen infiziert, ist dieses gegen eine erneute Infektion resistent, wodurch die Kolonien weiß erscheinen. Als Positivkontrolle wird der wildtypische bzw. parenterale Stamm verwendet und als Negativkontrolle eine grüne Kolonie von vorherigen Passagen auf den Indikatorplatten. Eine Kolonie-PCR von einzelnen Kandidaten dient der Überprüfung der Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette an der richtigen Position im bakteriellen Chromosom.

<u>Indikatorplatten</u>	8 g/l	Trypton
[Maloy <i>et al.</i> , 1990]	1 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	15 g	Agar
	21 ml	40 % (w/v) Glucose
	25 ml	2,5 % (w/v) Alzaringelb
	3,3 ml	2 % (w/v) Anilinblau

Von einem phagenfreien Kandidaten werden elektrokompetente Zellen angefertigt, mit ca. 200 ng des pCP20-Plasmides im Ansatz transformiert und für 60 Minuten bei nicht permissiver Temperatur in SOC-Medium schütteln inkubiert. Die Transformanden werden auf selektiven Nährböden bei nicht permissiver Temperatur passagiert. Der Verlust des pCP20 Plasmides wird durch das Eintreten einer Sensitivität gegenüber Chloramphenicol bestätigt. Zum Schluss wird mittels Sequenzierung die vollständige Deletion des gewünschten Gens überprüft.

2.2.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS-Fragmenten dient der Überprüfung der Nukleotidabfolge und der richtigen Lokalisation im bakteriellen Chromosom. Es werden nur zuvor aufgereinigte PCR-Amplifikate oder Plasmide, die auf eine bestimmte Konzentration eingestellt werden, sequenziert. Zunächst wird die DNS-Konzentration mittels NanoDrop[®] bestimmt und auf 60 - 100 ng/μl für PCR-Amplifikate und 20 - 50 ng/μl für Plasmide eingestellt. Es werden 20 μl der Oligonukleotide, die den Bereich auf dem bakteriellen Chromosom flankieren mit einer Konzentration von 10 pmol/μl mit an GATC Biotech AG (Konstanz, DE) verschickt. Die Qualität der Sequenzierung wird mittels FinchTV (Geospiza Inc, Washington, USA) beurteilt und der anschließende Sequenzvergleich erfolgt durch BlastN bei dem nationalen Zentrum für Biotechnologieinformation (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.2.7. Kompetitiver Wachstumsindex

Um die Dominanz einzelner *Salmonella* Stämme zu beurteilen, werden in einem *in vitro* Experiment zwei unterschiedliche *S. Typhimurium* Stämmen zusammen inkubiert und im Langzeitversuch die einwirkende Selektion der Bakterien verfolgt. Durch den Einsatz von Deletionsmutanten mit einer integrierten Kanamycin-Resistenzkassette erfolgt eine selektive Beurteilung der Fitness gegenüber einem anderen Bakterienstamm. Dazu wird jeweils ein Kanamycin-sensitiver und ein Kanamycin-resistente Bakterienstamm eingesetzt. Die Stämme werden bei 37 °C und 150 Upm separat in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 inkubiert und miteinander in frischem LB-Medium vermischt. Bei einem kompetitiven Index in MM mit MI werden beide Stämme jeweils von einer MI-ÜNK 1:500 in 50 ml MM mit MI inokuliert. Um die Zellzahl der jeweiligen Stämme zu bestimmen, werden die Kulturen auf LB-Agarplatten ohne Antibiotikazugabe in dreifacher Ausführung ausplattiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien von drei

geeigneten Verdünnungsstufen ausgezählt und die Koloniebildende Einheit (KBE/ml) als gewichtetes Mittel berechnet (s. Formel 1). Daraus wird die Zellzahl des Inokulates für die einzelnen Stämme in der initialen Passage des Index bestimmt. Der kompetitive Index wird stehend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend verschiedene Verdünnungsstufen mit drei technischen Replikaten auf LB-Agarplatten mit und ohne Kanamycinzusatz ausplattiert, um die Gesamtzellzahl und die Anzahl der Kanamycin-resistenten (Kan^R) Bakterien zu ermitteln. In Formel 2 wird durch die Differenz der Gesamtzellzahl und der KBE/ml aus der Auszählung der LB-Agarplatten mit Kanamycinzusatz die Anzahl der Kanamycin-sensitiven Bakterien (Kan^S) berechnet. Im weiteren Verlauf der Durchführung werden 100 µl des kompetitiven Index in frisches Medium überführt und erneut unter gleichen Bedingungen inkubiert. Insgesamt werden drei Passagen analysiert, um die Selektion der einzelnen Bakterienstämme über mehrere Generationen verfolgen zu können. In einem weiteren Experiment werden die Stämme kreuzmarkiert für den Index eingesetzt, d.h. jeder Stamm wird in Hinsicht auf den Wachstumsnachteil durch die Ausbildung der Resistenz im Index untersucht, wodurch eine reduzierte Fitness auf Grund der Ausbildung der Antibiotikaresistenz ausgeschlossen wird.

$$KBE/ml = \frac{\sum n}{1fa+0,1fb+0,01fc} \times 10^x \times V_f \quad \text{(Formel 1)}$$

$\sum n$	=	Summe aller Kolonien auf den ausgezählten Platten
fa	=	Zahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe
fb	=	Zahl der Platten aus der nächst höheren Verdünnungsstufe
fc	=	Zahl der Platten aus der höchsten Verdünnungsstufe
10^x	=	höchste Verdünnungsstufe, die ausgezählt wurde
V_f	=	Verdünnungsfaktor durch das ausplattierte Volumen

$$\bar{x}_{kan^S} = \bar{x}_{gew1} - \bar{x}_{gew2} \quad \text{(Formel 2)}$$

\bar{x}_{gew1}	=	gewichtete Mittel der KBE/ml auf Agarplatten ohne Antibiotikazusatz
\bar{x}_{gew2}	=	gewichtete Mittel der KBE/ml auf Agarplatten mit Kanamycinzusatz

Des Weiteren wird vor der Inokulation der beiden Bakterienstämme in den kompetitiven Index die Kultur der Kan^R-Mutante zusätzlich auf LB-Agarplatten mit Kanamycinzusatz ausplattiert, um den Wachstumsnachteil infolge der Antibiotikaresistenz zu beurteilen.

Die Berechnung dieses Wachstumsnachteils (WN) der Kan^R-Mutante ist in Formel 3 aufgeführt.

$$WN = 100 - \left(\frac{100}{\bar{x}_{gew1}} \times \bar{x}_{gew2} \right) \quad \text{(Formel 3)}$$

Der sich aus Formel 3 ergebende prozentuale Wert zeigt das Ausmaß des Wachstumsnachteils der Kan^R-Mutante durch die Ausbildung der Resistenz gegen Kanamycin.

2.2.8. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*flow cytometry*, FC) ermöglicht die Betrachtung einer bakteriellen Population auf Einzelzellebene, in dem die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Das Licht des Laserstrahles wird dabei gebrochen und dieses Streulichtes wird von verschiedenen Detektoren gemessen. Anhand der Signale werden verschiedene Parameter betrachtet z.B. die Zellbeschaffenheit in Form von Größe und Granularität oder die Fluoreszenz durch die Untersuchung von Mutanten mit Reportergenen. Diese Technologie ermöglicht es, die Funktion eines Gens innerhalb einer ganzen bakteriellen Population im Durchflussverfahren zu beobachten. Für die FC-Analysen werden Proben während des Wachstums der Salmonellen genommen und parallel die optische Dichte gemessen, um das Wachstumsverhalten zu verfolgen. Zunächst werden ÜNKs der MvP101 Stämme in LB- oder M9-Medium mit 1 % (v/v) MI bzw. 0,5 % (v/v) Glucose angefertigt, die bei 37 °C schütteln oder stehend inkubiert wurden. Am nächsten Tag wird die OD₆₀₀ der Kultur gemessen, mit dem jeweiligen Medium auf eine optische Dichte von $0,8 \pm 0,1$ eingestellt und 1:500 in frisches Medium inokuliert. Die OD₆₀₀ wird stündlich gemessen, zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums der bakteriellen Kultur 100 µl entnommen und in 900 µl 1 × PBS-Puffer mit 2 % (v/v) Formaldehyd verdünnt, um das grünfluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, Gfp) zu stabilisieren (Bongaerts *et al.*, 2002). Bei höherer OD₆₀₀ wird eine Verdünnungsreihe angefertigt, um die Durchflusszelle des FC-Gerätes nicht mit zu vielen Bakterienzellen zu verstopfen. Zu jedem DC-Experiment werden parallel Proben von Wachstumskurven der Kontrollen in Form von bakterieller Autofluoreszenz (MvP101) und konstitutive Genexpression (MvP101 *P_{rpsM}::gfp*) mitgeführt. Die Proben werden für maximal 48 Stunden bei 4 °C gelagert und anschließend im FACS Aria II (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)

vermessen. Die Anregung der Probe erfolgt bei 488 nm und die Emission der Fluoreszenz wurde bei 515 – 545 nm detektiert. Nach der Messung von insgesamt 10.000 Ereignissen wurde eine Dublettendiskriminierung mittels *AreaScaling*-Funktion des FACS Aria II durchgeführt. Durch diese Funktion wird die Pulsfläche mit der -höhe für die Partikelgröße angeglichen und alle Zellen gleicher Größe weisen ähnliche Werte für die beiden Parameter auf. Alle Einzelzellen ordnen sich auf einer Diagonalen in einem Punktdiagramm an, in dem die Pulshöhe gegen die Impulsfläche aufgetragen sind. Die einzelnen Zellen auf dieser Diagonalen werden durch ein Gate für die Untersuchung des Fluorophores ausgewählt. Die Fluoreszenzintensität (FI)-Werte des Gfp-Proteins m.H. der Flowing Software (V 2.5.1) (Turku Centre for Biotechnology, Turku, Finnland) aus den FCS-Datenformat extrahiert und die Datenvisualisierung mit der Software SigmaPlot Version 11 (Systat Software GmbH, Erkrath, DE) vorgenommen.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

Durch den Einsatz spezifisch konstruierter Vektorsysteme innerhalb einer Bakterienzelle, können Proteine gezielt in großer Menge produziert werden. Durch die Erkenntnisse und Anwendungen aus der Proteinbiochemie ist es möglich, dieses spezifische Protein in hoher Reinheit aus der bakteriellen Kultur zu isolieren und ihre Funktion in weiter folgenden Experimenten aufzuklären.

2.3.1. Genüberexpression zur verstärkten Synthese von Proteinen

Für die vermehrte Produktion von spezifischen Proteinen werden induzierbare Vektorsysteme wie z.B. pBAD-Myc/HisC oder pET28b verwendet. Durch die Zugabe von L-Arabinose bzw. IPTG wird die Überexpression der Gene, die für die Proteine kodieren, gezielt induziert. Es wird eine ÜNK des Plasmid-tragenden Stammes (s. Tab. 4) 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt und mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37 °C und 180 Upm, wird der OD₆₀₀-Wert der bakteriellen Kultur gemessen und die Induktion durchgeführt. Hierbei wird das pBAD-Myc/HisC-Vektorsystem mit 1 mM L-Arabinose und das pET28b-Vektorsystem mit 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Zellen, die den Vektor pET28b aber keine chromosomal-kodierte T7-RNA Polymerase besitzen, benötigen für die Expression zusätzlich das Plasmid pTARA. Durch eine Induktion mit 1 mM L-Arabinose wird eine T7-RNA Polymerase exprimiert, die wiederum an den T7-Promotor des pET28b-Vektorsystem binden und die

Überexpression einleiten kann. Die Kulturen werden im Anschluss erneut bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.1. Überexpressionskinetik zur Überprüfung der Funktionalität der Vektorsysteme

Nachdem die Vektorsysteme für die gezielte Überexpression des gewünschten Gens in den jeweiligen genetischen Hintergrund des Bakteriums eingebracht und mittels PCR oder Sequenzierung überprüft werden, wird eine Expressionskinetik aufgenommen. Ausgehend von einer bakteriellen ÜNK wird 1:100 in 10 ml frisches LB-Medium mit den jeweiligen Zusätzen inokuliert und bei 37 °C und 180 Upm für drei Stunden inkubiert. Vor der Induktion wird 1 mL aus der Kultur entnommen und die Zellen durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 Upm und 4 °C pelletiert. Schließlich wird das Zellpellet mit 1 × Laemmli Puffer resuspendiert, für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert. Die nächsten Proben werden nach zwei, vier und 24 Stunden nach der Induktion entnommen und auf die gleiche Weise behandelt. Zu beachten ist, dass der OD₆₀₀-Wert der Proben auf den gleichen Wert eingestellt werden muss. Im Anschluss werden die Proben auf eine SDS-PAGE (s. 2.3.1.4) aufgetragen und nach einer Färbung des Gels auf die verstärkte Synthese des Proteins hin untersucht.

<u>5 × Laemmli-Puffer</u>	100 mg	Bromphenolblau
[Laemmli, 1970]	3,5 ml	Glycerin (99 %)
	1,5 g	SDS
	3,2 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
	2,5 ml	2-Mercaptoethanol

2.3.1.2. Proteinaufreinigung und – rückfaltung

Die Durchführung zur Aufreinigung von Proteinen verläuft zunächst analog zu der der Expressionskinetik, nur werden für die SDS-PAGE eine Probe vor und nach der Induktion für die SDS-PAGE entnommen. Nachdem die induzierten Zellen über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert wurden, werden diese für 20 Minuten bei 7.500 Upm und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Lysepuffer (s. Tab. 6) unter Zugabe von 25 µl Lysozym (10 mg/ml), 25 µl DNase I (1 mg/ml) und 1 mM Pefabloc resuspendiert. Wenn der His-tag in der nativen Konformation des Proteins nicht zugänglich ist, müssen dem Lysepuffer denaturierende Agenzien wie 6 M Guanidin-HCl zugesetzt werden.

Tab. 6: Zusammensetzung der Puffer für die Proteinaufreinigung und -rückfaltung.

	Native Bedingungen		Denaturierende Bedingungen	
Lysepuffer	40 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl	10 mM	Tris-Base
	100 mM	Imidazol	10 mM	Imidazol
	pH 8,0		6 M	Guandidin-HCl
			pH 7,4	
Elutionspuffer	40 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl	10 mM	Tris-Base
	500 mM	Imidazol	500 mM	Imidazol
	pH 8,0		6 M	Guandidin-HCl
			pH 7,4	
Rückfaltungspuffer	100 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5		
	50 ml	1 M KCl		
	10 ml	1 M MgCl ₂		
	1 ml	0,5 M EDTA		
	100 ml	Glycerol		
	69,68 g	L-Arginin		
	ad 1000 ml MilliQ			

Durch ein mechanisches Aufschlussverfahren der mittels einer *French Pressure Cell* oder Ultraschall erfolgt der Zellaufschluss. Beim Umgang mit der *French Press* wird das resuspendierte Bakterienpellet zunächst in die vorgekühlte Zelle der *French Press* überführt. Durch Anlegen eines Drucks von etwa 800 psi wird die Zellsuspension durch eine enge Öffnung gepresst, wodurch die Zellen auf Grund des anschließenden Druckabfalls und der auftretenden Scherkräfte zerstört werden. Für einen vollständigen Zellaufschluss und somit einer optimalen Proteinausbeute, werden die Bakterienzellen dreimal mit der *French Press* behandelt, wobei das Zelllysate zwischen den Schritten stets auf Eis gekühlt wird. Alternativ kann der Zellaufschluss mittels Ultraschall im Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Berlin, DE) durchgeführt werden. Dabei wird die auf Eis gekühlte Zellsuspension mit einer Ultraschall-Pulsdauer von 20 Sekunden insgesamt fünfmal beschallt. Zwischen den Zyklen erfolgt jeweils eine Pause von 30 Sekunden, um ein Überhitzen zu verhindern. Die verbliebenen Zellreste werden durch zwei bis drei Zentrifugationsschritte bei 9.000 Upm und 4 °C für 15 Minuten entfernt und der Überstand im Anschluss sterilfiltriert. Die im Filtrat enthaltenen Proteine werden

entweder über eine Einwegsäule des Ni-NTA Spin Kit von Qiagen oder über die HisTrap HP Säule von GE Healthcare (Freiburg, DE) unter Verwendung des ÄKTApurifier10 und der UNICORNTM Software (v 5.11) chromatographisch aufgereinigt. Die Proteine binden über die im Protein-Tag enthaltenen Histidinreste an die Nickelatome der Säule. Für die Elution wird eine erhöhte Imidazolkonzentration im Puffer verwendet. Das Imidazol bindet kompetitiv an die Säule und verdrängt dadurch das Histidin, wodurch sich das Protein im Eluat befindet. Im ÄKTA-System werden nur gekühlte Puffer und Waschlösungen verwendet, die vorab sterilfiltriert und im Sonorex RK 156 H (Bandelin, Berlin, DE) entgast wurden. Das Beladen der HisTrap-Säule erfolgt sowohl mit als auch ohne denaturierende Agenzien im Lysepuffer. Durch eine stufenweise Erhöhung der Menge an Imidazol (0,1 M bis 0,5 M) während des Aufreinigungsprogramm werden unspezifisch gebundene Proteine vorher entfernt, wodurch das gewünschte Protein in reinerer Form isoliert werden kann. Wenn das Protein unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde, müssen die denaturierenden Agenzien entfernt werden, um eine Rückfaltung des Proteins in seine ursprüngliche Konformation zu ermöglichen. Eine Möglichkeit der Rückfaltung besteht darin, dass isolierte Protein in Rückfaltungspuffer zu dialysieren. Bei dieser Methode werden die Fraktionen des aufgereinigten Proteins in einen Visking-Dialyseschlauch (Carl Roth, Karlsruhe, DE) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3 kDa pipettiert, der zuvor in MilliQ getränkt wurde. Dieser wird in der 250-fachen Menge an Rückfaltungspuffer für 36 Stunden bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Nach etwa der Hälfte der Zeit wird der Puffer erneuert. Eine weitere Möglichkeit zur Rückfaltung stellt die Zentrifugation mit den Amicon[®] Ultra-15 10K *Centrifugal Filter Devices* von Merck Millipore (Darmstadt, DE) dar. Diese Filter besitzen eine molekulare Ausschlussgröße von 10 kDa und dienen dem Pufferaustausch. Hierbei wird das isolierte Protein mit dem Rückfaltungspuffer verdünnt und bei 5000 × g und 4 °C zentrifugiert, wodurch das Volumen reduziert und somit die denaturierenden Agenzien entfernt werden. Die Dauer der Zentrifugation ist abhängig von der Probenmenge. Im Verlauf der Rückfaltung gebildete Kristalle werden anschließend abzentrifugiert. Nur der Überstand mit den gelösten Proteinen wird in den weiteren Schritten verwendet.

2.3.1.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wird im Mikrotiterplattenformat photometrisch im Plattenleser Wallac Victor³ m.H. einer modifizierten Methode nach

Bradford [Bradford, 1976] bestimmt. Dazu wird die Roti®-Quant Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, DE) eingesetzt, die den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 enthält, der nach Bindung an Proteinen von dem kationischen in den anionischen Zustand übergeht. Dadurch erfolgt eine Absorptionsänderung von 470 nm zu 595 nm, die mit der Proteinkonzentration weitgehend proportional ist. Als Standard dient eine Verdünnungsreihe mit Rinderalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) in Konzentrationen von 20 - 100 ng/µl. Verschiedene Verdünnungen des aufgereinigten Proteins werden hergestellt und gemessen. Es werden 50 µl aller Proben auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl der verdünnten Roti®-Quant Lösung (2:5,5) versetzt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) wird die Absorption bei 595 nm gemessen und gegen die eingesetzten BSA-Konzentrationen aufgetragen. Über die Geradengleichung kann die Proteinmenge aus der Absorption der Proteinprobe ermittelt werden. Das Mittelwert aus allen gemessenen Verdünnungen dient als Richtwert für die ungefähre Proteinkonzentration. Das Bestimmtheitsmaß der Geradengleichung dient als Gütemaß der linearen Regression.

2.3.1.4. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, um Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Molekülmasse nach aufzutrennen. Im größerporigen Sammelgel werden die Proben zunächst fokussiert und erst im engporigen Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe. Dadurch wird eine höhere Trennschärfe erzielt im Vergleich zu anderen Methoden.

Nachdem die entnommenen Proben (s. 2.3.1.1 & 2.3.1.2) in Laemmli-Puffer gelöst und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert wurden, werden 10 - 30 µl pro Geltasche auf ein selbstgemachtes Gel (s. Tab. 7) aufgetragen. Als Längenmarker wird der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (St. Leon-Rot, DE) verwendet. Die Auftrennung erfolgt in einer vertikalen Gelkammer mit 1 × SDS Puffer bei 120 V und 18 mA pro Gel. Die SDS-Gele werden nach der Elektrophorese in die Coomassie-Färbelösung eingelegt und über Nacht schüttelnd inkubiert. Der Farbstoff lagert sich unspezifisch an alle Proteine an. Für das Entfärben werden die Gele zunächst mit Wasser gewaschen und im Anschluss für ca. vier Stunden in einer 30 % Methanollösung eingelegt.

<u>10 × SDS-Laufpuffer</u>	250 mM	Tris-Base
	1920 mM	Glycerin
	1 %(w/v)	SDS
	ad 1000 ml MilliQ	

Tab. 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE (für zwei Gele)

	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (6 %)
MilliQ	3,32 ml	3,2 ml
Tris-HCl	3,75 ml 1,5 M (pH 8,8)	0,6 ml 0,5 M (pH 6,8)
Glyzerin (99 %)	1,42 ml	-
Acrylamidlösung (30 %)	6,25 ml	1,1 ml
15 % SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	3 µl
10 % APS	150 µl	50 µl

2.3.2. Untersuchung von Protein-Nukleinsäure-Interaktionen

Spezifische und unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren sind ein wichtiger Teil regulatorischer Prozesse innerhalb einer Zelle. Dadurch wird beispielsweise die Genexpression und andere Stoffwechselfvorgänge kontrolliert. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der quantitativen und qualitativen Messung der spezifischen Sequenzerkennung eines Proteins mit der Nukleinsäure, sowie mit der Identifizierung der Nukleotidsequenz der IolR-Bindestelle mittels Subklonierung in kommerziell erwerbliche Plasmid-Vektoren.

2.3.2.1. Qualitative Messung der Protein-DNS-Interaktion mittels Gelmobilitätsstudien

Diese Art der Untersuchung von Protein-DNS-Interaktionen beruht darauf, dass ungebundene DNS in einem nativen Gel eine höhere Wandergeschwindigkeit aufweist als proteingebundene DNS, die im Gel zurückgehalten wird. Die zu untersuchenden Promotorregionen von P_{reiD} und P_{iolE} werden mittels PCR amplifiziert und mit dem Kit MSB® Spin PCRapace (250) von Stratec Molecular (Berlin, DE) aufgereinigt. Als Kompetitor wird entweder ein 195 bp oder 312 bp langes Promotorfragment von dem Haushalts (*housekeeping*) -Gen *argS* verwendet. Das Gen *argS* kodiert für eine Arginyl-tRNA Synthetase, welches die Aminosäuren mit ihren spezifischen tRNA-Molekülen kovalent verbindet. Es werden 100 ng bzw. 50 ng der zu untersuchenden DNS mit 4 µl

5 × Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer und mit der gleichen Menge an Kompetitor DNS vermischt und mit steigenden Mengen des aufgereinigten Proteins versetzt. Nun werden die Ansätze durch Zugabe von MilliQ auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht und bei RT für 45 Minuten inkubiert. Die Proben werden mit 4 µl 6 × Orange Loading Dye (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, DE) vermischt und auf ein natives 9,5-prozentiges Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Tab. 8). Die Auftrennung erfolgt bei 120 V und 4 °C für ungefähr 2 Stunden. Das Gel wird mit GelRed für 20 Minuten gefärbt und im Anschluss werden die DNS-Banden mit dem UV-Transilluminator UVsolo TS von Biometra (Göttingen, DE) sichtbar gemacht.

Tab. 8: Zusammensetzung eines nativen Polyacrylamidgels für zwei Gele

9,5-prozentiges natives Polyacrylamidgel (für 2 Gele)	
Acrylamidlösung (30 %)	4,8 ml
TBE (5 ×)	3 ml
MilliQ	7 ml
APS (10 %)	150 µl
TEMED	15 µl

2.3.2.2. Quantitative Messung der Protein-DNS-Interaktion mittels SPRS

Die *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* (SPR-Spektroskopie) ermöglicht die Untersuchung direkter Interaktionen zwischen verschiedenen Makromolekülen z.B. einem Protein und seinem Bindesequenzmotif auf der DNS. Eine spezifische biologische Bindungsreaktion kann in Echtzeit in Hinsicht ihres Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten näher charakterisiert werden. Dies ermöglicht molekularbiologische Prozesse des jeweiligen Proteins und deren regulatorische Funktion innerhalb einer Zelle genauer zu betrachten.

Die Proteine werden wie bereits beschrieben aufgereinigt (s. 2.3.1.2) und die DNS-Fragmente der *iol*-Promotoren mittels biotinylierter Oligonukleotiden (s. Tab. 21) amplifiziert. Als Kontrolle dienen biotinylierte Oligonukleotide der Promotorregion des *pcfA* Gens von *Photobacterium luminescens*, diese werden zusammen für fünf Minuten bei 100 °C zu doppelsträngiger DNS verbunden. Anschließend werden die Untersuchungen in Kooperation mit Dr. Ralf Heermann von der Ludwig-Maximilians-Universität München mit einem Biacore T200 Gerät (GE Healthcare, Freiburg, DE) und einem Streptavidin-beladenem SAD500-L Carboxymethyl dextran Sensorchip (XanTec

Bioanalytics GmbH, Düsseldorf, DE) durchgeführt. Alle Experimente werden bei 25 °C mit HBS-EP+ Puffer (100 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl, 3 mM EDTA und 0,05 % (v/v) Detergenz P20) ausgeführt. Die Equilibrierung der Sensoroberfläche findet durch dreimalige Injektion von einer Equilibrierungslösung (1 M NaCl und 50 mM NaOH) mit einer Flussrate von 10 µl/min statt. Anschließend werden 10 nM der doppelsträngigen biotinylierten DNS-Fragmente in HBS-EP+ Puffer für 180 Sekunden und einer Flussrate von 10 µl/min in die mobile Phase gegeben. Durch einen Waschschrift mit einer Waschlösung (1 M NaCl, 50 mM NaOH und 50 % (v/v) Isopropanol) wird die Sensoroberfläche von ungebundenen biotinylierten DNS-Fragmenten befreit. Die erste Flusszelle dient als Referenzzelle und wird nicht mit DNS bestückt, um Hintergrundsignale des Refraktionsindex auszuschließen. Nach jedem Zyklus mit unterschiedlicher Proteinmenge, die sich innerhalb eines Konzentrationsbereiches von 0,5 nM bis 2 µM befindet, wird die Sensorchipoberfläche durch eine Injektion von 2,5 M NaCl für 60 Sekunden mit einer Flussrate von 30 µl/min regeneriert. Die Sensogramme werden mit der Biacore T200 Control Software 2.0 aufgenommen und mit der Biacore T200 Evaluation Software 2.0 analysiert (GE Healthcare, Freiburg, DE). Um die Konzentration des Analyten in der Probe zu bestimmen wird eine kalibrierungsunabhängige Konzentrationsbestimmung (*calibration-free concentration analysis*, CFCA) nach Herstellerangaben von GE Healthcare examiniert. Die Konzentration leitet sich dabei aus dem Diffusionskoeffizienten des Analyten zusammen mit seiner Affinitätsrate unter partiell diffusionslimitierenden Bedingungen ab und kann direkt durch die Protein-DNS-Interaktion im BiaCore-Gerät gemessen werden. Der Diffusionskoeffizient des Proteins wird mittels *Biacore diffusion constant calculator and converter webtool* (<https://www.biacore.com>) gemessen und beträgt $D = 9,946 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bei der Annahme eines globulär geformten Proteins. Für die kalibrierungsunabhängige Konzentrationsbestimmung werden 50 nM des aufgereinigten Proteins schrittweise verdünnt (1:2, 1:5, 1:10 und 1:20) und jede Probe zweimal injiziert. Die initiale Bindungsrate (dR/dt) wird bei zwei verschiedenen Flussraten von 5 µl/min und 100 µl/min in Abhängigkeit der Diffusionskonstanten des Proteins gemessen. Der Wert der „aktiven“ Proteinkonzentration wird für die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten und Affinität verwendet. Im weiteren Verlauf wird anhand der gewonnenen Daten ein Interaktionsmodell (*Interaction Map*, IM) mittels mathematischer Evaluierung über den Ridgeview Diagnostic Server (Ridgeview Diagnostics, Uppsala, Schweden) angefertigt. Hierfür werden Sensogramme aus der Biacore T22 Evaluation

Software 1.0 als *.txt Dateien exportiert und in die TraceDrawer Software 1.5 (Ridgeview Instruments) importiert. Eine Funktion innerhalb der Software ermöglicht die Generierung von bestimmten Dateiformaten, die an den Server von Ridgeview Diagnostics übermittelt werden (im@ridgeviewdiagnostics.com), um die Kalkulation einer InteractionMap durchzuführen. Die Dateien der IM-Analyse werden mit Hilfe der TraceDrawer 1.5 Software analysiert. Für die weitere Auswertung wird ein *OneToTwo* Algorithmus innerhalb der TraceDrawer Software (Ridgeview Diagnostics AB, Uppsala, Schweden) verwendet, da dieses Modell die beste Anpassung an die empirischen Daten ermöglicht.

3. Ergebnisse

3.1. Zeitliche Analyse der *iol*-Genexpression während des Abbaus von *myo*-Inositol

Um die Regulation der *iol*-Gene und ihre Aktivität im Verlauf des Abbaus von MI aufzudecken, wurde Gfp direkt hinter amplifizierte Promotor- oder Genfragmente der genomischen Insel GEI4417/4436 fusioniert und über ein nicht-replikationsfähiges Plasmid in den Zielorganismus eingebracht. Durch homologe Rekombination mit dem chromosomal vorliegenden DNS-Abschnitt wurde das Fusionskonstrukt in das *Salmonella* Genom eingefügt. Das *gfp*-Gen lag als einzelne Kopie in der DNS vor, und die Aktivität der *iol*-Genexpression wurde indirekt über die Quantifizierung der Fluoreszenz des Reportergens bestimmt. Mit Hilfe verschiedener Reporter-gen-Konstrukte wurde das Expressionsverhalten des Repressorgens und der von ihm kontrollierten *iol*-Gene während des Wachstums in MM mit MI näher untersucht.

3.1.1. Induktion und Verlauf der *iolR*-Genexpression in Anwesenheit von *myo*-Inositol

Die Regulation des Abbaus von MI wird durch die Bindung zweier Transkriptionsfaktoren an die DNS bewerkstelligt. Bindet IoIR an den Operatorbereich der *iol*-Gene, werden diese in ihrer Expression reprimiert. Die Aktivität der Transkription des Repressorgens sollte im Verlauf des Wachstums mit MI analysiert werden. Für diese Untersuchung wurde der Bakterienstamm MvP101 $P_{iolR}::gfp$ konstruiert, der eine genomische Fusion der Promotorregion des *iolR*-Gens mit dem Reportergen *gfp* trägt (s. Tab. 4). Die transkriptionelle Aktivität des Repressorgens wurde während des Wachstums der Salmonellen in MM mit MI aufgenommen und als eine Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Messzeitpunkte dargestellt (s. Abb. 6). Nachdem die Bakterien in MM mit MI inokuliert wurden, wies die Population eine einheitlich niedrige Gfp-Aktivität auf, die sich im Bereich der Autofluoreszenz einer bakteriellen Zelle befand. Es wurde eine durchschnittliche Fluoreszenz des parenteral Stammes MvP101 von $233,6 \pm 220,2$ ermittelt (s. Abb. 38 im Anhang). In der Anlaufphase des bakteriellen Wachstums mit MI stieg das Signal des Fluorophores in einem Teil der Population stetig an, was mit einer transkriptionellen Aktivität des Repressorgens gleichzusetzen ist. In der anderen Subpopulation wurde auch nach 10-stündiger Inkubation in MM mit MI keine Änderung des Fluoreszenzsignales detektiert. Nach 14 Stunden befand sich die bakterielle Kultur am Ende der Anlaufphase,

und mit dem folgenden Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase erhöhte sich das Signalniveau der Fluoreszenz. Eine Aufspaltung der Population mit niedriger und hoher Signalstärke des Reporter-gen-Konstruktes wurde nach 18 Stunden beobachtet, die bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase anhielt. Im weiteren Verlauf stellte sich die *gfp*-Expression auf ein moderates, aber einheitliches Niveau innerhalb der Population ein.

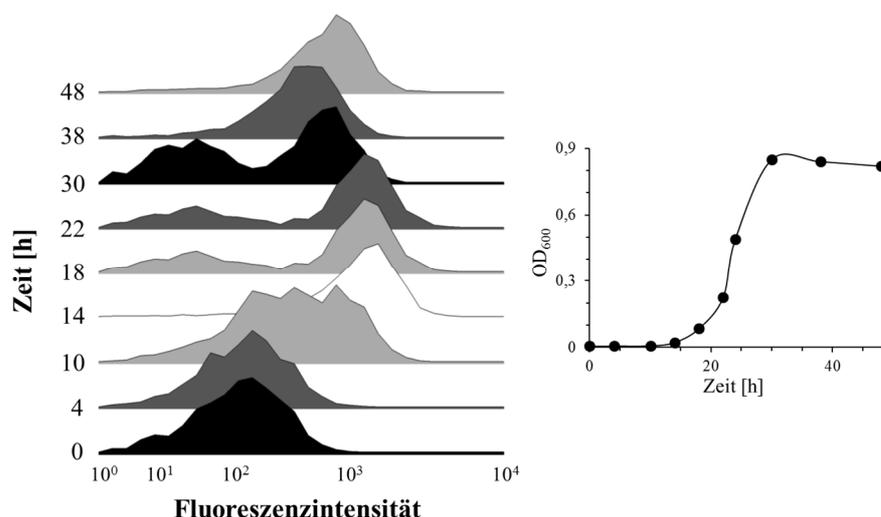


Abb. 6: Transkriptionelle Aktivität des Repressors des *myo*-Inositol-Stoffwechsels während des Abbaus des Polyols. Die optische Dichte einer ÜNK von MvP101 $P_{iolR}::gfp$ wurde auf 0,8 eingestellt und die Verdünnung 1:500 in MM mit MI inokuliert und stehend bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums wurden Proben aus der bakteriellen Kultur entnommen und die Gfp-exprimierenden Zellen im FACS Aria II Durchflusszytometer untersucht. Die Fluoreszenzintensität (FI) wurde auf der Abszisse mit biexponentieller Skalierung und der prozentuale Anteil an detektierten Ereignissen im Vergleich zur maximalen Anzahl auf der Ordinate dargestellt. Die Ergebnisse eines biologischen Replikates von drei unabhängigen Messungen wurden mit der dazugehörigen Wachstumskurve abgebildet.

Als Nächstes wurde die Aktivität des Repressorgens auf Ebene der Translation unter Zuhilfenahme des Bakterienstammes MvP101 $iolR::gfp$, der eine genomische Fusion der letzten 500 bp des *iolR*-Gens mit dem Reporter-gen *gfp* trägt, ermittelt (s. Abb. 7). Auf translationaler Ebene wurde ein ähnlicher Verlauf der Genaktivität des Repressors innerhalb der Population in Anwesenheit von MI beobachtet. Während der Anlaufphase des Wachstums der Salmonellen trat erneut eine Aufspaltung der Population anhand des Fluoreszenzsignales auf, wobei der Anteil der *gfp*-exprimierenden Zellen mit dem Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase nach 28 Stunden zunahm und die Expression des Fluorophores auf ein hohes Intensitätsniveau anstieg. Bei der Betrachtung des Wachstumsverhaltens von MvP101 $iolR::gfp$ fiel ein Wachstumsdefizit des Stammes im Vergleich zum transkriptionellen Fusionskonstrukt auf, das mehrfach im direkten Vergleich zu MvP101 $P_{iolR}::gfp$ beobachtet wurde.

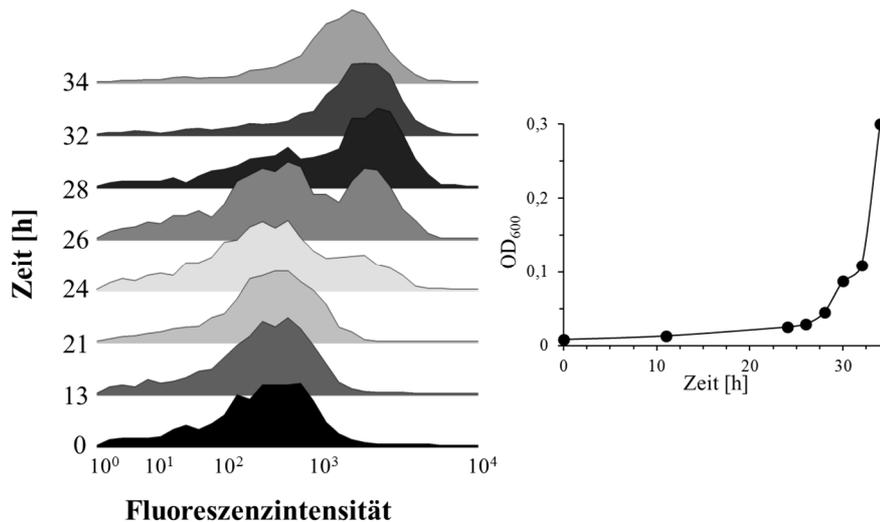


Abb. 7: Translationale Aktivität des Repressors des *myo*-Inositol-Stoffwechsels während des Abbaus des Polyols. Die experimentellen Bedingungen der Untersuchung von MvP101 *iolR::gfp* waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die Ergebnisse eines biologischen Replikates von drei unabhängigen Messungen wurden mit der dazugehörigen Wachstumskurve abgebildet.

Im Folgenden wurde die Streuung der *iolR*-Genexpression innerhalb der Population zu den einzelnen Zeitpunkten quantifiziert (s. Tab. 9). Anhand des Variationskoeffizienten (VarK) der Fluoreszenz pro Messzeitpunkt wurde beurteilt, ob es sich um eine homologe Merkmalsausprägung bei einer geringen Schwankung oder um eine heterologe Expression mit einem hohen Wert handelt. Der Variationskoeffizient stellt eine statistische Kenngröße dar, die als „noise level“ bezeichnet und aus dem Quotienten der Standardabweichung und der gemittelten Fluoreszenzintensität berechnet wird (Elowitz *et al.*, 2002). Zu Beginn der Anlaufphase wurde in beiden Bakterienstämmen ein hoher VarK-Wert für die *iolR*-Genexpression innerhalb der Population gemessen, wobei MvP101 *iolR::gfp* deutlich höhere Werte aufwies, die sich in einem Bereich von 332 ± 216 bis 1.092 ± 153 befanden und starken Abweichungen unterlag. Während der Anlaufphase reduzierte sich der VarK-Wert von MvP101 *P_{iolR}::gfp* zunächst auf 74 ± 24 , und erhöhte sich wieder auf einen Maximalwert von 188 ± 170 in der exponentiellen Wachstumsphase. In der stationären Phase wurde bei dem transkriptionellen Fusionskonstrukt der geringste VarK-Wert von 59 ± 2 ermittelt. Der Bakterienstamm MvP101 *iolR::gfp* wies über den gesamten Wachstumsverlauf eine höhere Streuung in seiner Merkmalsausprägung im Vergleich zu MvP101 *P_{iolR}::gfp* auf, die sich jedoch zum Ende des exponentiellen Wachstums reduzierte. Als Kontrolle für eine konstitutive Genexpression wurde der Bakterienstamm MvP101 *P_{rpsM}::gfp* konstruiert, der eine genomische Fusion der Promotorregion des Haushalts (*housekeeping*)-Gen *rpsM* mit

dem Reportergen *gfp* trägt (s. Tab. 4). Das *rpsM*-Gen kodiert für das 30 S ribosomale Protein S13, welches für die geringe Variabilität seiner Expression bekannt ist (Silander *et al.*, 2012; Nikolic *et al.*, 2013). Für diesen Kontrollstamm wurde eine durchschnittliche Varianz der Fluoreszenzintensität von $53,68 \pm 12,50$ aus drei unabhängigen Messungen festgestellt (s. Tab. 22 im Anhang). Im Vergleich zur Kontrolle wies die *iolR*-Genexpression innerhalb der Population eine heterologe Merkmalsausprägung über alle Wachstumsphasen auf, wobei sie sich zur stationären Phase hin immer mehr anglich. Das transkriptionale Fusionskonstrukt wies jedoch eine deutlich geringe Streubreite mit einem geringeren durchschnittlichen VarK-Wert innerhalb seiner Merkmalsausprägung im Vergleich zu MvP101 *iolR::gfp* auf (s. Abb. 39 A & B im Anhang).

Tab. 9: Die Varianz der *iolR*-Expression in *Salmonella* während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Um die Streuung der Merkmalsausprägung zu betrachten wurde der gemittelte Variationskoeffizient aus dem Quotienten der Standardabweichung, der gemittelten Fluoreszenzintensität der *Salmonella* Stämme MvP101 *P_{iolR}::gfp* und MvP101 *iolR::gfp* aus drei unabhängigen Messungen gebildet. Die Wachstumsphasen der bakteriellen Kultur wurden durch den Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm zugewiesen. †: Wert liegt unterhalb der durchschnittliche Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101.

Bakterienstamm	Zeit [h]	Mittelwert der Fluoreszenzintensität [MW]	gemittelter Variationskoeffizient [VarK]	Wachstumsphase
MvP101 <i>P_{iolR}::gfp</i>	0	183†	280 ± 238	Anlaufphase
	4	219†	98 ± 3	
	10	548	88 ± 1	
	14	1.317	74 ± 24	
	18	773	145 ± 45	Exponentielle Phase
	22	598	188 ± 170	
	30	355	151 ± 29	
	38	528	64 ± 2	Stationäre Phase
	48	777	59 ± 2	
MvP101 <i>iolR::gfp</i>	0	650	1.092 ± 153	Anlaufphase
	13	430	532 ± 292	
	21	451	332 ± 216	
	24	493	750 ± 124	Exponentielle Phase
	26	591	682 ± 394	
	28	810	256 ± 154	
	32	1.274	121 ± 39	
	34	1.144	116 ± 35	

Der Kontrollstamm MvP101 *P_{rpsM}::gfp* wurde außerdem zur Lebend/Tot-Diskriminierung der Zellen während des Wachstums in MM mit MI herangezogen. Aus der Verteilung des Fluoreszenzsignales innerhalb der Population wurde ein Grenzwert

zwischen den Subpopulationen mit einem hohen und niedrigen Niveau manuell festgelegt und als Anteil fluoreszierender und nicht-fluoreszierender Salmonellen dargestellt (s. Abb. 8).

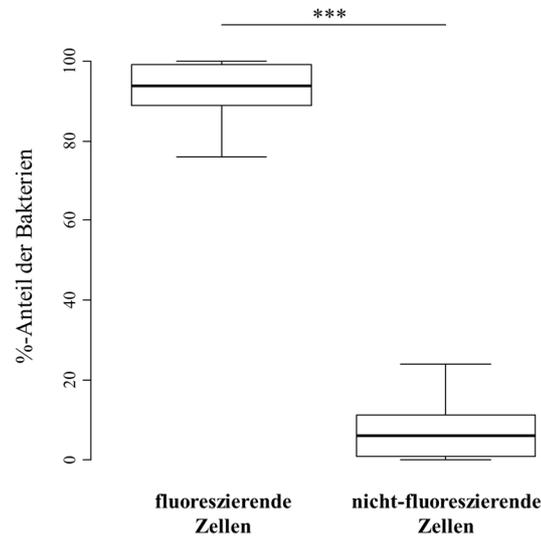


Abb. 8: Der prozentuale Anteil an *gfp*-exprimierenden und nicht-fluoreszierenden Bakterien für die Expression des Haushaltsgen *rpsM* während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 P_{*rpsM*::*gfp*} waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die Proben wurden verteilt über alle Wachstumsphasen von drei biologischen Replikaten entnommen. Der Mittelwertvergleich beider Zellpopulationen ergab einen signifikanten Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,01 % ($p < 0,0001$; ***).

Zellen, die eine hohe Gfp-Aktivität aufwiesen wurden, als metabolisch aktiv bzw. lebendig, und Bakterien mit einer niedrigen Fluoreszenz wurden als metabolisch inaktiv bzw. tot angesehen. Die Untersuchung der Kontrolle mit konstitutiver *rpsM*-Genexpression belegte, dass während des Wachstums in MM mit MI maximal 23,96 % der Zellen keine Lichtemission aufwiesen, wobei der Mittelwert aus den biologischen Replikaten bei 7,49 % lag (s. Abb. 8). Dagegen standen durchschnittlich 92,51 % der Bakterien mit *gfp*-Expression und einem minimalen Wert von 76,04 %. Bei einem Mittelwertvergleich der Gfp-exprimierenden und nicht-fluoreszierenden Bakterien wurde ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $< 0,01$ % ($p < 0,0001$; ***) nachgewiesen. Die Lebend/Tot-Diskriminierung anhand der Genaktivität des Haushaltsgen *rpsM* zeigte, dass der Anteil an metabolisch aktiven Zellen während des Wachstums in MM mit MI deutlich überwog und nur ein sehr geringer Anteil an metabolisch inaktiven Zellen vorlag. Im Hinblick auf die Aktivität der *iolR*-Genexpression in Anwesenheit von MI verdeutlichte diese Untersuchung, dass die

kleinere Subpopulation mit niedriger Fluoreszenzsignal nur z.T. durch tote Bakterienzellen zu erklären ist.

3.1.2. Expressionsverhalten der von IolR kontrollierten *iol*-Gene in Anwesenheit von *myo*-Inositol

Nachdem eine Induktion der Genaktivität des Repressors während des Wachstums der Salmonellen mit MI nachweisbar war, wurden die von ihm kontrollierten Gene auf ihr Expressionsverhalten in MM mit MI untersucht. Eines der wichtigsten von IolR reprimierten Gene ist das des Aktivators *ReiD*, welcher den Gegenspieler zum Repressor in der Regulation des Abbaus von MI darstellt. Der Aktivator induziert u.a. die Genexpression des *iolE-iolG1* Operons, welches für die ersten Enzyme des Abbaus von MI kodiert. Die transkriptionelle Genaktivität des Aktivators und des von ihm kontrollierten Operons wurden im zeitlichen Verlauf ihrer Induktion betrachtet (s. Abb. 9).

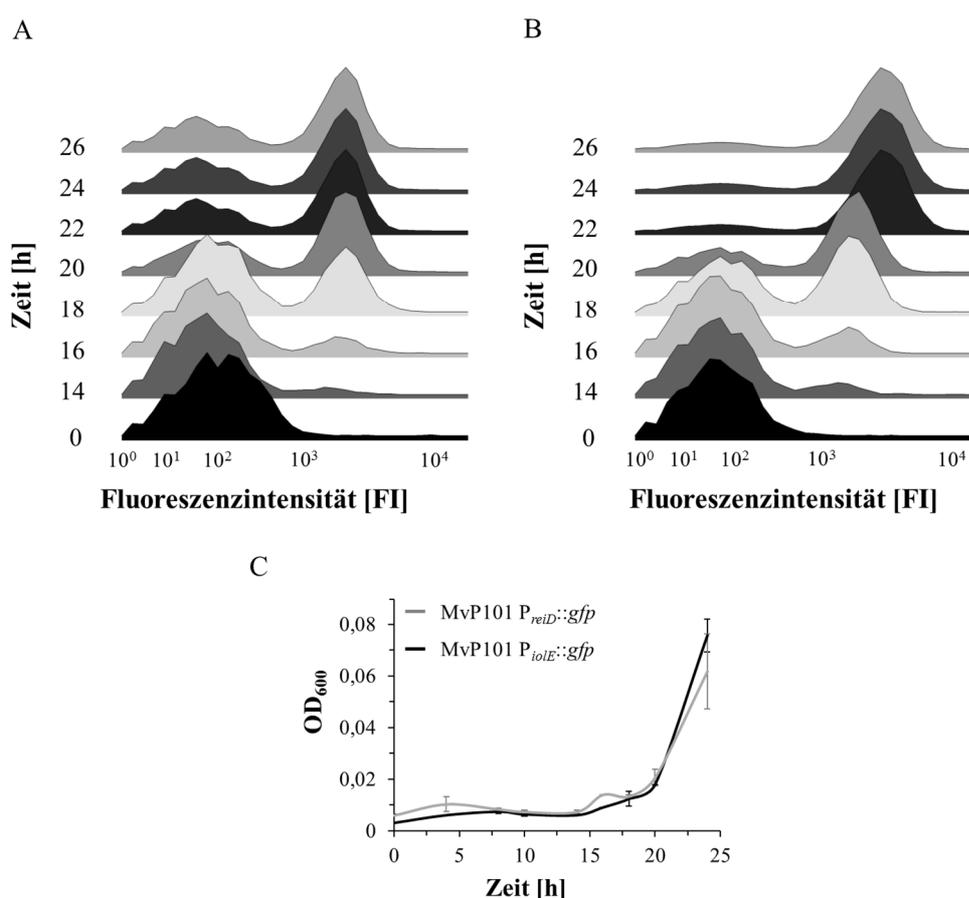


Abb. 9: Die transkriptionelle Aktivität des Aktivators *ReiD* und das von ihm kontrollierte *iolE-iolG1* Operon während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von *MvP101 P_{reiD}::gfp* (A) und *MvP101 P_{iolE}::gfp* (B) waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten pro Bakterienstamm wurde mit der dazugehörigen Wachstumskurve (C) abgebildet.

In beiden Stämmen wurde nach 14 Stunden eine kleine Subpopulation mit höherer Fluoreszenzintensität entdeckt, wobei die restliche Population ein niedriges Signalniveau aufwies. Mit zunehmender Inkubation in Abhängigkeit von MI wurde der Anteil mit einer hohen *gfp*-Expression stetig größer, was mit einer transkriptionellen Aktivierung des Aktivators und der Gene für den initialen Abbau von MI in der Anlaufphase gleichzusetzen ist. Beim Eintritt in die exponentielle Phase nach 20-stündiger Inkubation wies der Großteil der Population eine hohe Signalstärke des Fluorophores auf. Nach 22 Stunden zeigten nahezu alle Zellen des Bakterienstammes MvP101 $P_{iolE}::gfp$ eine Lichtemission (s. Abb. 9 B), wohingegen der Anteil an Zellen mit einer niedrigen Genaktivität bei MvP101 $P_{reiD}::gfp$ bis in die exponentielle Wachstumsphase der bakteriellen Kultur gleich blieb (s. Abb. 9 A). Bei dieser Untersuchung wurde eine gleichzeitige Induktion der Transkription des Aktivators und des von ihm kontrollierten Operons mit zunehmenden Aktivitätsverlauf der Genexpression in Abhängigkeit des Wachstums in MM mit MI erkannt. Zusätzlich wurde die Genaktivität des *iolE-iolGI* Operons über den gesamten Wachstumsverlauf im dreifach unabhängigen Ansatz examiniert (s. Abb. 10). Zwei distinkten Subpopulationen bildeten sich während des Eintritts in die exponentielle Wachstumsphase, als auch in der stationären Phase innerhalb der Population aus.

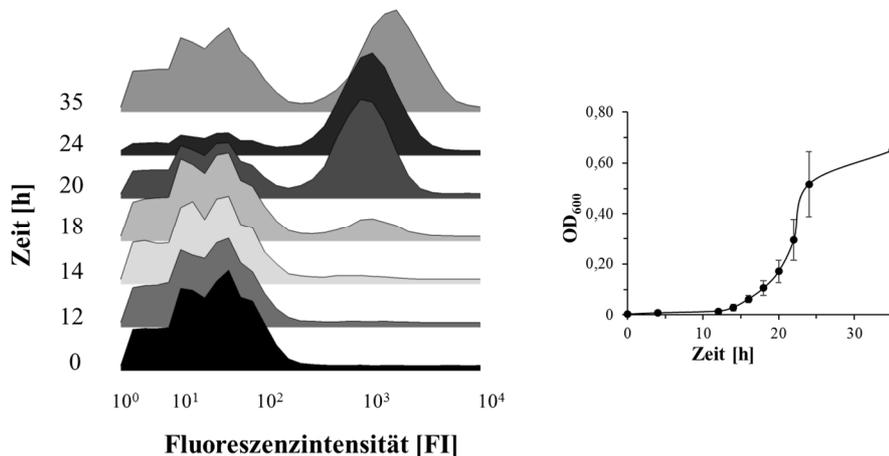


Abb. 10: Bistabilität der *iolE-iolGI*-Genexpression auf transkriptioneller Ebene von *S. Typhimurium* während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 $P_{iolE}::gfp$ waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten wurde mit der dazugehörigen Wachstumskurve abgebildet.

In Abb. 11 ist die Genaktivität des Aktivators auf den Ebenen der Proteinbiosynthese zum Vergleich aufgeführt und zeigte sowohl auf Ebene der Transkription sowie auf

translationaler Ebene eine gleichzeitige Induktion der Genexpression und einen ähnlichen Aktivitätsverlauf, der in Abhängigkeit des Wachstums in MM mit MI zunahm.

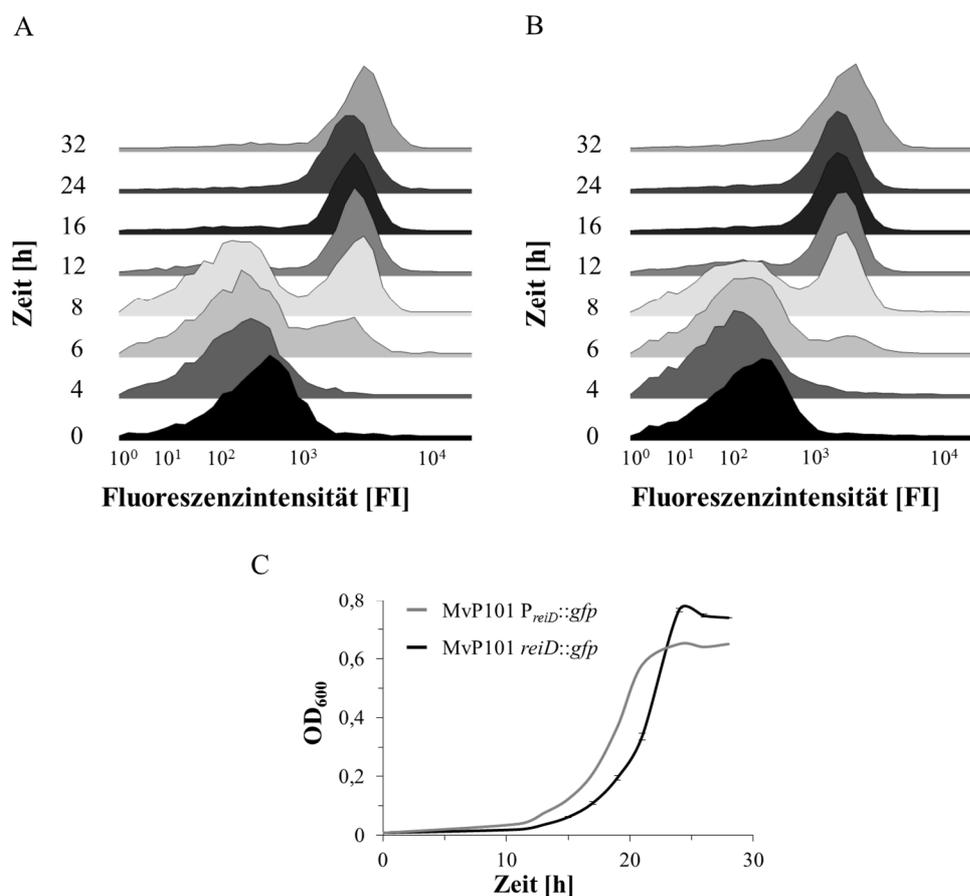


Abb. 11: Die Genaktivität des Aktivators auf beiden Ebenen der Proteinbiosynthese während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 *P_{reiD}::gfp* (A) und MvP101 *reiD::gfp* (B) waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten pro Bakterienstamm wurde mit der dazugehörigen Wachstumskurve (C) abgebildet.

Im Folgenden wurde die Streuung der Merkmalsausprägung innerhalb der Population zu den einzelnen Zeitpunkten betrachtet (s. Tab. 10). Bei der Untersuchung der *reiD*-Genexpression wurden während der Anlaufphase des Wachstums hohe VarK-Werte mit einem Maximalwert von 845 ± 605 für MvP101 *P_{reiD}::gfp* und 798 ± 345 für MvP101 *reiD::gfp* nachgewiesen, die zudem starken Schwankungen unterlagen. In der exponentiellen Wachstumsphase reduzierten sich die VarK-Werte in beiden Bakterienstämmen auf einen Minimalwerte von 52 ± 3 für MvP101 *P_{reiD}::gfp* und 56 ± 1 für MvP101 *reiD::gfp*, wobei die Merkmalsausprägung des transkriptionellen Fusionskonstrukt deutlich höheren Schwankungen unterlag. Auf translationaler Ebene der *reiD*-Genexpression wurde zu einem frühen Zeitpunkt des Wachstums in MM mit MI eine homogene Merkmalsausprägung mit geringen Schwankungen innerhalb der

isogenen Population festgestellt (s. Abb. 39 C & D). Für die transkriptionelle Aktivität der *iolE-iolG1*-Genexpression zeigte sich zu Beginn der Inkubation der Maximalwert von 1.204 ± 894 für die Streuung der Fluoreszenzintensität, der sich jedoch zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach 16 Stunden bereits auf 234 ± 38 reduzierte. Im weiteren Verlauf des exponentiellen Wachstums konnte eine geringere Streubreite beobachtet werden und der VarK-Wert sank 145 ± 73 ab. Im Vergleich zu den VarK-Werten der anderen Fusionskonstrukte zeigte die *iolE-iolG1*-Genexpression eine durchschnittliche Streuung in seiner Merkmalsausprägung (Abb. 39 E im Anhang).

Tab. 10: Varianz der *reiD*- und *iolE-iolG1*-Expression während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die Abweichung der Fluoreszenzintensität wurde wie in Tab. 9 von den *Salmonella* Stämmen MvP101 $P_{reiD}::gfp$, MvP101 $reiD::gfp$ und MvP101 $P_{iolE}::gfp$ berechnet und die Wachstumsphase durch den Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm der bakteriellen Kultur zugewiesen. †: Wert liegt unterhalb der durchschnittlichen Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101.

Bakterienstamm	Zeit [h]	Mittelwert der Fluoreszenzintensität [MW]	gemittelter Variationskoeffizient [VarK]	Wachstumsphase
MvP101 $P_{reiD}::gfp$	0	148†	448 ± 152	Anlaufphase
	2	151†	265 ± 48	
	8	132†	325 ± 73	
	14	169†	845 ± 605	
	16	288	261 ± 31	Exponentielle Phase
	18	782	156 ± 4	
	20	1.285	988 ± 6	
	22	1.900	52 ± 3	
	24	876	270 ± 128	
MvP101 $reiD::gfp$	0	436	616 ± 227	Anlaufphase
	4	325	798 ± 345	
	6	530	512 ± 214	
	8	1.275	322 ± 101	
	12	2.064	74 ± 5	
	16	2.303	56 ± 1	Exponentielle Phase
	24	2.160	57 ± 3	
	32	2.914	58 ± 4	
	MvP101 $P_{iolE}::gfp$	0	84†	1.204 ± 894
14		184†	625 ± 188	
16		331	234 ± 38	Exponentielle Phase
18		919	123 ± 9	
20		1.331	82 ± 6	
22		2.926	67 ± 9	
24		962	199 ± 92	
26		1.402	145 ± 73	

Ein weiteres von IolR kontrolliertes Gen ist *iolC*, welches für die membranständige 2-Deoxy-5-Keto-D-Glucuronsäure Kinase kodiert, die DKG unter ATP-Verbrauch zu DKGP phosphoryliert. Diesem Molekül wird eine Schlüsselrolle in der Regulation des *myo*-Inositol-Stoffwechsels zugeschrieben, indem es als Zuckerphosphat eine nicht-

kompetitive Hemmung durch Bindung an die C-terminale SIS-Domäne des Repressors ausübt. Es wird vermutet, dass dadurch die DNS-bindende Eigenschaft von IolR beeinflusst wird und von seiner Zielstruktur ab dissoziiert. In Abb. 12 ist die transkriptionelle Aktivität des *iolC*-Gens während des Wachstums in Abhängigkeit von MI aufgeführt, über die indirekt auf die DKGP-Produktion und die Inhibition des Repressors geschlossen werden kann.

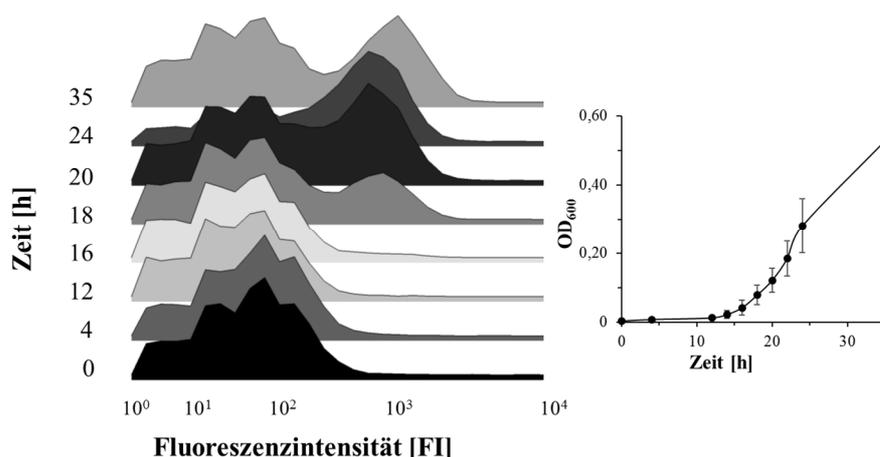


Abb. 12: Bistabilität der *iolC*-Genexpression auf transkriptioneller Ebene von *S. Typhimurium* während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 $P_{iolC}::gfp$ waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten wurde mit der dazugehörigen Wachstumskurve abgebildet.

Erst beim Übergang der bakteriellen Kultur in die exponentielle Wachstumsphase zeigte ein Teil der Bakterien nach 18 Stunden eine erhöhte *gfp*-Expression. Diese Subpopulation wurde mit weiterem Wachstum nach 24 Stunden immer größer, wobei der andere Teil der Population ein niedriges Niveau der Fluoreszenz aufwies. Eine Aufspaltung der Population mit hoher und niedriger Fluoreszenzintensität war bis in die stationäre Wachstumsphase zu beobachten. Durch die vermehrte Genaktivität der *iolC*-Kinase in der exponentiellen Wachstumsphase kann von einer konstanten DKGP-Produktion in einem Teil der Population ausgegangen werden, die bis in die stationäre Phase anhält.

Zuletzt wurde das von IolR kontrollierte *iol*-Gen des Transporters IolT1 untersucht. Die Aufnahme des Substrates erfolgt hauptsächlich über dieses Protein, der als *myo*-Inositol/ H^+ -Symporter MI in das Cytoplasma des Bakteriums aufnimmt. In Abb. 13 wurde die *iolT1*-Genexpression auf transkriptioneller Ebene in Anwesenheit von MI abgebildet. Während des Wachstums der Salmonellen in MM mit MI kam es zu keiner

detektierbaren transkriptionellen Aktivierung des Haupttransporters IolT1 infolge einer Zunahme des Fluorophores innerhalb der Population.

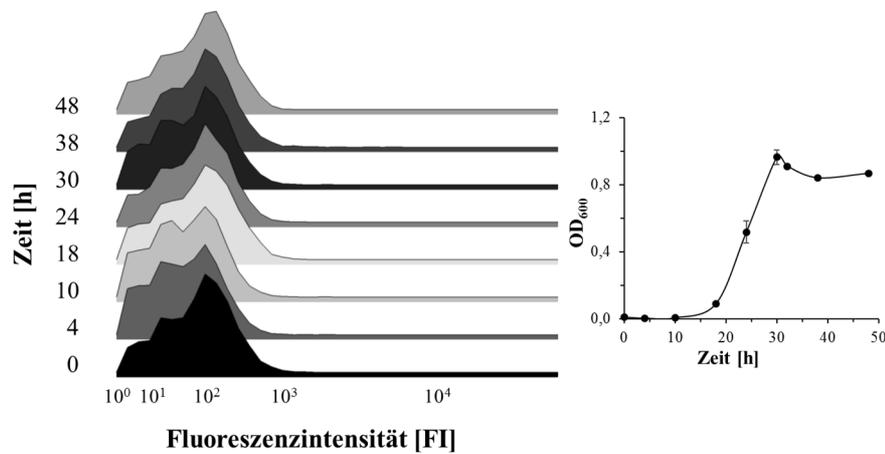


Abb. 13: Genaktivität der *iolT1*-Expression auf transkriptioneller Ebene von *S. Typhimurium* während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 $P_{iolT1}::gfp$ waren identisch mit denen, die in Abb. 6 beschrieben wurden. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten wurde mit der dazugehörigen Wachstumskurve abgebildet.

Die ermittelte Varianz innerhalb der *iolT1*-Genexpression in Tab. 11 deckte eine sehr heterogene Merkmalsausprägung während des gesamten Wachstumsverlaufes in Abhängigkeit von MI auf. Die VarK-Werte schwankten in einem Bereich von 293 ± 9 bis $443,9$ und zeigten keine abnehmende Tendenz beim Übergang in die stationäre Phase oder in ihrem weiteren Verlauf des Wachstums. Der Maximalwert der Streuung betrug 1.225 ± 1.218 und stellt einen Ausreißer dar (s. Abb. 39 F im Anhang).

Tab. 11: Varianz der *iolT1*-Expression auf transkriptioneller Ebene während des Wachstums mit *myo*-Inositol. Die Abweichung der Fluoreszenzintensität des *Salmonella* Stamm MvP101 $P_{iolT1}::gfp$ wurde wie in Tab. 9 berechnet und die Wachstumsphase durch den Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm der bakteriellen Kultur zugewiesen. †: Wert liegt unterhalb der durchschnittlichen Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101.

Zeit [h]	Mittelwert der	gemittelter	Wachstumsphase
	Fluoreszenzintensität [MW]	Variationskoeffizient [VarK]	
0	61†	314 ± 75	Anlaufphase
4	28†	418 ± 42	
10	30†	404 ± 41	
18	45†	293 ± 9	Exponentielle Phase
24	75†	1.225 ± 1.218	
30	37†	321 ± 17	Stationäre Phase
38	71†	520 ± 425	
48	61†	321 ± 184	

Die zeitliche Analyse der *iol*-Genexpression zeigte, dass während des Wachstums in Anwesenheit von MI die Expression der Gene *iolR*, *reiD*, *iolE* und *iolC* am Ende der Anlaufphase induziert wurde und die Genaktivität für diese Gene im weiteren Verlauf des Wachstums weiter zunahm. Der durchschnittliche Variationskoeffizient der Fluoreszenzintensität war um den Faktor 2 bis 9 größer im Vergleich zum Haushalt-Gen und zeigte eine heterogene Merkmalsausprägung für alle untersuchten *iol*-Gene auf (s. Abb. 39 im Anhang). Die Streuung der *iol*-Genexpression war während der Anlaufphase am größten und unterlag starken Schwankungen. Im weiteren Verlauf des Wachstums verlief die *iol*-Genexpression innerhalb der Population zunehmend einheitlicher. Eine Aufspaltung der Population, in einen Teil mit hoher oder niedriger Genaktivität wurde für die Expression von *iolR*, *reiD*, *iolE* und *iolC* beobachtet. Für den Haupttransporter für MI kam es während des ganzen Verlaufes des Wachstums zu keiner transkriptionellen Aktivierung, jedoch wurde ein sehr hoher VarK-Wert des Fluoreszenzsignals innerhalb der Population festgestellt. Die Lebend/Tot-Diskriminierung belegte, dass es sich bei den Bakterien mit geringer Fluoreszenz nur mit 7,49 % um metabolisch inaktiven bzw. „toten“ Bakterienzellen während des Wachstums mit MI handelte.

3.2. Einfluss einer konstitutiven *iol*-Genexpression auf die Fitness von Salmonellen in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen

Bakterien müssen sich immer den gegebenen Umweltbedingungen durch Umstellung ihres Stoffwechsels anpassen, um zu überleben. Sie müssen gezielt die Gene für katabolische Stoffwechselwege regulieren, um ihre internen Energieressourcen nicht zu verschwenden. Wenn Salmonellen eine aktive *iol*-Genexpression in einer Umgebung ohne MI aufweisen, würde dies einen Wachstumsnachteil im Gegensatz zu denen mit reprimierter Expression darstellen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde der Repressor deletiert und eine konstitutive Genexpression der *iol*-Gene in den Salmonellen unabhängig von den umgebenden Wachstumsbedingungen erzeugt. Die auf die Deletionsmutante einwirkende Selektion wurde über einen längeren Zeitraum unter optimalen Umgebungsbedingungen verfolgt.

Um einen Wachstumsnachteil belegen zu können, wurde die Fitness des Stammes 14028 *iolR*::Kan^R mit konstitutiver *iol*-Genexpression mit dem Kanamycin-sensitiven Stamm 14028 in einem kompetitiven Wachstumsexperiment verglichen. Beide Stämme wurden separat bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert und anschließend

gemeinsam in frisches LB-Medium inokuliert. Um die Ausgangszellzahl der beiden Stämme zu bestimmen, wurden mehrere Verdünnungsstufen der Reinkulturen mit je drei technischen Replikaten auf LB-Agarplatten ausplattiert. In jedem Experiment wurde die Mutante mit konstitutiver *iol*-Genexpression im Überschuss zugegeben. Nach der Inkubation des kompetitiven Index, für 24 Stunden bei 37 °C stehend, wurden mehrere Verdünnungsstufen des Index auf LB-Agarplatten mit und ohne Kanamycinzusatz mit je drei technischen Replikaten ausplattiert, inkubiert und ausgezählt. Um den Langzeiteffekt der Selektion auf die Stämme zu untersuchen, wurde ein Aliquot des Index 1:500 in frisches LB-Medium inokuliert, erneut für 24 Stunden bei 37 °C stehend inkubiert und mehrere Verdünnungen ausplattiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, so dass die Zellzahl der beiden Stämme von insgesamt drei Passagen aufgezeichnet wurde. Um einen Wachstumsnachteil auf Grund der Resistenzausbildung gegen Kanamycin auszuschließen, wurden die kreuzmarkierten Bakterienstämme 14028 *dacB*::Kan^R und 14028 Δ *iolR* verwendet. Das Gen *dacB* kodiert für das Penicillin Bindeprotein 5, welches eine DD-Carboxypeptidase Aktivität hat und das Wachstum von *Salmonella* nicht beeinträchtigen soll (Baquero *et al.*, 1996). Um die relative Fitness der Stämme innerhalb eines Index zu bestimmen, wurde die gemittelte Zellzahl pro ml jedes Stammes direkt nach der Inokulation, sowie nach 24-stündiger Inkubation jeder Passage ermittelt und in Abb. 14 dargestellt.

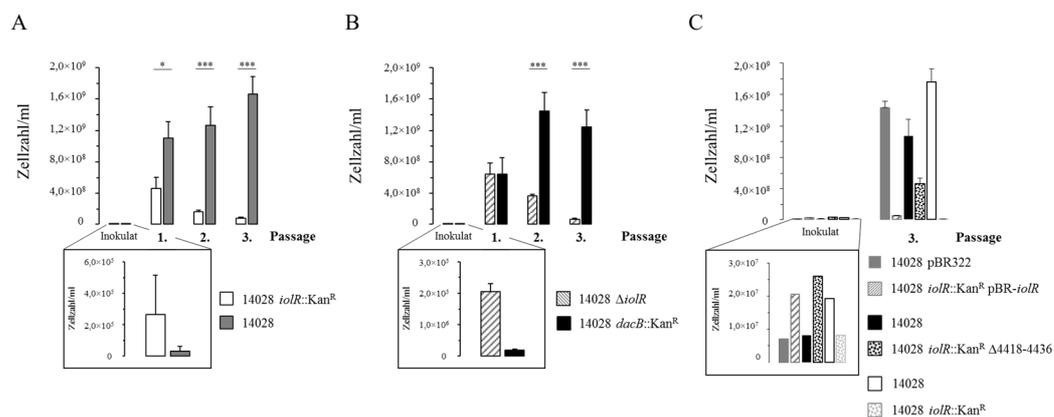


Abb. 14: Kompetitiver Index von *S. Typhimurium* gegen Mutanten mit konstitutiver *iol*-Genexpression unter optimalen Wachstumsbedingungen. Die Stämme wurden separat in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert und 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R (A) und 14028 *dacB*::Kan^R mit 14028 Δ *iolR* (B) in Verdünnungen von 1:250 bis 1:1000 in frisches Medium inokuliert. Nach 24 Stunden wurde die Zellzahl pro ml bestimmt und ein Aliquot des Index 1:500 in frisches LB-Medium inokuliert und erneut inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Für jede Passage wurde die gemittelte Zellzahl/ml und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten dargestellt. In einem Kontrollversuch wurde die Komplementationsmutante 14028 *iolR*::Kan^R pBR-*iolR* mit dem Stamm 14028 pBR322, sowie 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R Δ 4418-4436 1:500 in LB-Medium inokuliert und 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R als Kontrolle mitgeführt, wobei nur das Inokulat und die dritte Passage ausgewertet wurden (C). Aus dem Mittelwertvergleich der Zellzahlen ergab sich ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1 % ($p < 0,01$; *) und unter 0,01 % ($p < 0,0001$; ***).

Die Ausgangszellzahl/ml der *iolR*-Deletionsmutante betrug $2,64 \times 10^5$ für 14028 *iolR*::Kan^R bzw. $2,05 \times 10^6$ für 14028 $\Delta iolR$ und für die Stämme mit intaktem Repressorgen $3,21 \times 10^4$ für 14028 bzw. $1,91 \times 10^5$ für 14028 *dacB*::Kan^R. Die Mutante mit konstitutiver *iol*-Genexpression wurde somit im ~10-fachen Überschuss in den Index gegeben. Der Stamm 14028 *iolR*::Kan^R zeigte bereits nach 24 Stunden eine 2,4-fach geringeren signifikanten Unterschied mit $4,63 \times 10^8$ KBE/ml im Vergleich zu 14028 mit $1,11 \times 10^9$ KBE/ml ($p < 0,01$; * s. Abb. 14 A). Bei der Kreuzmarkierung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Mutante 14028 $\Delta iolR$ mit $6,47 \times 10^8$ KBE/ml und 14028 *dacB*::Kan^R mit $6,47 \times 10^8$ KBE/ml nachgewiesen (s. Abb. 14 B). Nach der zweiten Passage wichen die Zellzahlen der Stämme in beiden kompetitiven Indices signifikant voneinander ab ($p < 0,0001$; ***). Es besteht ein 7,6-facher Unterschied von 14028 *iolR*::Kan^R mit $1,65 \times 10^8$ KBE/ml und 14028 mit $1,26 \times 10^9$ KBE/ml, sowie ein 3,9-facher Unterschied von 14028 $\Delta iolR$ mit $3,67 \times 10^8$ KBE/ml und 14028 *dacB*::Kan^R mit $1,44 \times 10^9$ KBE/ml. In der dritten Passage bildete sich ein 20-facher Unterschied von $7,35 \times 10^7$ KBE/ml für 14028 *iolR*::Kan^R bzw. $6,11 \times 10^7$ KBE/ml für 14028 $\Delta iolR$ und den Stämmen mit intaktem Repressorgen $1,67 \times 10^9$ für 14028 bzw. $1,25 \times 10^9$ KBE/ml für 14028 *dacB*::Kan^R aus. In einem weiteren kompetitiven Index wurden Salmonellen mit komplementiertem *iolR*-Gen mit 14028 pBR322 gemeinsam inokuliert und die Selektion der Stämme in der dritten Passage näher betrachtet (s. Abb. 14 C). Zunächst lag die Komplementationsmutante in einem 2,9-fachen Überschuss vor, der sich in einen 28,6-fachen Wachstumsnachteil mit $5,00 \times 10^7$ KBE/ml gegenüber $1,43 \times 10^9$ KBE/ml für 14028 pBR322 in der dritten Passage umwandelte. Zum Vergleich zeigte der mitgeführte Kontrollversuch von 14028 *iolR*::Kan^R und 14028 einen 441-fachen Wachstumsnachteil der Deletionsmutante gegenüber des parenteralen Stammes in der dritten Passage. Durch die Komplementation der *iolR*-Deletion zeigte sich eine Reduktion des Wachstumsvorteils des parenteralen Stammes, im Vergleich zum mitgeführten Kontrollversuch von 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R. In einem letzten kompetitiven Index sollte ein Wachstumsnachteil aufgrund einer übergreifenden Funktion von IolR außerhalb der genomischen Insel GEI4417/4436 ausgeschlossen werden. Für dieses Experiment wurde die gesamte genomische Insel GEI4417/4436 deletiert und mit dem parenteral Stamm 14028 zusammen inokuliert. Die auf die *Salmonella*-Stämme 14028 und 14028 *iolR*::Kan^R $\Delta 4418-4436$ einwirkende Selektion wurden untersucht (s. Abb. 14 C). Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der dritten Passage zwischen den Bakterienstämmen festgestellt, so dass der Fitnessnachteil der *iolR*-Deletionsmutante im

Zusammenhang mit den *iol*-Genen stand. In Tab. 12 wurden die Zellzahlen pro ml aus Abb. 14 mit den biologischen Replikaten aufgeführt.

Tab. 12: Übersicht der Zellzahlen der kompetitiven Indices von *S. Typhimurium* gegen die Mutante mit konstitutiver *iol*-Genexpression aus Abb. 14. Die Standardabweichung (s) wurde mit aufgeführt.

	1	2	3	x ± s	1	2	3	x ± s
14028 <i>iolR</i>::Kan^R				vs.	14028			
<i>Inokulat</i>	8,50 × 10 ⁴	8,84 × 10 ⁴	6,19 × 10 ⁵	2,64 ± 2,51 × 10 ⁵	9,22 × 10 ³	1,0 × 10 ⁴	7,67 × 10 ⁴	3,21 ± 3,16 × 10 ⁴
1. <i>Passage</i>	6,19 × 10 ⁸	4,92 × 10 ⁸	2,79 × 10 ⁸	4,63 ± 1,40 × 10 ⁸	1,38 × 10 ⁹	8,89 × 10 ⁸	1,05 × 10 ⁹	1,11 ± 0,21 × 10 ⁹
2. <i>Passage</i>	1,47 × 10 ⁸	1,95 × 10 ⁸	1,54 × 10 ⁸	1,65 ± 0,21 × 10 ⁸	1,41 × 10 ⁹	1,45 × 10 ⁹	9,30 × 10 ⁸	1,26 ± 0,24 × 10 ⁹
3. <i>Passage</i>	8,71 × 10 ⁷	7,51 × 10 ⁷	5,83 × 10 ⁷	7,35 ± 1,18 × 10 ⁷	1,97 × 10 ⁹	1,51 × 10 ⁹	1,51 × 10 ⁹	1,67 ± 0,22 × 10 ⁹
14028 Δ<i>iolR</i>				vs.	14028 <i>dacB</i>::Kan^R			
<i>Inokulat</i>	1,64 × 10 ⁶	2,23 × 10 ⁶	2,26 × 10 ⁶	2,05 ± 0,29 × 10 ⁶	1,46 × 10 ⁵	2,39 × 10 ⁵	1,88 × 10 ⁵	1,91 ± 0,38 × 10 ⁵
1. <i>Passage</i>	7,93 × 10 ⁸	5,77 × 10 ⁸	5,71 × 10 ⁸	6,47 ± 1,03 × 10 ⁸	6,01 × 10 ⁸	6,94 × 10 ⁸	6,46 × 10 ⁸	6,47 ± 0,38 × 10 ⁸
2. <i>Passage</i>	2,00 × 10 ⁸	5,30 × 10 ⁸	3,72 × 10 ⁸	3,67 ± 1,35 × 10 ⁸	1,48 × 10 ⁹	1,53 × 10 ⁹	1,32 × 10 ⁹	1,44 ± 0,09 × 10 ⁹
3. <i>Passage</i>	7,21 × 10 ⁷	7,51 × 10 ⁷	3,60 × 10 ⁷	6,11 ± 1,77 × 10 ⁷	1,49 × 10 ⁹	1,35 × 10 ⁹	9,07 × 10 ⁹	1,25 ± 0,25 × 10 ⁹
14028 <i>iolR</i>::Kan^R pBR-<i>iolR</i>				vs.	14028 pBR322			
<i>Inokulat</i>	2,05 × 10 ⁷				7,05 × 10 ⁶			
3. <i>Passage</i>	4,73 × 10 ⁷	5,15 × 10 ⁷	5,12 × 10 ⁷	5,00 ± 0,19 × 10 ⁷	1,53 × 10 ⁹	1,43 × 10 ⁹	1,33 × 10 ⁹	1,43 ± 0,08 × 10 ⁹
14028 <i>iolR</i>::Kan^R				vs.	14028			
<i>Inokulat</i>	8,22 × 10 ⁶				1,93 × 10 ⁷			
3. <i>Passage</i>	4,82 × 10 ⁶	3,65 × 10 ⁶	3,51 × 10 ⁶	3,99 ± 0,59 × 10 ⁶	1,95 × 10 ⁹	1,79 × 10 ⁹	1,55 × 10 ⁹	1,76 ± 0,16 × 10 ⁹
14028 <i>iolR</i>::Kan^R Δ4418-4436				vs.	14028			
<i>Inokulat</i>	2,60 × 10 ⁷				8,22 × 10 ⁶			
3. <i>Passage</i>	5,63 × 10 ⁸	3,88 × 10 ⁸	4,49 × 10 ⁸	4,67 ± 0,72 × 10 ⁸	1,37 × 10 ⁹	9,66 × 10 ⁸	8,74 × 10 ⁸	1,07 ± 0,22 × 10 ⁹

Um einen Fitnessnachteil innerhalb des Index quantifizieren zu können, wurden die Teilungsraten der Bakterienstämme in der jeweiligen Passage analog zu Formel 4 & 5 berechnet und in Tab. 13 für die kompetitiven Indices von 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R und 14028 *dacB*::Kan^R mit 14028 Δ *iolR* aufgeführt.

$$n = \frac{\log(N_t) - \log(N_0)}{\log(2)} \quad \text{(Formel 4)}$$

- n = Anzahl der Zellteilungen zwischen zwei Zeitpunkten
N_t = Zellzahl pro ml nach Inkubation der Passage
N₀ = Zellzahl des Inokulates in die jeweilige Passage

$$v = \frac{(n)}{t} \quad \text{(Formel 5)}$$

- v = Teilungsrate
n = Anzahl der Zellteilungen zwischen zwei Zeitpunkten
t = Dauer der Inkubation (z.B. 24 Stunden)

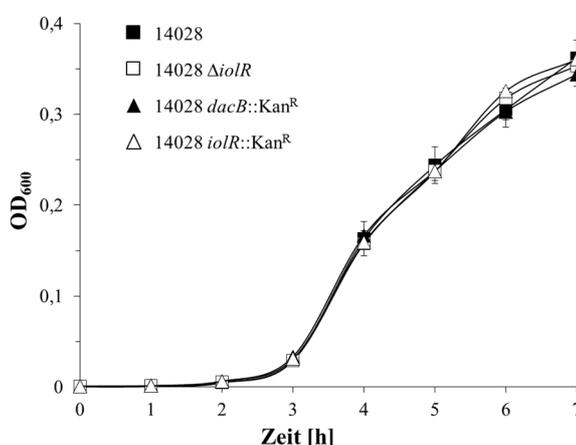
Die Wachstumsgeschwindigkeiten nahmen bei jedem Bakterienstamm in Abhängigkeit der Passage immer weiter ab. Um den Fitnessnachteil aufzudecken, wurden die Teilungsraten der Stämme in der dritten Passage miteinander verglichen. Die Rate von 14028 *iolR*::Kan^R betrug in dieser Passage 0,33 h⁻¹, und wich im Vergleich zu 14028 mit einer Teilungsrates von 0,39 h⁻¹ um 15,4 % ab. Die kreuzmarkierten Stämme wiesen einen Unterschied in ihrer Teilungsrates von 27,0 % auf, wobei 14028 Δ *iolR* mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von 0,27 h⁻¹ deutlich niedriger war als 14028 *dacB*::Kan^R mit 0,37 h⁻¹.

Tab. 13: Die Teilungsraten der Bakterienstämme innerhalb des kompetitiven Index. Die Berechnung erfolgte analog zu Formel 4 und 5, indem die Anzahl der Teilungen durch die Dauer der Inkubation dividiert wurde.

	Passage	Anzahl an Teilungen [h ⁻¹]	Teilungsrates [h]
14028 <i>iolR</i> ::Kan ^R	1	10,78	0,45
	2	7,48	0,31
	3	7,8	0,33
14028	1	15,08	0,63
	2	9,15	0,38
	3	9,37	0,39
14028 Δ <i>iolR</i>	1	8,31	0,35
	2	8,15	0,34
	3	6,38	0,27
14028 <i>dacB</i> ::Kan ^R	1	11,73	0,49
	2	10,12	0,42
	3	8,76	0,37

Um generelle Wachstumsdefizite der Stämme der kompetitiven Indices auszuschließen, wurde das Wachstum der verwendeten Bakterien separat in Mikrotiterplatten mit LB-Medium aufgenommen (s. Abb. 15). Die Bakterienstämme zeigten unter diesen Inkubationsbedingungen ein einheitliches Wachstumsverhalten, so dass Wachstumsnachteile nicht über die eingeführten Mutationen erklärt werden können.

Abb. 15: Wachstumsverhalten von 14028, 14028 Δ *iolR*, 14028 *dacB*::Kan^R und 14028 *iolR*::Kan^R in LB-Medium. Die optische Dichte der ÜNK wurde auf 0,8 eingestellt und dann 1:1000 in frisches LB-Medium inokuliert und bei 37 °C und 500 U_{pm} inkubiert. Das Wachstumsverhalten wurde in Mikrotiterplatten aufgenommen und stündlich gemessen. Standardabweichung wurde aus drei unabhängigen Ansätzen mit drei technischen Replikaten berechnet.



In diesem Experiment wurde die Selektion von Salmonellen mit konstitutiver *iol*-Genexpression über mehrere Generationen während der Inkubation in LB-Medium verfolgt. Die *iolR*-defiziente Mutante wies in beiden Indices einen klaren Wachstums- bzw. Selektionsnachteil von 15,4 bis 27,0 % unter nicht induzierenden Bedingungen für die *iol*-Genexpression auf. Durch eine Komplementation des Repressorgens wurde der Fitnessvorteil gegenüber dem parenteralen Stamm reduziert. Ein Wachstumsnachteil aufgrund einer übergreifenden Funktion von IolR in andere Stoffwechselwege wurde ausgeschlossen, da die Deletion der GEI4417/4436 kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum parenteralen Stamm aufzeigte. Die Manifestation des Fitnessnachteils der *iolR*-Deletionsmutante stand damit im Zusammenhang mit der Expression der *iol*-Gene. Des Weiteren wurde durch die Verwendung der kreuzmarkierten Bakterienstämme gezeigt, dass die Ausbildung einer Kanamycinresistenz keinen Einfluss auf die Selektion und das Ergebnis des kompetitiven Index hatte.

Des Weiteren wurde getestet, ob ein Stamm mit konstitutiver *iol*-Genexpression einen Wachstumsvorteil unter induzierenden Bedingungen für die Expression der *iol*-Gene besitzt. Es wurden dieselben Stämme wie im vorherigen kompetitiven Wachstumsversuch verwendet, aber diese im Gegenzug in MM mit MI inkubiert. Da sich die Selektion der Bakterienstämme erst in der dritten Passage der vorangegangenen Indices am deutlichsten gezeigt hatten, wurde nur die Ausgangszellzahl mit der Zellzahl der dritten Passage verglichen (s. Abb. 16).

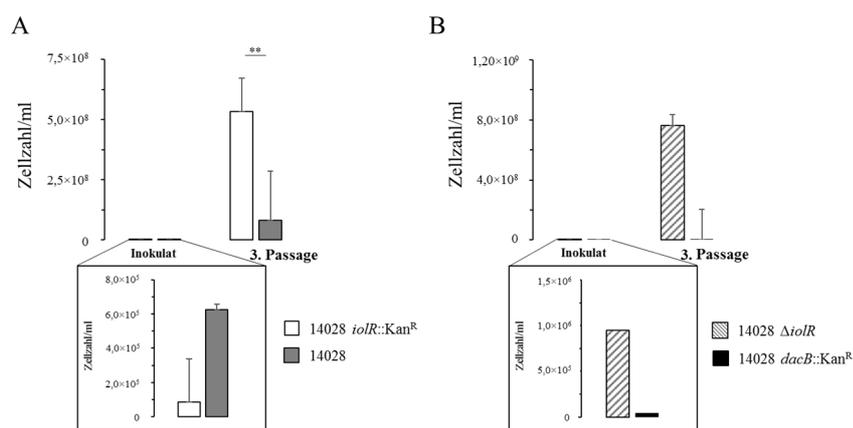


Abb. 16: Kompetitiver Index von *S. Typhimurium* gegen Mutanten mit konstitutiver *iol*-Genexpression in Anwesenheit von *myo*-Inositol. Die ÜNK der Stämme wurde in MM mit MI angesetzt, stehend bei 37 °C inkubiert und Verdünnungen von 1:250 bis 1:1000 von 14028 mit 14028 *iolR*::Kan^R (A) und 14028 *dacB*::Kan^R mit 14028 Δ *iolR* (B) in frisches MM mit MI inokuliert und stehend bei 37 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde ein Aliquot des Index 1:500 in frisches MM mit MI inokuliert und erneut inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die Ausgangszellzahl und die gemittelte Zellzahl/ml der dritten Passage mit Standardabweichung von drei biologischen Replikaten wurden dargestellt. Aus dem Mittelwertvergleich der Zellzahlen pro ml ergab sich ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,1 % ($p < 0,001$; **).

Die Ausgangszellzahl betrug $8,74 \times 10^4$ KBE/ml für 14028 *iolR::Kan^R* und $6,24 \times 10^5$ KBE/ml für 14028, wodurch der letztgenannte Stamm im 7,1-fachen Überschuss vorlag. Das Verhältnis verschob sich in der dritten Passage zur *iolR*-Deletionsmutante mit einem 6,6-fachen signifikanten Unterschied von $5,33 \times 10^8$ KBE/ml für 14028 *iolR::Kan^R* und $8,14 \times 10^7$ KBE/ml für 14028 ($p < 0,001$; **). Der andere Index zeigte einen 20,2-fachen Unterschied in der Zellzahl der dritten Passage von $7,63 \times 10^8$ KBE/ml bei 14028 $\Delta iolR$ und $1,61 \times 10^5$ KBE/ml bei 14028 *dacB::Kan^R*, wobei die *iolR*-Deletionsmutante bereits in seiner Ausgangszellzahl des kompetitiven Index überwog. In Tab. 14 wurden die Zellzahlen pro ml aus Abb. 16 mit den biologischen Replikaten aufgeführt.

Tab. 14: Übersicht der Zellzahlen der kompetitiven Indices von *S. Typhimurium* gegen die Mutante mit konstitutiver *iol*-Genexpression aus Abb. 16. Die Standardabweichung (s) wurde mit aufgeführt.

	1	2	3	x ± s	1	2	3	x ± s	
	14028 <i>iolR::Kan^R</i>				vs.	14028			
<i>Initial</i>	$1,46 \times 10^5$	$5,81 \times 10^4$	$5,81 \times 10^4$	$8,74 \pm 4,14 \times 10^4$	$2,19 \times 10^4$	$9,25 \times 10^5$	$9,25 \times 10^5$	$6,24 \pm 4,26 \times 10^5$	
3. Passage	$4,74 \times 10^8$	$5,47 \times 10^8$	$5,77 \times 10^8$	$5,33 \pm 0,43 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$	$7,47 \times 10^7$	$4,80 \times 10^7$	$8,14 \pm 3,06 \times 10^7$	
	14028 $\Delta iolR$				vs.	14028 <i>dacB::Kan^R</i>			
<i>Initial</i>	$9,47 \times 10^5$				$4,70 \times 10^4$				
3. Passage	$6,89 \times 10^8$	$7,37 \times 10^8$	$8,63 \times 10^8$	$7,63 \pm 0,73 \times 10^8$	$1,47 \times 10^5$	$1,86 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$1,61 \pm 0,18 \times 10^5$	

Die Salmonellen mit konstitutiver *iol*-Genexpression zeigten somit einen Wachstumsvorteil unter induzierenden Bedingungen für die *iol*-Genexpression in MM mit MI und einen Selektionsnachteil im nährstoffreichen LB-Medium. Die zusätzlich aufgewendete Energie für die *iol*-Genexpression gefährdet über einen längeren Zeitraum das Überleben der Bakterien in einer Umgebung, in der die Gene zum Abbau von MI nicht benötigt werden.

3.3. Salmonellen, deren Stoffwechsel an den Abbau von *myo*-Inositol adaptiert sind, zeigen einen graduellen Gedächtnisverlust bei Abwesenheit des abzubauenen Substrates

Der Begriff „Gedächtnis“ bezeichnet auf molekularer Ebene eine anhaltende Genexpression für die Verstoffwechslung eines Substrates, auch wenn der dafür erforderliche Impuls nicht mehr auf das System einwirkt (Ferrell, 2002). Dieser Effekt wird als Hysterese bezeichnet und konnte beim Abbau von Laktose durch die Abundanz und Stabilität der LacY-Permease beschrieben werden (Ozbudak *et al.*, 2004). Im folgenden Abschnitt gilt es zu klären, ob Salmonellen ein Gedächtnis an den Abbau von

MI aufweisen und wie lange sie brauchen, um sich an die neue Umgebung anzupassen, bevor sich der damit einhergehende Selektionsnachteil auf das Überleben der Spezies auswirkt. Um die Hysterese unter Bedingungen ohne MI zu untersuchen, wird ein Indikator benötigt, dessen Expression in der Zelle mit einer anhaltenden Fähigkeit das Polyol abzubauen gleichzusetzen ist. Die Abundanz der *iolE*-Dehydratase stellt als abbauendes Enzym des MI-Metabolismus einen geeigneten Reporter für den Nachweis eines Gedächtnisses der Salmonellen dar.

Für die folgenden Untersuchungen wurde der Vektor pUTs-*P_{iolE}::gfp* in MvP101, sowie dessen *iolR*-Deletions- und Komplementationsmutante eingebracht (s. Tab. 2 & 3). Die Bakterienstämme mussten zunächst durch mehrere Passagen auf Agarplatten mit MI an die Verstoffwechslung des Substrates adaptiert werden. Die ÜNK wurden mit MM mit MI angesetzt, und wie oben bereits beschrieben, eingestellt und 1:500 in LB-Medium inokuliert. Im Folgenden wurde das Wachstumsverhalten der bakteriellen Kultur aufgenommen, indem über einen Zeitraum von 12 Stunden stündlich eine Probe für eine OD-Messung und die Analyse mittels Durchflusszytometrie entnommen wurden. In Abb. 17 sind die Ergebnisse der Untersuchung eines Gedächtnisses der Bakterien an den Abbau von MI aufgeführt.

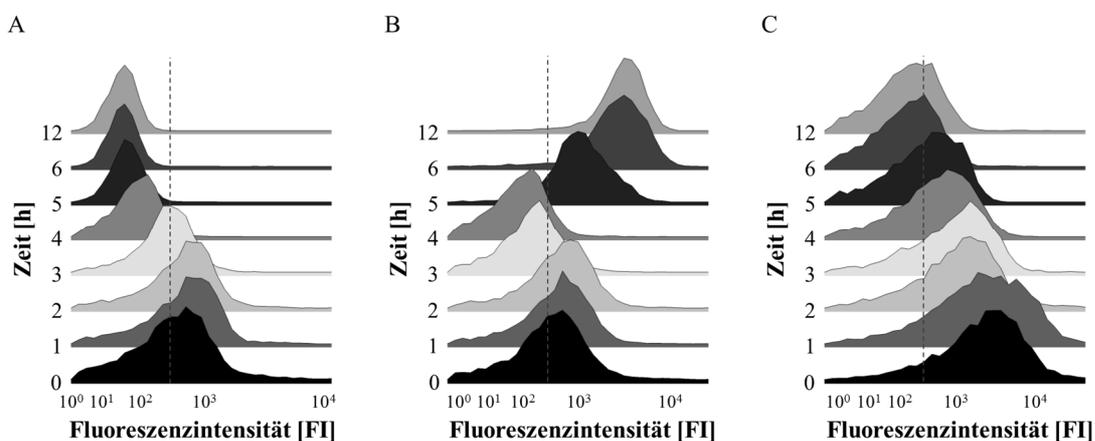


Abb. 17: Das Gedächtnis von Salmonellen *myo*-Inositol unter nährstoffreichen Bedingungen weiterhin abzubauen. Die Bakterienstämme MvP101 *P_{iolE}::gfp* (A), MvP101 Δ *iolR* *P_{iolE}::gfp* (B) und die Komplementationsmutante MvP101 Δ *iolR* *P_{iolE}::gfp* pBR-*iolR* (C) wurden durch mehrere Passagen an *myo*-Inositol adaptiert und anschließend in frisches LB-Medium inokuliert. Während des Wachstums wurden Proben aus den bakteriellen Kulturen entnommen und die Gfp exprimierenden Zellen im FACS Aria II Durchflusszytometer gemessen. Die Fluoreszenzintensität (FI) wurde auf der Abszisse mit biexponentieller Skalierung und der prozentuale Anteil an detektierten Ereignissen im Vergleich zur maximalen Anzahl auf der Ordinate dargestellt. Die gemittelte Fluoreszenzintensität aus drei biologischen Replikaten wurde in jedem Histogramm dargestellt. Die vertikal eingezeichnete gestrichelte Linie stellt die durchschnittliche Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101 dar (s. Abb. 38 im Anhang).

Die Analyse auf Einzelzellebene zeigte einen rapiden Abfall des Gfp-Signals innerhalb von vier Stunden der Inkubation in LB-Medium bei dem Stamm MvP101 $P_{iolE}::gfp$ (s. Abb. 17 A). Nach diesem Zeitpunkt befand sich das Intensitätsniveau der Lichtemission im Bereich der Autofluoreszenz des parenteralen Stammes MvP101, der eine durchschnittliche Fluoreszenz von $233,6 \pm 220,2$ aufwies (s. Abb. 38 im Anhang). Die Fähigkeit der Bakterien, das Substrat weiterhin abzubauen, verschwand nach wenigen Stunden in LB-Medium bzw. in Abwesenheit des induzierenden Reizes. Diese Abnahme der *gfp*-Expression war anfänglich bei der *iolR*-Deletionsmutante ebenfalls zu beobachten, aber nach 4 Stunden stieg die Signalstärke des Gfp-Proteins wieder an und behielt diese bei (s. Abb. 17 B). Durch die Deletion des Repressors wurden alle *iol*-Gene exprimiert und dadurch wurde die Fähigkeit MI abzubauen aufrechterhalten. Die Komplementation des Repressors mit dem pBR-*iolR* Vektor lies den ursprünglichen Phänotyp der *iolE*-Expression wieder auftreten (s. Abb. 17 C). Das Fluoreszenzsignal sank konstant mit fortlaufender Inkubation in LB-Medium und blieb nach 6 Stunden bis zum Ende des Experimentes unverändert. Es war jedoch anzumerken, dass die durchschnittliche Intensität des Fluorophores der Komplementationsmutante im Vergleich zu den anderen Fusionskonstrukten deutlich höher lag. In Tab. 15 sind die gemittelten Werte der Lichtemission aus je drei biologischen Replikaten der untersuchten Bakterienstämme aufgeführt. Die gemittelte Fluoreszenzintensität des Stammes MvP101 $P_{iolE}::gfp$ war auf einem sehr niedrigen Signalniveau im Vergleich zu den anderen Bakterienstämmen und fiel nach vier Stunden mit $123,9 \pm 17,3$ in den Bereich der Autofluoreszenz der bakteriellen Zelle. Die *iolR*-Deletionsmutante zeigte, wie bereits erwähnt, innerhalb von 4 Stunden einen Abfall des Gfp-Signals, welches danach rapide auf einen maximalen Wert von $3.090,2 \pm 46,3$ in der stationären Phase anstieg. Die Komplementationsmutante zeigte zu Beginn der Untersuchung ein hohes Intensitätsniveau, was im weiteren Verlauf des Wachstums stetig von $2.864,4 \pm 76,2$ auf seinen minimalen Wert von $205,3 \pm 5,1$ unterhalb des Schwellenwertes des parenteralen Stammes MvP101 absank.

Tab. 15: Der Gedächtnisverlust manifestiert sich in einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität der *myo-Inositol* abbauenden Gene in Abwesenheit des Polyols. Aus Abb. 17 wurde die Fluoreszenzintensität von drei biologischen Replikaten der Bakterienstämme MvP101 *P_{ioIE}::gfp*, MvP101 Δ *ioIR P_{ioIE}::gfp*, sowie der Komplementationsmutante aufgeführt und mit der Standardabweichung angegeben.

Zeit [h]	MvP101 <i>P_{ioIE}::gfp</i>	MvP101 Δ <i>ioIR P_{ioIE}::gfp</i>	MvP101 Δ <i>ioIR P_{ioIE}::gfp pBR-ioIR</i>
0	653,3 ± 17,6	1.252,0 ± 151,7	2.864,4 ± 76,2
1	745,1 ± 19,3	1.068,3 ± 142,5	2.554,1 ± 248,2
2	713,7 ± 5,6	1.105,6 ± 245,6	951,0 ± 9,6
3	399,4 ± 15,9	407,5 ± 21,5	488,9 ± 40,3
4	123,9 ± 17,3	169,1 ± 14,9	229,4 ± 24,7
5	83,7 ± 23,4	1.263,0 ± 87,3	220,3 ± 7,7
6	44,3 ± 4,3	3.019,2 ± 103,1	257,5 ± 25,3
12	40,4 ± 1,3	3.090,2 ± 46,3	205,3 ± 5,1

Neben der gezeigten Abnahme der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von MI wurde der prozentuale Anteil der Bakterien mit transkriptioneller Aktivität der *ioIE*-Genexpression innerhalb der Population bestimmt (s. Tab. 16). Es wurden nur die Ereignisse detektiert, in denen die Signalstärke des Gfp-Proteins mehr als 3×10^2 FI betrug, um den Einfluss der bakteriellen Autofluoreszenz auf die Ergebnisse zu reduzieren. Als Kontrolle wurde der Stamm MvP101 *P_{rpsM}::gfp* mitgeführt und die Stämme sowohl in LB-Medium als auch in MM mit MI untersucht. Die Messung der Aktivität des Haushalts-Gens diente dazu, eine Abnahme der Fluoreszenz, aufgrund eines reduzierten Stoffwechsels während der Anpassung der Salmonellen an die neuen Umgebungsbedingungen oder eine Verdünnung bzw. Abbau des Reporters durch den Vorgang der Zellteilung bzw. Protease-Aktivität auszuschließen. Mehr als die Hälfte der Population von MvP101 *P_{rpsM}::gfp* wies eine Fluoreszenzintensität über dem Grenzwert, direkt nach der Inokulation auf. Der prozentuale Anteil der Zellen mit einer transkriptionellen *rpsM*-Aktivität stieg auf 80 % nach einer Stunde, und über 95 % nach einer fünfstündigen Inkubation in LB-Medium, sowie nach 6 Stunden in MM mit MI. Die Bakterien mit transkriptioneller *ioIE*-Genexpression reduzierten sich innerhalb der Population von 43,6 auf 2,7 % nach vierstündiger Inkubation in LB-Medium. Nach 5 Stunden der Abwesenheit von MI zeigten weniger als 1 % der Bakterien eine Signalstärke oberhalb des Grenzwertes. Nach dem Eintritt der bakteriellen Kultur in die stationäre Wachstumsphase reduzierte sich der Prozentwert auf 0,1 % innerhalb der Population. Dieser Wert blieb auch nach 24 Stunden der Inkubation in Abwesenheit von MI innerhalb der Population bestehen.

Tab. 16: Der prozentuale Anteil an fluoreszierenden Bakterien innerhalb der Population während der Hysterese. Die experimentellen Bedingungen zur Untersuchung von MvP101 $P_{iolE}::gfp$ und MvP101 $P_{rpsM}::gfp$ waren identisch mit denen, die in Abb. 17 beschrieben wurden. Es wurde der prozentuale Anteil der Stämme mit einer Fluoreszenz von mehr als 3×10^2 FI (bakterielle Autofluoreszenz) berücksichtigt und aus unabhängigen Messungen erhoben. - Daten für diesen Messzeitpunkt nicht bestimmt.

Zeit [h]	MvP101 $P_{iolE}::gfp$		MvP101 $P_{rpsM}::gfp$	
	LB	MM + MI	LB	MM + MI
0	43.6	27.3	69.3	29.1
1	57.9	-	80.6	-
2	58.3	-	84.9	-
3	40.1	-	80.1	-
4	2.7	37.5	79.4	66.5
5	0.7	-	95.0	-
6	0.3	77.2	97.7	98.1
7	0.3	79.4	98.7	95.2
8	0.3	91.2	98.6	98.0
9	0.1	-	-	-
10	0.1	-	-	-
11	0.1	-	-	-
12	0.1	-	-	-
24	0.1	77.8	-	74.1

Die vorhandene transkriptionelle *iolE*-Aktivität unter Wachstumsbedingungen ohne MI deutete auf ein Gedächtnis der Bakterien hin, dass sich durch die Transkription der Gene für die abbauenden Enzyme in der Zelle manifestierte. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Bakterien schnell an die neuen Umgebungsbedingungen anpassten und ihr Gedächtnis für vier Stunden in Abwesenheit des induzierenden Impulses der *iol*-Genexpression aufrechterhalten können. Unter optimalen Wachstumsbedingungen waren die Bakterien nicht lange in der Lage die Enzyme für den Abbau von MI zu produzieren. Dennoch wiesen 0,1 % der Zellen eine aktive Transkription des *iolE*-Gens innerhalb der Population, auch nach längerer Abwesenheit von MI, auf. Durch die Deletion des Repressors stieg die Fluoreszenz, nach einer anfänglichen Abnahme, im weiteren Verlauf des Wachstums wieder an. Durch die Komplementation der *iolR*-Deletion mit dem Vektor pBR-*iolR* wurde der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt.

3.4. IolR bindet seine Zielstruktur, indem es mit zwei Bindestellen interagiert, deren Bindung von unterschiedlichen Affinitäten geprägt ist

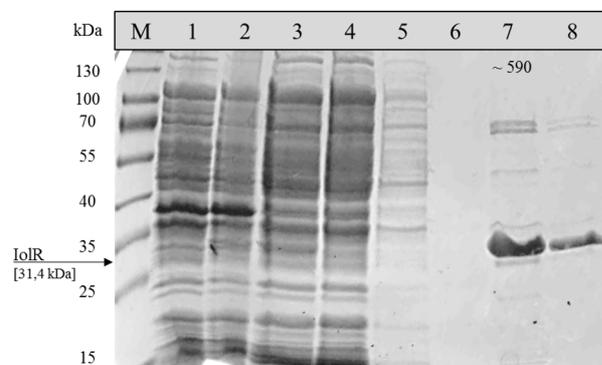
Die Repression der MI abbauenden Gene findet durch IolR, in Abwesenheit des abzubauenen Substrates statt. Das Protein reprimiert die *iol*-Genexpression über die Bindung an die Operatorbereiche der *iol*-Gene, u.a. auch an seinen eigenen Promotor. Um die reprimierende Funktion des Repressors durch Bindung an seine Zielstrukturen näher zu beschreiben, musste IolR mittels gezielter Induktion zur Überexpression gebracht und

durch einen fusionierten Polyhistidin-Anhang aufgereinigt werden. Nach abgeschlossener Reinheits- und Konzentrationsbestimmung des IolR-Proteins wurden Gelmobilitätsstudien und Untersuchungen mittels *Surface Plasmon Resonance Spectroscopy* (SPR-Spektroskopie) durchgeführt. Die Gelmobilitätsstudien sollten die putative Binderegion innerhalb der *iol*-Promotoren eingrenzen und die Anzahl an Bindestellen zwischen den *iol*-Genen identifizieren. Die Proteinkinetik des Repressors mit ausgewählten Promotorregionen wurde mittels SPR-Spektroskopie examiniert.

3.4.1. Proteinaufreinigung und Konzentrationsbestimmung des Repressors IolR für nachgeordnete Anwendungen

Die Aufreinigung des Repressors erfolgte mittels Affinitätschromatographie mit dem kommerziell erhältlichen Aufreinigungssystem von Quiagen, die eine Ni-NTA Säule und Reagenzien enthält. Durch Interaktion des fusionierten Polyhistidin-Anhanges mit den immobilisierten Nickel-Ionen der Nitrilotriessigsäure-Matrix wird ein Chelatkomplex gebildet. Durch eine erhöhte Imidazol-Konzentration wurden die Histidinreste von ihrer Bindestelle verdrängt und das Protein gezielt von der Säule eluiert. Ein geeignetes Expressionssystem zur Überexpression von IolR stand bereits mit dem Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3) pET28b-IolR_{6xHis} zur Verfügung (Kröger & Fuchs, 2009). Nach der gezielten Induktion mit IPTG wurde das Protein nach 12-stündiger Inkubation unter nativen Bedingungen isoliert. Während der Durchführung wurden Proben für die SDS-PAGE genommen, um die erfolgreiche Aufreinigung von IolR und die Reinheit der Fraktionen zu beurteilen. In Abb. 18 wurden die Proben einer IolR-Isolation aus *E. coli* BL21(DE3) pET28b-IolR_{6xHis} auf einer SDS-PAGE aufgetragen, ihrer Größe nach aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung die Proteinanteile sichtbar gemacht.

Abb. 18: Isolation des Repressor IolR mittels Ni-NTA Säule von Quiagen. *E. coli* BL21 pET28b-IolR_{6xHis} wurde in LB-Medium inokuliert und die IolR-Überexpression gezielt induziert. M: Größenstandard [kDa], vor Induktion (1), nach Induktion (2), Filtrat (3), Durchfluss (4), erste Waschfraktion (5), zweite Waschfraktion (6), erstes Eluat (7) und zweites Eluat (8). Eine Konzentrationsbestimmung der ersten Eluatsfraktion erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Bradford und die daraus errechnete Proteinmenge wurde für die Eluatsfraktion (7) in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.



In den Fraktionen des Gesamtzellextraktes war zunächst keine Überexpression von IolR durch eine Bande, die dem Molekulargewicht des Proteins entspricht, zu erkennen (s. Abb. 18 Proben-Tasche 1 - 3). Erst in den beiden Eluatsfraktionen wurde eine Bande bei ~ 32 kDa ersichtlich, die Proteine mit der entsprechenden Größe von IolR enthielt (s. Abb. 18 Proben-Tasche 7 & 8). Ein geringfügiger Anteil an Verunreinigungen durch Proteine, die ebenfalls Histidinreste aufweisen, war in beiden Eluatsfraktionen ebenfalls zu erkennen. Der größte Anteil an Verunreinigungen stellten Proteine mit einer Größe von ~ 70 kDa dar, die durch eine Dimerisierung von IolR zu erklären wären. Die Proteinmenge der ersten Eluatsfraktion wurde mittels Coomassie-Färbung bestimmt und beträgt $590,1 \pm 59,7 \mu\text{g/ml}$ (s. Abb. 18 Proben-Tasche 7). Für die nachfolgenden Untersuchungen der Protein-DNS-Interaktion wurde das aufgereinigte Protein frisch oder für maximal neun Tage, bei 4 °C lagernd, verwendet.

3.4.2. Qualitative Analyse der Interaktion des Repressors mit seiner Zielstruktur mittels Gelmobilitätsstudien

Die Bindung von IolR an die *iol*-Promotoren der genomischen Insel GEI4417/4436 wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen im Detail betrachtet (Kröger & Fuchs, 2009, Kröger *et al.* 2010, Rothardt *et al.* 2014). Für die Gelmobilitätsstudien wurden mittels PCR-Amplifikation Promotorfragmente unterschiedlicher Länge hergestellt, um damit die putative IolR-Bindestelle innerhalb der beschriebenen *iol*-Promotorregionen näher einzugrenzen. Die Fragmente der *iol*-Promotoren *iolR*, *iolT1*, *iolT2*, *iolA*, *reiD*, *iolC1* und *iolD1* wurden ohne und mit steigender Menge an aufgereinigtem IolR-Protein bei RT inkubiert, anschließend auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei 4 °C für 2 Stunden aufgetrennt. Für die Bestimmung des molaren Überschusses des Proteins gegenüber der eingesetzten DNS wurde der Quotient aus den berechneten Stoffmengen der Formel 6 und 7 gebildet. Für jeden Ansatz wurden 100 ng an DNS eingesetzt.

$$n_{\text{Protein}} = \frac{c_{\text{Protein}} \times V_{\text{Protein}}}{M_{\text{Protein}}} \quad \text{(Formel 6)}$$

n	=	Stoffmenge des Proteins [in mol]
c	=	Konzentration des Proteins [in g/μl]
V	=	eingesetztes Volumen des Proteins [in μl]
M	=	molare Masse des Promotorfragmentes [in g/mol]

$$n_{DNS} = m_{DNS} \times \frac{1}{N} \times \frac{1}{649} \text{ mol/g} \quad \text{(Formel 7)}$$

n	=	Stoffmenge der DNA [in mol]
m	=	eingesetzte DNS-Menge [in g]
N	=	Anzahl der Nukleotide des eingesetzten Promotorfragmentes
649 g/mol	=	durchschnittliche molare Masse eines Basenpaares

Um eine unspezifische Bindung von IolR auszuschließen, wurde als Negativ-Kontrolle die Promotorregion des Haushalts (*housekeeping*)-Gen *argS* in jeder Gelmobilitätsstudie mitgeführt. Das Gen *argS* kodiert für eine Arginyl-tRNA Synthetase, die Aminosäuren mit ihren spezifischen tRNA-Molekülen kovalent verbindet. Es wurde entweder ein 195 bp oder 312 bp langes *argS*-Promotorfragment verwendet. Die DNS bzw. der Protein-DNS-Komplex wurde nach der Inkubation auf einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Hilfe einer GelRed-Färbung sichtbar gemacht. Die Gelmobilitätsstudien für die Bindung von IolR an die *iol*-Promotoren sind in einer Übersicht der gesamten genomischen Insel GEI4417/4436 in Abb. 19 dargestellt.

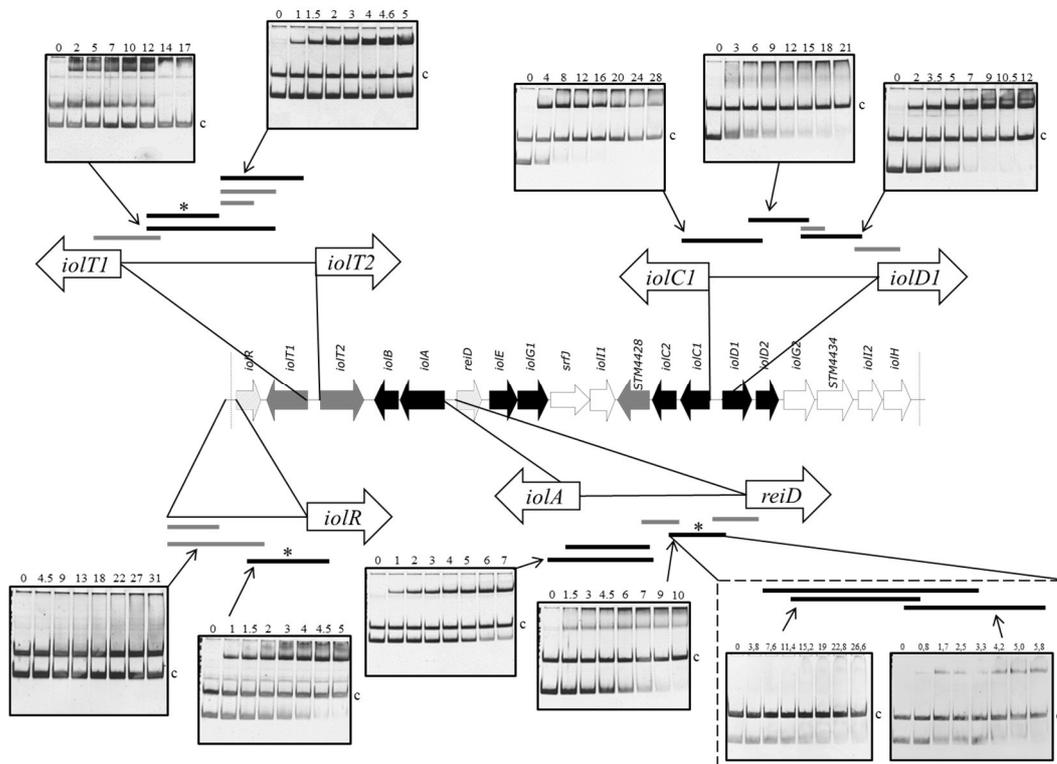


Abb. 19: Bindung von IolR an verschiedene Promotorbereiche innerhalb der genomischen Insel GEI4417/4436. Die für die Gelmobilitätsstudien herangezogenen Regionen der genomischen Insel wurden hervorgehoben und die verschiedenen Fragmente darüber abgebildet. Die schwarzen Fragmente zeigten eine Bindung von IolR und die grauen Fragmente nicht. Der molare Überschuss des Proteins wurde mit aufgeführt, wobei der ersten Proben-Tasche kein IolR zugefügt wurde. Das Promotorfragment von *argS* (100 ng) diente als Negativ-Kontrolle (C). Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Fragmente wurden für die SPR-Spektroskopie ausgewählt.

Nicht alle der getesteten Fragmente zeigten eine Bindung des Repressors, was die Lokalisation der putativen IolR-Bindestelle innerhalb der Promotorregionen näher eingrenzte. Die in Abb. 19 dargestellten schwarzen Fragmente, die über der hervorgehobenen Promotorregion dargestellt sind, zeigten in der Untersuchung eine Bindung des Repressors. Die Zugabe von IolR in einem molaren Überschuss von 4,5 bei P_{iolR} , 7 bei P_{iolA} , P_{reiD} sowie P_{iolD1} , 8 bzw. 12 bei den beiden P_{iolC1} -Fragmenten, 14 bei P_{iolT1} und > 5 bei P_{iolT2} führte zur Bildung einer retardierten Bande, die den Protein-DNS-Komplex repräsentierte. Das Kontrollfragment des *argS*-Promotors wies eine gleichbleibende Bandenintensität unabhängig von der Menge an Protein auf und bestätigte dadurch die spezifische Bindung des Repressors an die Zielstrukturen. Der erste Reaktionsansatz jeder Gelmobilitätsstudie enthielt kein IolR-Protein als Beweis dafür, dass es nur durch Zugabe des Proteins zu einer retardierten Bande kam. Eine weitere Erhöhung der IolR-Menge führte bei allen gebundenen *iol*-Promotoren außer dem *iolT2*-Promotorfragment zum völligen Verschwinden der Promotor-DNS-Fragmente. Diese Untersuchung bestätigte die Bindung von IolR an P_{iolR} , P_{iolT1} , P_{iolT2} , P_{iolA} , P_{reiD} , P_{iolC1} und P_{iolD1} bei einem 4,5- bis 12-fachen Überschuss des Repressors. Die putative Bindestelle von IolR wurde innerhalb dieser *iol*-Promotoren auf eine minimale Länge von 125 bp innerhalb des *reiD*-Promotors eingegrenzt. Durch die von IolR gebundenen DNS-Fragmente, die sich auch teilweise überlappen, wurden mehrere IolR-Bindestellen zwischen den Promotorregionen von *iolA* und *reiD*, *iolC1* und *iolD1* sowie für *iolT1* und *iolT2* identifiziert. Des Weiteren wurden zwei Banden für den Protein-DNS-Komplex bei der Bindung von IolR mit den *iolT1*-, *iolD1*-, *iolR*-, *iolC1*- und *reiD*-Promotoren erkannt. Dies kann durch eine zunehmende Proteinbindung an den Protein-DNS-Komplex erklärt werden, wodurch dieser in seiner Wanderungsgeschwindigkeit durch die Gelmatrix noch stärker zurückgehalten wurde. Diese Beobachtung deutete auf eine stattfindende Oligomerisierung von IolR während seiner Bindung an die DNS hin. In einer weiteren Gelmobilitätsstudie wurden zwei kleine Fragmente des *reiD*-Promotors mit einer Länge von 74 und 81 bp erzeugt, dessen Sequenz sich nur um 7 Nukleotide überlappte. Beide Fragmente wurden von dem Repressor gebunden, was auf die Anwesenheit von zwei unabhängigen IolR-Bindestellen der Promotorregion von *reiD* hindeutete (s. Abb. 19). Der molare Überschuss von IolR, der zur vollständigen Bindung des jeweiligen Fragmentes benötigt wurde, variiert zwischen den *reiD*-Promotorbereichen. Für das 74 bp-Fragment wird ein molarer Überschuss von ~ 22 benötigt, wohingegen das 81 bp Fragment eine Menge von < 10 für die Bildung eines Protein-DNS-Komplexes benötigt.

Ausgewählte Fragmente der *reiD*-, *iolR*- und *iolTI*-Promotorregionen wurden für die nachfolgende SPR-Spektroskopie herangezogen und sind mit einem Sternchen in Abb. 19 markiert.

3.4.3. Quantitative Analyse der Interaktion des Repressors mit seiner Zielstruktur auf der DNS mittels Oberflächen-Resonanz-Spektroskopie

Die Untersuchung molekularer Interaktionen mittels SPR-Spektroskopie basiert auf einem optischen Biosensor, welcher die Messung spezifischer Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit ermöglicht. Auf der Sensoroberfläche ist der Ligand immobilisiert und der Analyt wird im Durchflussverfahren in der mobilen Phase vorbeigeführt. An der Rückseite des Sensors wird polarisiertes Licht eingestrahlt und von der goldbeschichteten Oberfläche wieder reflektiert. Durch die Bildung eines Analyt-Ligand-Komplexes erhöht sich die Masse an der Sensoroberfläche, welche anhand der Änderung des Winkels des einfallenden Lichtes vom optischen Sensor detektiert wird. Diese Änderung wird als RU (*Response Unit*, RU) bezeichnet und im zeitlichen Verlauf eines Experimentes in einem Sensogramm dargestellt. Die Interaktionen des Repressors mit den immobilisierten DNS-Fragmenten der *iol*-Promotoren P_{iolR} , P_{reiD} und P_{iolTI} wurde in Abb. 20 dargestellt. Es wurden mehrere Sensogramme des IolR-Proteins in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 330 nM für die einzelnen *iol*-Promotoren aufgenommen und in einem gemeinsamen Sensogramm abgebildet.

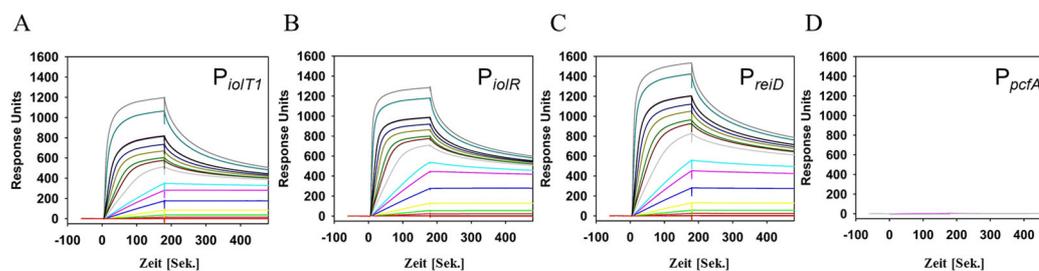


Abb. 20: Verlauf der Bindung und Dissoziation des Repressors an die *iolTI*-, *iolR*-, *reiD*- und *pcfA*-Promotorfragmente. Die mit Biotin markierten DNS-Fragmente P_{iolTI} (A), P_{iolR} (B), P_{reiD} (C) und das Kontroll-Fragment P_{pcfA} (D) wurden auf einem mit Streptavidin-beschichteten Sensorchip immobilisiert und aufgereinigtes IolR mit den Konzentrationen 0; 0,066; 0,165; 0,33; 0,66; 1,65; 3,3; 4,95; 6,6; 13,2; 19,8; 26,4; 33; 49,5; 66 (schwarze und lila Linie als interne Referenz mitgeführt); 165 und 330 nM mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei 25 $^{\circ}\text{C}$ injiziert. Die Assoziationszeit betrug 180 Sekunden, gefolgt von 300 Sekunden Dissoziationszeit. Die ansteigende RU korrelierte mit der steigenden IolR-Konzentration in der mobilen Phase.

Aus den Sensogrammen wurde eine spezifische Interaktion des Repressors mit dem *iolTI*-, *iolR*- und *reiD*-Promotor anhand des Kurvenverlauf bestätigt (s. Abb. 20 A-C). Eine Interaktion des Repressors mit dem Kontrollpromotor P_{pcfA} wurde nicht detektiert (s. Abb. 20 D). In den ersten 180 Sekunden wurde der Repressor in die mobile Phase

injiziert und an der Sensoroberfläche vorbeigeführt. Dieser Zeitraum wird als Assoziationsphase bezeichnet und äußerte sich in einem Anstieg der RU, die durch Bindung von IolR an die immobilisierten DNS-Fragmente auf dem Biosensor zu erklären war. Im Idealfall zeigt sich bei einer monovalenten Interaktion von Ligand und Analyt ein hyperbolischer Kurvenverlauf, das heißt: mit steigender Anzahl gebundener Moleküle nähert sich die RU seinem maximalen Wert immer mehr an, da durch die Abnahme der freien Bindungsstellen ein Sättigungseffekt eintritt. Die Kurven zeigten jedoch während dieser Phase keinen hyperbolischen Verlauf, was auf verschiedene Bindungsvorkommen innerhalb eines Promotorfragmentes hindeutete. Nachdem die Injektion des Repressors nach 180 Sekunden gestoppt wurde, war die RU im Sensogramm auf einen Maximalwert in Abhängigkeit der Menge des IolR-Liganden angestiegen. Die Flusszelle wurde anschließend für 300 Sekunden mit Waschpuffer gespült. Diese Phase wird als Dissoziationszeit bezeichnet und äußerte sich in einem Absinken der RU, was mit dem Ablösen des Repressors von seiner DNS-Zielstruktur gleichzusetzen war. Der Kurvenverlauf der Dissoziation war von einer langsamen Abnahme der RU in Abhängigkeit der Zeit geprägt, welche am Endpunkt der Messung den Ausgangswert der RU nicht wieder erreichte. Die Sensogramme der *iol*-Promotoren zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf und die maximal erreichte Bindungskapazität lag zwischen 1.200 bis 1.500 RU. Bei maximaler RU liegt eine Sättigung der Bindestellen mit dem Liganden vor. In Formel 8 ist die Berechnung der theoretisch maximalen Bindungskapazität (R_{max}) für die DNS-Fragmente dargestellt. Die immobilisierte Menge an *iol*-Promotorfragment betrug 47,6 RU für das P_{iolR} -DNS-Fragment, 51,9 RU für das P_{reiD} -DNS-Fragment und 63,8 RU für das P_{iolTI} -DNS-Fragment. Ausgehend von der Berechnung wurde eine Bindungskapazität bei einer monovalenten Interaktion von ~ 20 RU ermittelt. Die gemessene R_{max} zwischen IolR und den Promotorfragmenten lag jedoch über 1.000 RU, was die Vermutung nahelegte, dass IolR als höheres Oligomer an die DNS-Fragmente bindet, oder dass eine zusätzliche Bindestelle innerhalb der *iol*-Promotorregion vorhanden ist.

$$R_{max} = \frac{MW_{Analyt} [Da]}{MW_{Ligand} [Da]} \times M_{DNS} [RU] \times v_i \quad \text{(Formel 8)}$$

MW_{Analyt}	=	Molekulargewicht des IolR-Proteins mit $\sim 31,4$ kDa
MW_{Ligand}	=	Molekulargewicht der Promotorfragmente mit ~ 100 kDa
M_{DNS}	=	immobilisierte DNS-Menge in Response Units [RU]
v_i	=	stöchiometrisches Verhältnis der Bindung, entspricht 1 bei einer monovalenten Interaktion

Im Folgenden wurde der Anteil an funktionalem Protein mit Hilfe einer kalibrierungsunabhängigen Konzentrationsanalyse (*calibration-free concentration analysis*, CFCA) berechnet. Diese Methode basiert auf der SPR-Spektroskopie, indem durch Messung von Bindungsraten bei variierender Flussrate der Anteil an „aktiven“ Analyt kalkuliert wird. Durch Kenntnis des Molekulargewichtes und Diffusionskoeffizienten des Analyten kann die Konzentration berechnet werden. Der Diffusionskoeffizient für IolR betrug laut *Biacore diffusion constant calculator and converter webtool* (<http://www.biacore.com>) $9,946 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Die Berechnung ergab eine „aktive“ Protein-Konzentration von 33 nM für den Repressor (s. Tab. 17). Diese wurde den nachfolgenden Berechnungen der Gleichgewichts- bzw. Geschwindigkeitskonstanten zugrunde gelegt.

Tab. 17: Die Bestimmung der gemittelte „aktive“ IolR-Proteinkonzentration durch eine kalibrierungsunabhängige Konzentrationsanalyse. Die Bindungsraten des Repressors an das P_{IolR}-Fragment wurden bei variierender Flussrate gemessen. V_f: Verdünnungsfaktor. Für die gemittelte Konzentration an IolR-Protein wurden die fettgedruckten Werte herangezogen.

V _f	gemessene Konz. [M]	errechnete Konz.	Standardfehler	\bar{x} [M]
1	$3,4 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-8}$	$9,8 \times 10^{-11}$	
2	$1,6 \times 10^{-8}$	$3,3 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-10}$	
5	$6,7 \times 10^{-9}$	$3,4 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-11}$	$3,3 \times 10^{-8}$
10	$3,1 \times 10^{-9}$	$3,1 \times 10^{-8}$	$7,8 \times 10^{-11}$	
20	$1,2 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-8}$	$8,3 \times 10^{-11}$	

Wenn die RU gegen die Analytkonzentration aufgetragen wird, ergibt sich eine Sättigungskurve; das heißt: mit steigender Anzahl gebundener Moleküle nähert sich die RU seinem maximalen Wert immer mehr an, da durch die Abnahme der freien Bindungsstellen ein Sättigungseffekt eintritt. Der K_D-Wert stellt die Konzentration an freiem Analyt dar, bei der die Hälfte aller Bindungsstellen belegt ist. Dieser Wert spiegelt die Bindungsstärke bzw. Affinität eines Analyten gegenüber seinem Bindungsmotiv auf der DNS wieder; anders ausgedrückt: ist der K_D-Wert groß, wird eine Sättigung erst bei einer hohen Analytkonzentration erreicht, und zwischen den Bindungspartnern besteht eine schwache Affinität, wobei bei einem kleinen K_D-Wert die Sättigung schon bei geringer Analytkonzentration auftritt und die Partner eine starke Affinität zueinander aufweisen. Um zuverlässige Werte für die Gleichgewichtskonstanten k_a/k_d und die Affinität K_D zu erhalten, wurde eine *InteractionMap* (IM) Analyse durchgeführt. Durch eine mathematische Evaluierungsfunktion können heterogene Interaktionen innerhalb

eines in Echtzeit gemessenen Sensogrammes identifiziert werden. Eine IM-Analyse gibt nicht nur Aufschluss über die Anzahl an parallel ablaufenden monovalenten Bindungen, sondern auch über deren Gewichtung innerhalb einer gemessenen Interaktionskurve. Dabei erhielt jede beteiligte Interaktion eine einzigartige Kombination aus k_a - und k_d -Werten, die als Pixel im Interaktionsmodell dargestellt wurden (s. Abb. 21). Die Farbintensität der sich zu einem Punkt zusammengeschlossener Pixel repräsentiert den Gewichtungsfaktor dieser spezifischen Interaktion. Das sich daraus ergebende Bild gibt Aufschluss über den Bindemechanismus der Interaktion zwischen dem Repressor IolR zu einem ausgewählten *iol*-Promotor. Die Analyse beruhte auf den Daten der Sensogramme der Interaktion von IolR mit dem *iolT1*-Promotor aus Abb. 20 A.

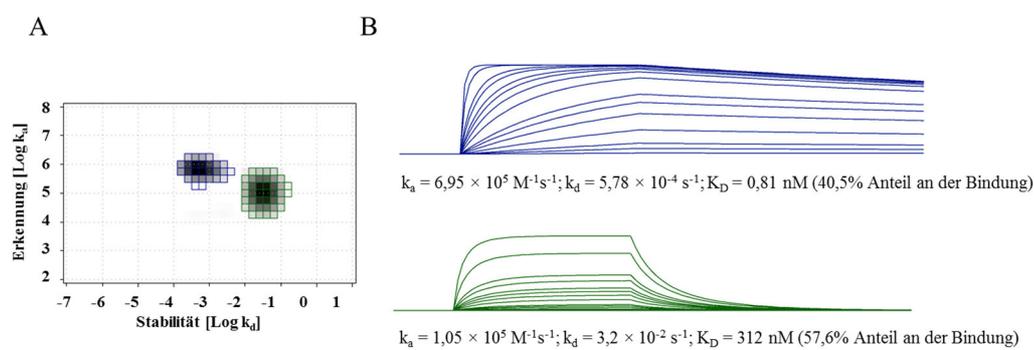


Abb. 21: InteractionMap Analyse der IolR-Bindung an den *iolT1*-Promotor. Die Anzahl der identifizierten Interaktionen von IolR mit dem *P_{iolT1}*-DNS-Fragment (A) und die dazugehörigen Sensogramme mit den spezifischen K_D -Werten bzw. Gleichgewichtskonstanten k_a/k_d (B) wurden abgebildet. Das blaue Sensogramm wurde dem blauen Punkt und das grüne Sensogramm dem grünen Punkt des Interaktionsmodelles zugeordnet. Die kalkulierte Affinität als auch die Geschwindigkeitskonstanten wurden unter dem jeweiligen Sensogramm aufgeführt.

Durch die IM-Analyse wurden zwei klar voneinander getrennte Interaktionen während der Bindung von IolR an den *iolT1*-Promotor identifiziert, denen unterschiedliche Affinitäten zu Grunde lagen. Der blaue Punkt repräsentierte eine Interaktion, die einen Anteil von 40,5 % an der Gesamtbindung hatte, mit einer Assoziationsrate von $6,95 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und einer Dissoziationsrate von $5,78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Durch die Geschwindigkeitskonstanten wurde eine hohe Affinität mit einem K_D -Wert von 0,81 nM bestimmt. Der grüne Punkt repräsentierte die andere Interaktion, die eine Gewichtung von 57,6 % an der Gesamtbindung mit einer Assoziationsrate von $1,05 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aufwies. Die Dissoziationsrate betrug $3,2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und war 50-fach höher als bei der anderen Interaktion, was zu einer geringeren Affinität mit einem hohen K_D -Wert von 312 nM führte. Zusammenfassend zeigte die IM-Analyse zwei IolR-Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität innerhalb eines Teilfragmentes der *iolT1*-Promotorregion. Die

eine Bindestelle wies eine hohe Affinität mit einer schnellen Assoziationsrate und einer langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit auf, während die andere Bindestelle eine 400-fach geringere Affinität mit einer schnellen Assoziation und einer schnellen Dissoziationsrate hatte. Jede Interaktion trug mit einer Gewichtung von $\sim 50\%$ an der Gesamtbindung bei, wodurch jede DNS-Bindestelle von einer gleichen Anzahl an IolR-Molekülen gebunden wurde. Durch die Kenntnis über das Bindungsverhalten von IolR an seine Zielstruktur wurden mit einem angepassten *OneToTwo* Algorithmus innerhalb der TraceDrawer Software (v 1.5) die K_D -Werte bzw. die Gleichgewichtskonstanten der Interaktionen mit dem *iolR*- und *reiD*-Promotor ermittelt. Die Parameter der Bindungskinetik von IolR und den untersuchten *iol*-Promotoren wurden in Tab. 18 zusammengefasst. Es zeigte sich ein ähnliches Bild der Interaktionen im Vergleich zur Untersuchung der Affinität zwischen IolR und P_{iolT1} .

Tab. 18: Werte für die Gleichgewichtskonstanten (k_a/k_d) und der Affinität (K_D) während der Interaktion von IolR mit dem *iolT1*-, *iolR*- und *reiD*-Promotorfragmenten. Die Anteile der Interaktionen an der Gesamtbindung wurden nur für die Bindung von IolR mit P_{iolT1} bestimmt.

	Assoziation	Dissoziation	Affinität	Anteil an der Bindung
	k_a	k_d	K_D	[%]
	$[M^{-1} s^{-1} * 10^5]$	$[s^{-1} * 10^{-2}]$	[nM]	
P_{iolT1}	6,95	0,06	0,8	40,5
	1,05	3,2	312	57,6
P_{iolR}	2,4	0,14	6,0	-
	1,3	5,5	425	-
P_{reiD}	2,1	0,14	6,6	-
	1,5	4,9	321	-

Für die Promotoren P_{iolR} und P_{reiD} zeigten sich ebenfalls zwei Interaktionen mit unterschiedlichen Affinitäten. Die Interaktionen mit geringer Affinität ergaben K_D -Werte von 425 nM für die IolR- P_{iolR} -Interaktion bzw. 321 nM für die IolR- P_{reiD} -Interaktion und die mit starker Affinität waren von geringen Werten von 6,0 nM für die IolR- P_{iolR} -Interaktion bzw. 6,6 nM für die IolR- P_{reiD} -Interaktion gekennzeichnet. Die ermittelten K_D -Werte bewegten sich für alle Promotorfragmente in einem nanomolaren Bereich und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

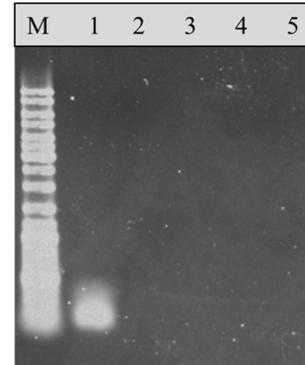
3.4.4. Methodenetablierung zur Identifizierung der IolR-Bindestelle mittels DNA-Protektionsexperiment und anschließender Subklonierung

Das DNA-Protektionsexperiment ist eine Methode zur Bestimmung der Basensequenz eines DNA-bindenden Proteins. Sie beruht darauf, dass ein DNA-bindendes Protein durch die Bindung seiner DNS-Zielstruktur, diese vor dem Abbau der Desoxyribonuklease (DNase I) schützt. Die Nukleotidsequenz kann durch den Zwischenschritt der Subklonierung in einen Vektor sequenziert werden, da eine direkte Sequenzierung durch die unbekannte kurze Nukleotidabfolge nicht möglich ist. Es sind viele kommerziell erwerbliche Vektorsysteme erhältlich, die eine Einbringen einer unbekanntem DNS-Sequenz erleichtern. In dieser Arbeit wurde versucht die IolR-Bindestelle innerhalb des *iolR*- bzw. *reiD*-Promotorfragmentes mit einem abgewandelten DNA-Protektionsexperiment und anschließender Subklonierung in ein kommerziell erhältliches Vektorsystem zu identifizieren. Dafür wurde das Protein mit dem *iol*-Promotorfragment inkubiert und durch anschließenden DNase-Verdau wird die ungebundene Nukleotidsequenz hydrolysiert, so dass nur die von IolR gebundene DNS-Zielstruktur vorliegt. Nach dem Ablösen des Repressor-Proteins von der intakten Nukleotidsequenz sollte diese mittels Ligation in ein kommerzielles erwerbliches Vektorsystem eingebracht und nach dessen Sequenzierung die Identifizierung der Nukleotidsequenz der IolR-Zielstruktur erfolgen.

Das IolR-Proteine wird wie bereits beschrieben aufgereinigt (s. 2.3.1.2) und die DNS-Fragmente des *iolR*- und *reiD*-Promotors unter Verwendung der jeweiligen Oligonukleotide (s. Tab. 21) mittels PCR amplifiziert. Zunächst wird in einer Gelmobilitätsstudie der molare Überschuss an Repressor-Molekülen bestimmt, der notwendig ist, um 100 ng *iol*-Promotorfragment in einem Protein-DNS-Komplex zu binden (s. 2.3.2.1). Für die Durchführung des DNA-Protektionsexperimentes mussten mehrere Vorversuche für die erforderliche Menge an DNase I und für das Ablösen des Repressors von seiner Bindestelle erfolgen. Nur wenn die Nuklease die ungebundene DNS vollständig hydrolysiert, kann in der Subklonierung gewährleistet werden, dass nur die DNS-Zielstruktur des Repressor eingebracht wird. Der Reaktionsansatz wurde nach Herstellerangaben mit 100 ng des *reiD*-Promotorfragmentes und einer steigenden Menge der DNase I (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) von 0 bis 3 U angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C und anschließend für die Nuklease für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert. Um die Anwesenheit unverdauter Nukleotidsequenzen

nachzuweisen, wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNS mittels UV-Transillumination sichtbar gemacht (s. Abb. 22). Bereits der Einsatz von 0,5 U DNase I im Reaktionsansatz konnte das *reiD*-Promotorfragment vollständig hydrolysieren.

Abb. 22: Ermittlung der Menge an DNase I zur Gewährleistung des vollständigen Verdaus der ungebundenen DNS-Fragmente. Eingesetzt wurden 100 ng des 125 bp *reiD*-Promotorfragmentes das mit ansteigender Menge an DNase I versetzt wurde. M: Längenmarker [bp], Negativ-Kontrolle ohne DNase I (1), 0,5 U (2), 1 U (3), 2 U (4) und 3 U DNase I.



Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Bedingungen der Nuklease-Inaktivierung eine Separation des Repressors von seiner DNS-Zielstruktur zulässt, da es bei Protein-gebundener Nukleotidsequenzen zu Störungen bei der anschließenden Ligation in das Vektorsystem kommen kann. Für die Untersuchung des Ablösens des Repressor wurde ein Reaktionsansatz der Gelmobilitätsstudie mit dem *iolR*-Promotorfragment und steigender *iolR*-Menge unbehandelt und nach Hitzebehandlung bei 65 °C für 10 Minuten auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen (s. Abb. 23). Die Inaktivierung nach Herstellerangaben der DNase I ist für ein Ablösen des Repressors von den DNS-Fragmenten ausreichend, da keine Bande des Protein-DNS-Komplexes nach der Hitzebehandlung mehr zu erkennen ist und sich das ungebundene P_{iolR} -Fragment wieder ungehindert in der Gelmatrix bewegen kann (s. Abb. 23 B).

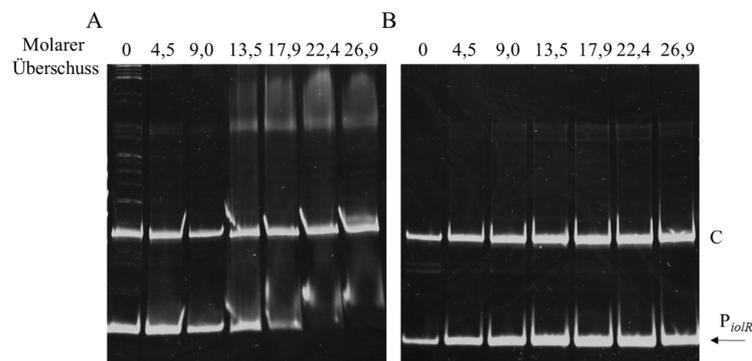


Abb. 23: Bedingungen der Hitzeinaktivierung der DNase I erzielt ein gleichzeitiges Ablösen des *IolR*-Repressors von seiner DNS-Zielstruktur innerhalb des *iolR*-Promotorfragmentes. Nach der Inkubation der DNS-Fragmente mit dem Repressor wurden die Proben entweder unbehandelt (A) oder nach Hitzebehandlung von 65 °C für 10 Minuten (B) auf das native Polyacrylamidgel aufgetragen. Der molare Überschuss des Proteins wurde mit aufgeführt, wobei der ersten Proben-Tasche kein *IolR* zugefügt wurde. Das Promotorfragment von *argS* (100 ng) dient als Negativ-Kontrolle (C).

Anhand der etablierten Versuchsbedingungen ergibt sich der folgende schematische Ablauf der Versuchsdurchführung für das abgewandelte DNA-Protektionsexperiment zur Gewinnung einer intakten Nukleotidsequenz der IolR-Bindestelle (s. Abb. 24).

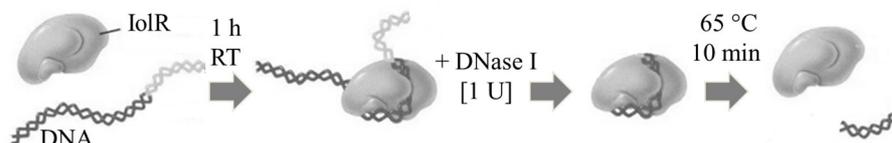


Abb. 24: Schematische Darstellung des abgewandelten DNA-Protektionsexperimentes mit den etablierten Bedingungen zur Identifizierung der IolR-Bindestelle innerhalb der *iol*-Promotoren. Zunächst wird der Repressor mit einem molaren Überschuss von ~20 mit 100 ng eines *iol*-Promotorfragmentes für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 1 U DNase I versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Nuklease-Inaktivierung und das gleichzeitige Ablösen des Repressors von seiner DNS-Zielstruktur erfolgt bei 65 °C für 10 Minuten. Der Reaktionsansatz wird anschließend für die Subklonierung in ein kommerzielles Vektorsystem verwendet.

Das DNA-Protektionsexperiment wurde nach Abschluss der Methodenetablierung im 10-fachen Reaktionsansatz angesetzt, um die Ausbeute an intakter Nukleotidsequenz zu erhöhen. Die inaktivierten Reaktionsansätze wurden zusammengeführt und für die nachfolgende Subklonierung oder Kapillarelektrophorese herangezogen. Die Subklonierung in ein kommerzielles Vektorsystem erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden die zwei kommerziellen Klonierungssysteme für die Subklonierung herangezogen, das pCRTM4Blunt-TOPO[®] von Invitrogen (Darmstadt, DE) und das StrataClone pSC-B System von Agilent Genomics (Santa Clara, CA, USA). Die religierten Vektoren werden mittels Transformation in einen Bakterienstamm eingebracht (s. 2.2.5.2) und wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben langfristig in diesen gelagert werden. Nach der Anfertigung einer ÜNK der Bakterienstämme werden die Plasmide isoliert (s. 2.2.2.2) und anschließend sequenziert (2.2.6). Auch nach mehrfach durchgeführten Transformation des Reaktionsansatzes unter Zuhilfenahme des Vektorsystems pCRTM4Blunt-TOPO[®] von Invitrogen konnten keine Kolonien auf dem Selektionsmedium beobachtet werden. Es wurde in einem erneuten Versuch das StrataClone pSC-B Vektorsystem von Agilent verwendet. Nach vorangegangener Dephosphorylierung des Reaktionsansatzes nach Herstellerangaben mit der FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, Waltham, USA) erfolgte die Subklonierung mit anschließendem Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Kanamycinzusatz. Nach der Inkubation der Agarplatten für 24 Stunden bei 37 °C wurden 160 Kolonien ausgezählt. Es wurden Reinigungsausstriche von $\frac{1}{10}$ der gewachsenen Kolonien auf LB-Agarplatten mit Kanamycinzusatz angefertigt und die Plasmide von

diesen Bakterienstämmen nach ihrer Isolation zum Sequenzieren zu GATC Biotech (Konstanz, DE) verschickt. Von den insgesamt 16 Sequenzierungsaufträgen konnte keine Insertion einer Nukleotidsequenz festgestellt werden.

Im Folgenden wurde getestet, ob sich nach dem DNA-Protektionsexperiment überhaupt DNS-Fragment in der Lösung befindet. Die Existenz und Anreicherung einer intakten Nukleotidsequenz der DNS-Bindestelle von *IoIR* nach dem DNase-Verdau wurde mittels Kapillarelektrophorese überprüft. Die DNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld ihrer Länge entsprechend und ihrer Retentionszeit wird anhand eines Fluoreszenzsignals detektiert. Die Kapillarelektrophorese wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA) und unter Verwendung des *high sensitive DNA Assay Kits* durchgeführt. Dazu wurden die Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-11} des inaktivierten Reaktionsansatzes des DNA-Protektionsexperimentes untersucht. Das Ergebnis der Kapillarelektrophorese wurden mit der 2100 Expert Software von Agilent ausgewertet und beispielhaft für die 10^{-7} Verdünnung des Reaktionsansatzes abgebildet (s. Abb. 25). Alle Verdünnungsstufen des Reaktionsansatzes zeigten, dass nur eine Detektion der beiden Längenmarker der in der Probe mitgeführten internen Kontrolle mit 35 bp und 10,3 kb erfolgte. Es wurde kein weiteres DNS-Fragment in dem Reaktionsansatz detektiert, dass über der instrumentellen Nachweisgrenze von dem Agilent 2100 Bioanalyser lag. Durch diese Untersuchung war es nicht möglich die freie DNS durch die Kapillarelektrophorese unter Verwendung des *high sensitive DNA Assay Kits* im inaktivierten Reaktionsansatz nachzuweisen.

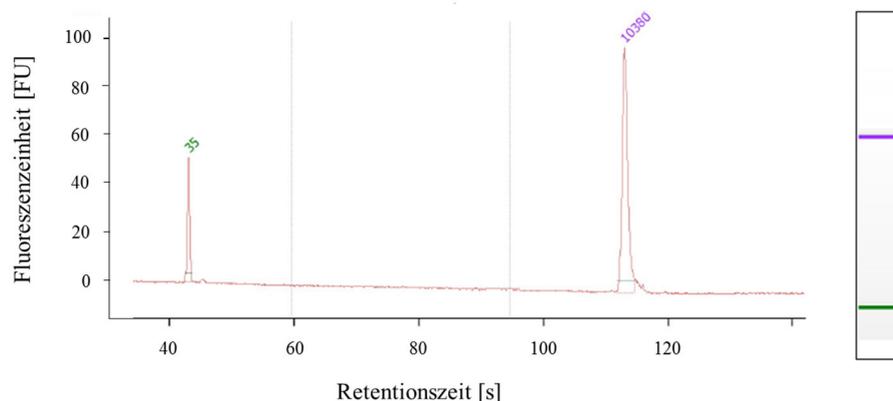


Abb. 25: Kapillarelektrophorese der verdauten *ioIR*-Promotorregion nach Hitzeinaktivierung. Die Messung des verdauten Reaktionsansatzes nach Nuklease-Inaktivierung erfolgt im Agilent 2100 Bioanalyser nach Herstellerangabe unter Verwendung des *high sensitive DNA Assay Kits*. Die Detektion der DNS-Fragmente erfolgt über ein Fluoreszenzsignal und anhand der Retentionszeit kann auf die Länge der Nukleotidsequenz geschlossen werden. Durch die Verwendung einer internen Kontrolle können die beiden Längenmarker erkannt und die Funktionalität der Untersuchung bestätigt werden.

3.5. Aufreinigung und Untersuchung von ReiD

Die Aktivierung der *iol*-Gene findet durch ReiD in Anwesenheit des abzubauenen Substrates über dessen Bindung an die Operatorbereiche der Gene, u.a. auch seines eigenen Promotors, statt. Um die Funktion des Aktivators durch Bindung an seine Zielstrukturen innerhalb der genomischen Insel GEI4417/4436 näher zu beschreiben, musste für ReiD zunächst ein geeignetes Überexpressionssystem etabliert werden. Nach Isolierung und Rückfaltung sollte ReiD auf seine Funktionalität mit Hilfe von Gelmobilitätsstudien getestet werden.

3.5.1. Effiziente Überexpression des Aktivators mittels pBAD-Vektorsystem im Arabinose-defizienten Hintergrund von *Salmonella*

Um ReiD in großen Mengen zu isolieren, wurden die bereits vorliegenden Expressionsvektoren pBAD-Myc/HisC-*reiD* und pET28-*reiD* verwendet (s. Tab. 4). Zusätzlich zum pET28b-Vektor musste pTARA mit in die Salmonellen eingebracht werden, welches ein Gen für die T7-Polymerase enthält und unter der Kontrolle des Arabinosepromotors steht. Da Arabinose als Induktor für die Expression der Plasmide pBAD-Myc/HisC-*reiD* und pTARA verwendet werden musste, wurden zwei Deletionsmutanten erstellt, denen die Fähigkeit zum Abbau von Arabinose fehlte. Dafür wurden zwei Gene des *ara*-Operons für die Deletionsmutagenese ausgewählt, die bei der Verstoffwechslung der Arabinose eine zentrale Rolle spielen. Das Gen *araA* kodiert für das erste von drei Arabinose-abbauende Enzymen und das Gen des Regulators AraC, der als Sensor für die Arabinosekonzentration die Expression von *araB*, *araA* und *araD* kontrolliert. Durch die Deletion dieser beiden Gene soll eine effiziente Induktion des pBAD-Vektors durch Arabinose ermöglicht werden, da dieser Zucker nicht mehr von den Bakterien verstoffwechselt werden kann.

Mit Hilfe der Phagentransduktion wurde die Kanamycin-Resistenzkassette mit den flankierenden Bereichen der beiden Gene *araA* bzw. *araC* durch homologe Rekombination in das *Salmonella* Genom eingebracht. Durch eine Passage auf Indikatorplatten (*green plates*) mit 50 µg/ml Kanamycin wurden die Bakterien mit erfolgreicher Insertion anhand der Resistenzausbildung selektiert. Durch die dem Agar zugesetzten pH-Farbindikatoren können infizierte Bakterien anhand ihrer Koloniefarbe erkannt werden: dunkelgrüne Kolonien mit niedrigem pH-Wert zeigten eine fortgeschrittene Zelllyse infolge einer Phageninfektion an und weiße Kolonien enthielten

keine lytischen Phagen mehr. Durch eine weiterführende Passagierung weißer Kolonien auf Indikatorplatten wurden die Bakterien von den Phagen befreit. Ein Überkreuzausstrich diente als Nachweis für die Befreiung der Bakterien von lysogenen Phagen (s. Abb. 26). Für diesen Ausstrich wurden weiße Kolonien der zu testenden Deletionsmutanten, der Stamm 14028 als Positiv-Kontrolle und eine noch mit Phagen infizierte dunkelgrüne Kolonie von einer früheren Passage als Negativ-Kontrolle verwendet. Diese Stämme wurden auf einer Indikatorplatte mit einer vertikal verteilten P22-Phagensuspension ausgestrichen, so dass die Bakterien diese durchkreuzten und erneut den Phagen ausgesetzt wurden. Bakterien, die nicht frei von Phagen sind, zeigen eine Resistenz gegenüber einer erneuten Infektion und sind an einem ausbleibenden Farbumschlag in Form von weißen Kolonien zu erkennen. Nach der Inkubation des Ausstriches wurde eine Infektion der Deletionsmutanten und 14028, in Form von dunkelgrünen Kolonien angezeigt (s. Abb. 26). Die Negativ-Kontrolle zeigte, dass der Bakterienstamm bereits mit Phagen infiziert war, bevor die Zellen mit den Phagen erneut in Kontakt kamen.

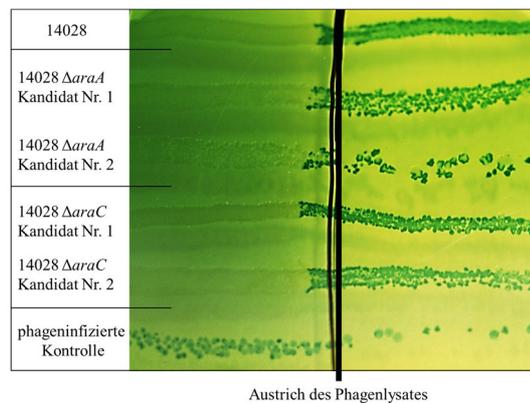
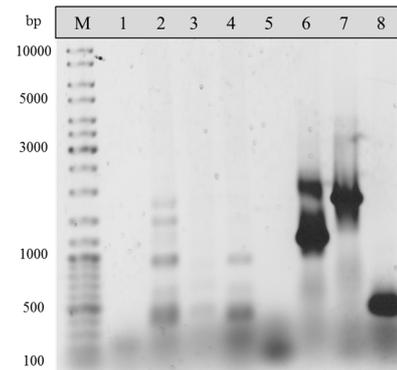


Abb. 26: Kontrolle auf phagenfreie Arabinose-defiziente Salmonellen nach der Phagentransduktion mittels Überkreuzausstrich. Der Wildtypphage P22 wurde in vertikaler Richtung mittig auf einer Indikatorplatte aufgetragen und die zu testenden Kolonien von links nach rechts durch die Phagensuspension gestrichen. Als Kontrolle diente der Bakterienstamm 14028 und eine grüne noch mit Phagen infizierte Kolonie. Von der durchgeführten Phagentransduktion wurden je zwei Kandidaten von 14028 $\Delta araA$ und 14028 $\Delta araC$ getestet.

Durch den Überkreuzausstrich wurde je ein Kandidat des Stammes 14028 $\Delta araA$ bzw. 14028 $\Delta araC$ ausgewählt, die für die folgende Transformation mit dem pCP20 Plasmid verwendet wurden. Nach dem Herausschneiden der Resistenzkassette wurde die erfolgreiche Deletion von *araA* und *araC* mittels PCR überprüft (s. Abb. 27).

Abb. 27: Nachweis der Deletion der Gene *araA* und *araC* mittels PCR. Getestet wurden die ausgewählten Kandidaten für die Deletion des *araA*- (1-4) bzw. *araC*-Gens (5-8). Als Kontrolle dienten die Negativkontrollen (1, 5), der Stamm 14028 mit intakten *ara*-Genen (2, 6), 14028 *araA*::Kan^R (3) und 14028 *araC*::Kan^R (7). Die zu testenden Deletionsmutanten waren 14028 Δ *araA* (4) und 14028 Δ *araC* (8). Ein Marker (M) wurde mit aufgetragen.



Der Bakterienstamm 14028 mit intaktem *araC* wurde als Kontrolle mitgeführt und das PCR-Amplifikat wies eine Länge von 1145 bp auf (s. Abb. 27 Proben-Tasche 6). Durch die Insertion der Kanamycin-Resistenz-Kassette und die Verwendung der gleichen Oligonukleotide wurde ein längeres Fragment von 1833 bp nachgewiesen (s. Abb. 27 Proben-Tasche 7). Nach dem Herausschneiden der Resistenzkassette blieb ein Fragment mit der Länge von 442 bp übrig (s. Abb. 27 Proben-Tasche 8). Da ein Nachweis der Deletion des *araA*-Gens auch nach Verwendung anderer Primer nicht funktionierte, wurde die Deletion des Gens durch ihr Wachstums-Defizit in MM mit 1 % L-Arabinose nachgewiesen. Die beiden Stämme wurden anschließend mit den Plasmiden pBAD-Myc/HisC-*reiD* bzw. pET28b-*reiD* und pTARA transformiert und mittels PCR auf dessen Anwesenheit getestet.

Um die Bakterienstämme auf eine erfolgreiche Produktion von *ReiD* zu überprüfen, wurden diese auf eine induzierbare Überexpression des Aktivators getestet. Dafür wurden sowohl die *Salmonella* Stämme mit Arabinose-defizienten Hintergrund, als auch die Ausgangsstämme *E. coli* BL21(DE3) pET28b-*reiD* und *E. coli* TOP10 pBAD-Myc/HisC-*reiD* als Kontrollen mitgeführt. Die Stämme wurden in LB-Medium angezogen und die Proteinexpression nach drei Stunden bei 37 °C induziert. Es wurden vor der Induktion, zwei und vier Stunden nach der Induktion und am nächsten Morgen jeweils Proben für die SDS-PAGE entnommen und die Proteine mit einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (s. Abb. 28).

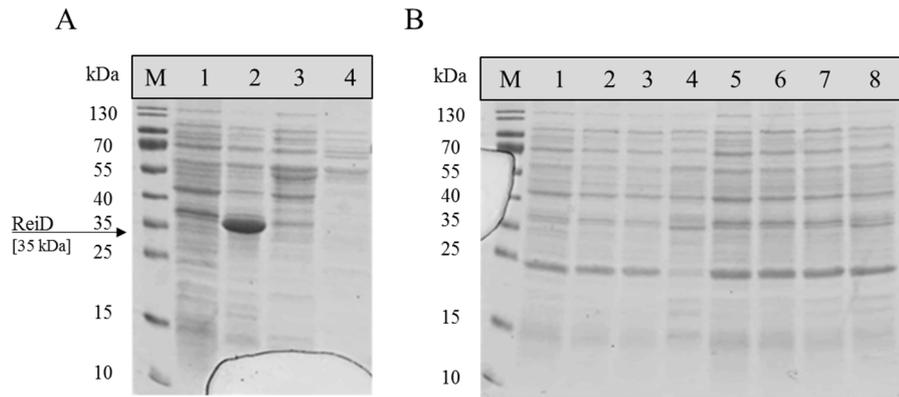


Abb. 28: Überexpression von ReID-His₆ mittels pET28b-*reiD* und pTARA. A) Kontrollproben aus *E. coli* BL21(DE3) pET28b-*reiD* vor der Induktion (1), zwei Stunden (2) bzw. vier Stunden nach der Induktion (3) und über Nacht (4). B) Proben von 14028 $\Delta araA$ bzw. $\Delta araC$ pET28b-*reiD* pTARA vor der Induktion (1,5), zwei Stunden (2,6) bzw. vier Stunden nach der Induktion (3,7) und über Nacht (4,8). Ein Marker (M) wurde mit aufgetragen.

Bei der Verwendung des pET28b-Vektorsystems zeigte der *E. coli* Stamm eine Induktion der Überexpression nach zwei Stunden, die durch eine Bande auf der Höhe von etwa 35 kDa sichtbar wurde (s. Abb. 28 A Proben-Tasche 2). Es wurde keine Überexpression in den Arabinose-defizienten *Salmonella* Stämmen durch eine derartige Bande erkannt (s. Abb. 28 B Proben-Tasche 2 - 4 bzw. 6 - 8). Währenddessen zeigte *S. Typhimurium* 14028 $\Delta araA$ pBAD-Myc/HisC-*reiD* bereits zwei Stunden nach der Induktion eine deutliche Überexpression (s. Abb. 29 B Proben-Tasche 2), die vergleichbar mit der Expression in *E. coli* TOP10 war (s. Abb. 29 A Proben-Tasche 2).

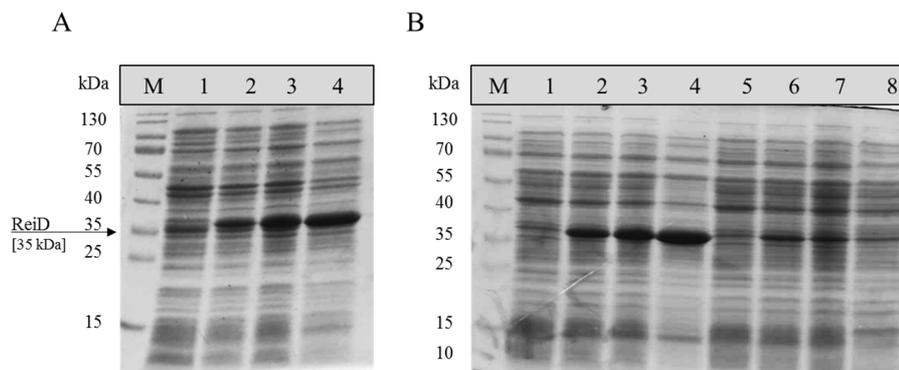


Abb. 29: Überexpression von ReID-His₆ mittels pBAD-Myc/HisC-*reiD*. A) Kontrollproben aus *E. coli* TOP10 pBAD-Myc/HisC-*reiD* vor Induktion (1), zwei Stunden nach Induktion (2), vier Stunden nach Induktion (3) und über Nacht (4). B) Proben von 14028 $\Delta araA$ bzw. $\Delta araC$ pBAD-Myc/HisC-*reiD* vor der Induktion (1,5), zwei Stunden nach der Induktion (2,6), vier Stunden nach der Induktion (3,7) und über Nacht (4,8). Ein Marker (M) wurde mit aufgetragen.

Die induzierten Proben aus *E. coli* TOP10 und der *araA*-Deletionsmutante wiesen eine Bande hoher Intensität bei etwa 35 kDa auf (s. Abb. 29 Proben-Tasche 2 bis 4). Bereits in der uninduzierten Probe von *E. coli* TOP10 wurde eine stärkere Bande auf derselben Höhe beobachtet. In der *araC*-Deletionsmutante war die Bande nur schwach erkennbar,

wobei die Bandenintensität und die damit einhergehende Proteinmenge auch nach längerer Zeit nicht zunahm (s. Abb. 29 B Proben-Tasche 6 - 8). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen *S. Typhimurium* $\Delta araA$ pBAD-Myc/HisC-*reiD* als Expressionsstamm für die Isolation von ReiD ausgewählt.

3.5.2. Aufreinigung und Rückfaltung des Aktivators unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung des Aktivators erfolgte mittels Affinitätschromatographie der HisTrap-Säule und dem ÄKTA-System (GE Healthcare, Freiburg, DE). Das Protein wurde mit einem C-terminalen Polyhistidin-Anhang überexprimiert, der durch Interaktion mit den immobilisierten Nickel-Ionen an die HisTrap-Säule von GE Healthcare bindet und anschließend durch Zugabe von Imidazol kompetitiv verdrängt wird. Während der Aufreinigung wurden ausgewählte Fraktionen gesammelt, die über eine SDS-PAGE im Anschluss analysiert wurden.

Unter nativen Bedingungen war eine Aufreinigung von ReiD-His₆, aufgrund der Unzugänglichkeit des Polyhistidin-Anhanges nicht möglich (s. Abb. 42 im Anhang). Deshalb wurde ReiD mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid denaturiert, um somit den Polyhistidin-Anhang für die Bindung an die Säule zugänglich zu machen. Durch eine stufenweise Erhöhung der Imidazolkonzentration wurden zunächst unspezifische Bindungen oder andere Proteine mit Histidinresten von der Säule eluiert. Der Aktivator wurde bei ca. 0,3 M Imidazol von der Säule eluiert, was an den Fraktionen der Proben-Taschen 7 - 12 der SDS-PAGE in Abb. 30 zu erkennen ist. Anhand der Bandenintensität der Elutionsfraktionen war die Aufreinigung des Aktivators in höherer Menge erfolgreich. Die Elutionsfraktionen wiesen außerdem geringfügige Verunreinigungen auf.

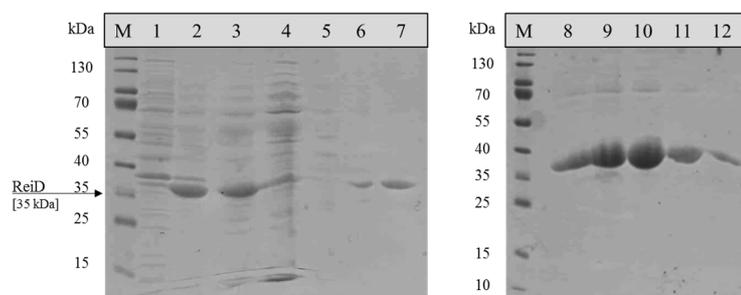


Abb. 30: SDS-PAGE der Aufreinigung von ReiD unter denaturierenden Bedingungen mit 6 M Guanidin-Hydrochlorid nach Coomassie-Färbung. Proben wurden von 14028 $\Delta araA$ pBAD-Myc/HisC-*reiD* vor der Induktion (1), nach der Induktion (2), des Filtrates (3) und nach der Aufreinigung mittels ÄKTA-System (4-12). Gesammelte Fraktionen waren der Durchfluss (4-6) und die Elutionsfraktionen (7-12). Ein Marker (M) wurde mit aufgetragen.

Durch eine Aufreinigung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen wurde im Anschluss *ReiD* in seine native Konformation rückgefaltet. Die Elutionsfraktionen der Proben-Tasche 8 - 12 wurden vereint und für 36 Stunden bei 4 °C dialysiert. Nach der Dialyse wurde ein großer Anteil an denaturiertem Protein innerhalb des Dialyseschlauches durch Kristallbildung sichtbar. Der klare Überstand wurde abgenommen und die Proteinmenge von $529,62 \pm 101,84 \mu\text{g/ml}$ mittels Bradford bestimmt. In einem weiteren Ansatz wurde die Rückfaltung des Proteins mittels Pufferaustausch durch Zentrifugation durchgeführt. Hier wurde erneut eine Kristallbildung nach Aufbewahrung der Proteine im Rückfaltungspuffer bei 4 °C ersichtlich. Außerdem wurde nur eine Protein-Menge von $84,24 \pm 27,38 \mu\text{g/ml}$ ermittelt, wobei die SDS-PAGE auf eine höhere Ausbeute schließen ließ (s. Abb. 43 im Anhang). Für die anschließenden Gelmobilitätsstudien wurde nur der klare Überstand nach der Dialyse verwendet.

3.5.3. Überprüfung der Funktionalität des Aktivators mittels Gelmobilitätsstudien

Die Funktionalität des aufgereinigten Aktivators wurde durch seine Fähigkeit, an die Promotorregionen des *reiD*- und *iolE*-Promotors zu binden, mittels Gelmobilitätsstudien überprüft. Hierzu wurden die Promotorfragmente von *reiD*, *iolE* und *argS* als Negativ-Kontrolle mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Für die Bestimmung des molaren Überschusses des Proteins gegenüber der eingesetzten DNS wurde der Quotient aus den berechneten Stoffmengen aus Formel 6 und 7 berechnet. Für jeden Ansatz wurden 50 ng an DNS eingesetzt, mit steigender Proteinmenge versetzt und für 45 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem nativen Polyacrylamid-Gel bei 4 °C aufgetrennt (s. Abb. 31). Als Negativ-Kontrollen diente die Zugabe des *argS*-Promotorfragmentes und eine Probe ohne Proteinzusatz.

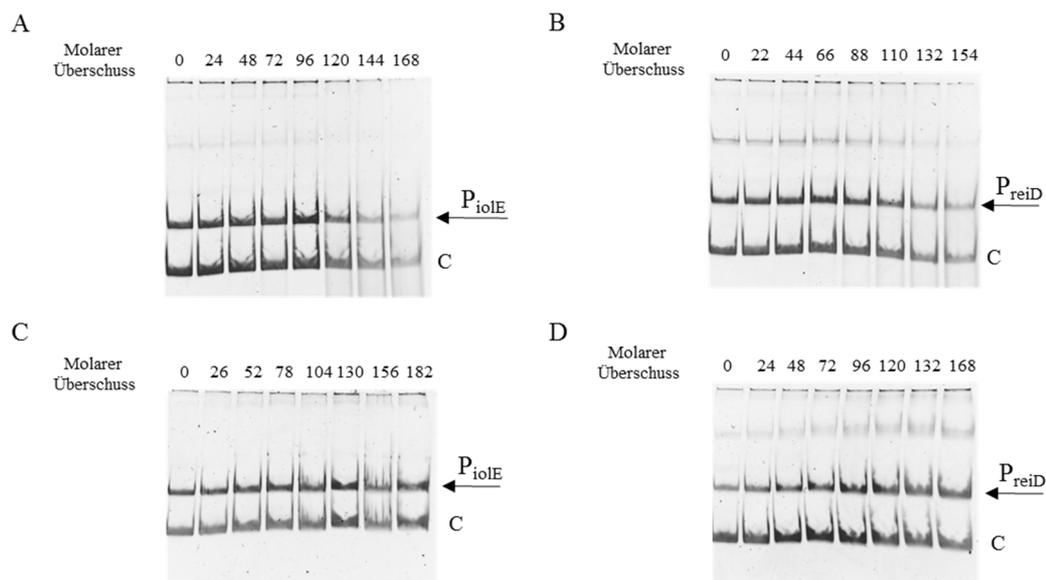


Abb. 31: Promotorbindeaktivität von ReiD nach Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Rückfaltung. Die Gelmobilitätsstudien wurden entweder mit rückgefalteten Protein über Dialyse (A, B) oder Filtration (C, D) durchgeführt. Je 50 ng Kompetitor DNS und 50 ng DNS von P_{iorE} (A, C) oder P_{reiD} (B, D) wurden mit steigender Menge von ReiD versetzt, inkubiert und aufgetragen. Anschließend wurde die DNA mit einer GelRed-Färbelösung sichtbar gemacht.

Eine Bindung von ReiD an die Promotorfragmente von *reiD* und *iolE* wurde weder nach Rückfaltung durch Dialyse noch nach Filtration nachgewiesen. Die Bandenintensität der Promotorfragmente nahm zwar bei hoher Proteinmenge ab, aber eine Bande für den sich bildenden Protein-DNS-Komplex wurde nicht identifiziert. Eine Abnahme der Bandenintensität war auch bei höherer Proteinmenge der Negativ-Kontrolle P_{argS} zu beobachten. Das aufgereinigte ReiD zeigte keine Bindungsaktivität an die von ihm kontrollierten Promotoren, wodurch auf eine nicht korrekte Rückfaltung des Proteins zu schließen ist. Um weitere Versuche zur Funktionalität des Aktivators durchführen zu können, müssen die Bedingungen der Rückfaltung weiter optimiert werden.

3.6. Schlussfolgerung: Charakterisierung der phänotypischen Heterogenität während der *iol*-Genexpression und der Einfluss des Regulators IolR

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit mehrere Beobachtungen über die Expression der *iol*-Gene und deren Regulation, zur Anpassung der Salmonellen an sich verändernde Umweltbedingungen gemacht. Unter anderem wurde die *iol*-Genexpression unter Bedingungen mit MI untersucht und zeigte, dass die Expression der Gene für die abbauenden Enzyme, sowie die Regulatoren während der Anlaufphase in einem Teil der Population induziert wurden und die Salmonellen im weiteren Verlauf vermehrt ihren Stoffwechsel auf diese Kohlenstoff- und Energiequelle umstellten. Das Expressionsverhalten dieser Gene der genomischen Insel GEI4417/4436 war innerhalb

der Population in Anwesenheit von MI von Bistabilität geprägt, wodurch sich zwei Phänotypen bei gleichem Genotyp ausbildeten. Der eine Teil der Population befand sich in einem aktiven Zustand für die MI-abbauenden Gene und die andere Subpopulation verblieb inaktiviert. Die Varianz der Merkmalsausprägung zeigte eine heterogene Population in Hinsicht auf die *iol*-Genexpression während des Abbaus des Substrates, die nach anfänglichen Schwankungen zunehmend einheitlicher verlief. Wurden die Salmonellen an eine Umgebung mit dem Polyol adaptiert, zeigten sie bei einem Wechsel der Umgebungsbedingungen in nährstoffreichen Medium einen graduellen Gedächtnisverlust. Das Gedächtnis der Bakterien manifestiert sich durch die andauernde Transkription der Gene für die MI-abbauenden Enzyme innerhalb der Zelle in Abwesenheit des induzierenden Stimulus. Ein Teil der *Salmonella*-Population konnte diesen Zustand für 4 Stunden aufrechterhalten, wobei die transkriptionelle Aktivität des *iolE*-Gens stetig abnahm. Ein Einfluss des Repressors auf die Hysterese wurde nicht beobachtet. Die Bakterien waren somit in der Lage, ihren Stoffwechsel schnell an die neuen Umgebungsbedingungen anzupassen. Dennoch blieb 0,1 % der Population in einem aktiven Zustand für den Abbau von MI, trotz negativen Auswirkungen auf deren Selektion. Die Stämme mit induzierter *iol*-Genexpression zeigten eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit von 15,4 – 27,0 % unter optimalen Inkubationsbedingungen im Vergleich zum parenteralen Stamm. Es wurde nachgewiesen, dass das Überleben der Art, durch die zusätzlich aufgewendete Energie für die Expression der *iol*-Gene unter nicht induzierenden Bedingungen, gefährdet ist. Bei erneuter Anwesenheit von MI in der Umgebung zeigten die Zellen mit aktiven Zustand der *iol*-Genexpression einen Wachstumsvorteil, wodurch sich das Aufrechterhalten der zusätzlichen Expression der MI-abbauenden Gene positiv auf die Selektion auswirkte. Die Regulatoren der genomischen Insel GEI4417/4436 sind von zentraler Bedeutung für die Aufklärung des Regulationsmechanismus. Durch die nähere Betrachtung der Interaktion des Repressors mit den *iol*-Promotoren wurde herausgefunden, dass er mit zwei Bindestellen innerhalb der Promotorregion der *iol*-Gene interagiert und diese von unterschiedlichen Affinitäten geprägt waren, aber gleichermaßen von IolR gebunden wurden. Die Affinitäten wurden für die *iol*-Promotoren P_{iolR} , P_{reiD} und P_{iolTI} bestimmt und befanden sich unabhängig von der jeweiligen Bindestelle im nanomolaren Bereich. Während der Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion wurden Hinweise auf eine möglich stattfindende Oligomerisierung des Repressors gefunden. Es wurde versucht die Nukleotidsequenz der IolR-Bindestelle mittels eines abgewandelten DNA-Protektionsexperiment und

anschließender Subklonierung zu identifizieren. Es wurde jedoch kein DNS-Fragmentes im inaktivierten Reaktionsansatz für die nachfolgende Anwendung detektiert und die sequenzierten Vektoren wiesen keine Insertion einer Nukleotidsequenz auf. Für die Untersuchung des Aktivators des MI-Metabolismus wurde ein effizientes Überexpressionssystem mit Hilfe des pBAD-Vektorsystems in Arabinose-defizienten Salmonellen entwickelt. Durch eine Aufreinigung von ReiD unter denaturierenden Bedingungen und der Verwendung des ÄKTA-Systems wurde eine hohe Reinheit und Menge des Aktivators erzielt. Durch eine vermehrte Kristallbildung, bei der anschließend durchgeführten Dialyse, war eine Rückfaltung und die damit einhergehende Wiederherstellung der Funktionalität des Aktivators problematisch. Es wurde keine Bindung von ReiD an seine Zielstrukturen P_{iolE} und P_{reiD} beobachtet. Die Bedingungen der Rückfaltung des Proteins müssen an dieser Stelle weiter optimiert werden.

4. Diskussion

Die Salmonellose stellt die zweithäufigste bakterielle Infektionserkrankung des Gastrointestinaltraktes mit einer kontinuierlich abnehmenden bundesweiten Inzidenz dar (RKI, 2016). Bei den Erregern handelt es sich um Salmonellen, die über kontaminierte Lebensmittel oder verseuchtes Wasser in den Magen-Darm-Trakt gelangen und im Dünndarm in die Wirtszellen eindringen.

Für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes hat sich *Salmonella* die Fähigkeit zu Verstoffwechslung der verschiedensten Substrate im Darm, wie 1,2-Propandiol, Ethanolamin und MI angeeignet, die eine Besetzung mehrerer metabolischer Nischen ermöglichen und ein Wachstumsvorteil gegenüber der kommensalen Mikrobiota darstellen kann (Staib & Fuchs, 2014). Die *in vivo* Relevanz des MI-Metabolismus von *S. Typhimurium* stellt ein Beispiel für den Zusammenhang zwischen Metabolismus und Virulenz pathogener Bakterien dar (Carnell *et al.*, 2007; Chaudhuri *et al.*, 2009, 2013; Lawley *et al.*, 2006, Rothhardt *et al.*, 2014). Während dessen Wachstum der Salmonellen in Anwesenheit von MI konnte das Auftreten einer phänotypischen Heterogenität beobachtet werden, wobei der molekulare Ursprung bisher ungeklärt blieb (Kröger *et al.*, 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Genaktivität und Wirkungsweise des Repressors IolR auf die *iol*-Genexpression von *S. Typhimurium* 14028 untersucht. Im zweiten Teil wurde der Hysterese-Effekt und die Kosten einer andauernden *iol*-Genexpression auf die bakterielle Fitness beurteilt.

4.1. Die bistabile *iol*-Genexpression kann durch den Regulationsmechanismus von IolR erklärt werden

4.1.1. Die Regulatoren der GEI4417/4436 übertragen das Rauschen in ihrer Genexpression auf die ihnen nachgeschalteten *iol*-Gene

Die Regulation der *iol*-Gene erfolgt hauptsächlich über zwei Transkriptionsfaktoren, deren Gene in der genomischen Insel GEI4417/4436 enthalten sind und in An- und Abwesenheit von MI exprimiert werden. Der Repressor IolR inhibiert die Genexpression der meisten *iol*-Gene in Abwesenheit von MI, während der Aktivator ReiD in Anwesenheit des Polyols eine induzierende Funktion auf die Expression der Gene ausübt, die für Enzyme der initialen katalytischen Reaktionen des Polyols kodieren. Für die beiden Regulatoren konnte eine autoregulative Wirkung beschrieben und die Beteiligung

von Rückkopplungsmechanismen erkannt werden (Kröger & Fuchs, 2009; Rothhardt *et al.*, 2014).

In vorangegangenen Untersuchungen wurde auf Populationsebene beschrieben, dass eine transkriptionale Aktivität des *iolR*-Gens sowohl unter nährstoffreichen Bedingungen als auch in Anwesenheit von MI vorlag (Kröger & Fuchs, 2009). Die durchgeführten Analysen der *iolR*-Genexpression auf Einzelzellebene bestätigten dessen Aktivität in einer Subpopulation während des Wachstums der Salmonellen in Abhängigkeit von MI. Im weiteren Verlauf des Wachstums nahm der Anteil der *iolR*-exprimierenden Population zu, d.h. trotz Abbau des Polyols, der eine Expression der *iol*-Gene voraussetzt, wird der Repressor des MI-Metabolismus in den bakteriellen Zellen produziert. Damit *Salmonella* die Expression der *iol*-Gene in Anwesenheit von IolR induzieren kann, muss dessen repressorische Funktion inhibiert werden. Eine nicht-kompetitive Hemmung des Repressors durch DKGP wurde bereits beschrieben (Yoshida *et al.*, 2008). Das Intermediat dient der Zelle als Induktor bzw. induzierendes Signal, dass MI als Kohlenstoffquelle in der Umgebung verfügbar ist. Bei der Degradation von MI entsteht der Induktor aus der Phosphorylierung von DKG durch die IolC-Kinase. Anhand der zunehmenden Aktivität des *iolC*-Gens innerhalb der Population, die zum Ende der Anlaufphase in einer Subpopulation induziert und diese während des exponentiellen Wachstums zunimmt, kann auf einen erhöhten intrazellulären DKGP-Spiegel geschlossen werden. Für das Wachstum der Zelle muss Energie aus dem weiteren Abbau des Intermediates zu Dihydroxyacetonphosphat, CO₂ und Acetyl-CoA gewonnen werden, wodurch sich die Konzentration an DKGP fortwährend reduziert. Auf der anderen Seite wird eine bestimmte DKGP-Konzentration in der bakteriellen Zelle benötigt, um die Funktion des Repressors durch dessen Bindung zu unterdrücken. Nur eine konstant hohe intrazelluläre Konzentration des Intermediates gewährleistet eine anhaltende Inaktivierung der produzierten Repressor-Moleküle und eine fortlaufende Energiegewinnung der Zelle während des Wachstums der Salmonellen mit MI als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Eine Derepression der *iol*-Gene ist in den *iolR*-exprimierenden Bakterien somit abhängig von der Menge an „aktiven“ IolR und einer ausreichenden Anzahl an DKGP-Molekülen, die durch die fortwährende *iolC*-Genaktivität angenommen werden kann.

Während der Untersuchung der Reporter-gen-Konstrukte MvP101 $P_{iolR}::gfp$ und MvP101 $iolR::gfp$ konnte beobachtet werden, dass das translationale Fusionskonstrukt einen deutlichen Wachstumsnachteil aufwies. Bei diesem Stamm wurde das Stopcodon der *iolR*-Gensequenz entfernt und stattdessen die Sequenz des *gfp*-Gens eingefügt. Das Gfp-Molekül befindet sich nach der Proteinbiosynthese an der C-terminalen Zuckerphosphat-bindenden Domäne des Repressors und könnte zu Beeinträchtigungen führen, falls durch eine sterische Hinderung des Reporters eine Bindung von DKGP nicht mehr stattfindet und der Repressor nicht mehr inaktiviert werden könnte. Dieser Umstand würde das Wachstumsdefizit des Bakterienstammes in einer Umgebung mit MI erklären. Für den Regulator IolR wurde aber auch eine duale Rolle in *Salmonella* festgestellt, indem er einerseits die Expression der *iol*-Gene reprimiert (Kröger & Fuchs, 2009; Cordero-Alba *et al.*, 2012) und andererseits als Aktivator anderer Gene außerhalb der GEI4417/4436 fungiert (Hentchel *et al.*, 2015; Klaffl *et al.*, 2013). Ein Regulator, der in verschiedenen physiologischen Vorgängen der Zelle involviert ist, stellt einen wichtigen Punkt im regulatorischen Gen-Netzwerk dar und könnte bei beeinträchtigter Funktion zu einem gravierenderen Wachstumsnachteil unter nährstofflimitierenden Bedingungen führen.

Um den Abbau des Polyol initiieren zu können, werden die Enzyme IolE und IolG1 benötigt, die für die ersten katalytischen Reaktionen von MI verantwortlich sind. Das *iolE-iolG1*-Operon steht nicht unter der Kontrolle des Repressors, sondern wird vom dem Aktivator ReiD induziert (Rothhardt *et al.*, 2014). Dieser ermöglicht es den Salmonellen, den Stoffwechselweg für den Abbau von MI einzuleiten und diese Kohlenstoff- und Energiequelle für ihr Wachstum zu verwenden. Mittels Durchflusszytometrie konnte in Bezug auf die Genaktivität des Aktivators, ähnlich wie bei der *iolR*-Genexpression ebenfalls ein bistabiles Verhalten innerhalb der Population beobachtet werden, die sich in der *iolE-iolG1*-Genexpression weiter fortsetzt. Das Aktivator-Gen und die von ihm kontrollierten Gene werden zum selben Zeitpunkt induziert und sind von einem ähnlichen Aktivitätsverlauf der Genexpression während des Wachstums in MI geprägt (s. Abb. 9). Auf Populationsebene wurde für den Bakterienstamm MvP101 $P_{reiD}::gfp$ eine durchschnittlich niedrigere Genaktivität im Vergleich zu MvP101 $P_{iolE}::gfp$ nachgewiesen, weil prinzipiell weniger Regulatorproteine erforderlich sind, um mehrfach die Expression ihrer Zielgene zu beeinflussen.

Neben den vier Permeasen, die in der GEI44177/4436 kodiert sind, wurde IolT1 als Haupttransporter für MI identifiziert, dessen Promotor in Anwesenheit dieses Substrates im Vergleich zu Glukose stark induziert wird (Kröger *et al.*, 2010). Für diese Messung wurde der pDEW201-Vektor mit eingebrachter P_{iolT1} -Sequenz verwendet und dessen Aktivierung über die Quantifizierung der Biolumineszenz in *Salmonella* auf Populationsebene detektiert. Da der Vektor episomal in den Bakterienzellen vorliegt, ist die transkriptionelle Aktivität des *iolT1*-Gens durch eine erhöhte Kopienzahl von pDEW201- P_{iolT1} in Frage zu stellen. Daher wurde in dieser Arbeit ein chromosomal integriertes Reporter-gen-Konstrukt für die Untersuchung der Genaktivität des Transporters verwendet. Der resultierende Bakterienstamm MvP101 $P_{iolT1}::gfp$ zeigte keine Aktivität des *iolT1*-Gens während des Wachstums der Salmonellen mit MI, wodurch die unnatürlich hohe Kopienzahl des pDEW201-Vektors für die gemessene Genaktivität des Haupttransporters in Anwesenheit von MI verantwortlich ist. Die gemittelte Fluoreszenz und dessen Schwankungen waren im Bereich der bakteriellen Autofluoreszenz und sind dadurch zu vernachlässigen. Durch die chromosomale Fusion des pUTs-Vektors liegt nur eine Kopie des *gfp*-Gens vor, das abgelesen und zu einem Fluoreszenzsignal führen kann. Bei der Verwendung von Reporter-gen-Konstrukten kann eine Aktivität der untersuchten Promotoren, die eine Signalstärke der Fluoreszenz unterhalb des instrumentellen Schwellenwertes aufweisen, jedoch nicht ausgeschlossen werden, da es erst bei Grenzwertüberschreitung der Gfp-Moleküle innerhalb der bakteriellen Zellen zur Detektion kommt (Rollenhagen & Bumann, 2006). Des Weiteren könnte die Funktion durch die anderen Permeasen kompensiert oder generell nur wenige Transporter in der bakteriellen Membran notwendig sein, um eine für den Stoffwechsel ausreichende Menge an MI in die Zelle zu transportieren.

Um auszuschließen, dass die Subpopulation mit niedrigem Fluoreszenzsignal, die während des Wachstums mit MI vorhanden ist, aus abgestorbenen Zellen besteht, wurde eine Lebend-Tot-Diskriminierung mit dem Reporter-gen-Konstrukt MvP101 $P_{rpsM}::gfp$ durchgeführt. Anhand der hohen Genaktivität des Haushaltsgens *rpsM* wurde erkannt, dass während des Wachstums mit MI der größte Teil aus metabolisch aktiv „lebenden“ Zellen besteht, und die Subpopulation mit geringerem Fluoreszenzsignal für die *iol*-Genexpression nur z.T. durch tote Bakterienzellen zu erklären ist. Durch den zusätzlichen Einsatz eines Zellvitalitätsfarbstoffes, z.B. Nilblau A bzw. SYTO 17, oder eines weiteren chromosomal integrierten Reporters, hätte die Lebend-Tot-Diskriminierung und

Untersuchung der *iol*-Genaktivität simultan erfolgen können. Bei dem Einsatz eines dualen Reportersystems wäre die Detektion des Gfp-Signals bei 509 nm für die *iol*-Genaktivität und die eines anderen fluoreszierenden Proteins z.B. YFP (*yellow fluorescent protein*) bei 527 nm für das Haushaltsgen erfolgt. Durch die spektrale Überlappung der Emissionsspektren beider Proteine und den großen Frequenzbereich des Bandpassfilters (515-545 nm) im Durchflusszytometer ist eine Trennung der beiden Fluoreszenzsignale nicht möglich gewesen. In einem anderen Ansatz wurde der Reporter LSSmKate2 auf seine Einsatzmöglichkeit getestet. Dieser weist eine längere Stokes-Verschiebung auf, d.h. die Anregung erfolgt zwar bei 488 nm, aber die Emission kann bei 624 nm detektiert werden. Die Funktionalität des fluoreszierenden Proteins wurde in *E. coli* LMG194 verifiziert (Piatkevich *et al.*, 2010a; 2010b; Piatkevich & Verkhusha, 2011). Die Expression von LSSmKate2 unter Verwendung des pBAD-Vektorsystems konnte in *E. coli* mittels SDS-PAGE und Westernblot zwar nachgewiesen werden, jedoch wurde kein Fluoreszenzsignal detektiert. Weitere Versuche ergaben, dass der Reporter eine Reifezeit von mehr als 24 Stunden für die Ausbildung einer Fluoreszenz in *E. coli* BL21(DE3) und *S. Typhimurium* benötigt, wodurch seine Anwendung für die zeitliche Analyse der *iol*-Genexpression während des Wachstums mit MI nicht geeignet war. Auch Versuche mit den fluoreszenten Farbstoffen Nilblau A zum Anfärben aller Zellen (Betscheider & Jose, 2009; Hazafy *et al.*, 2011) oder Propidiumiodid für tote Bakterien (Miller & Quarles, 1990) blieben ohne Erfolg.

Für die Gene *iolR*, *reiD*, *iolE* und *iolC* wurde ein bistabiles Expressionsverhalten ermittelt, dass sich in Form von zwei distinkten Subpopulationen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität innerhalb einer isogenen Population von *S. Typhimurium* zeigte. Vorherige Untersuchungen deckten bereits eine bistabile Promotoraktivität der Gene *iolE* und *iolC* auf, wobei sich das Reporter-gen-Konstrukt auf einem Plasmid mit relaxierter Replikationskontrolle befand (Kröger *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden die Reporter-gen-Konstrukte über homologe Rekombination mit der Promotor- bzw. Genregion der *iol*-Gene innerhalb der GEI4417/4436 eingebracht, so dass das Fluoreszenzsignal in direkter Korrelation mit der Genaktivität steht. Die bistabile Expression der *iol*-Gene wurde jedoch nur vorübergehend während des Wachstums mit MI beobachtet, da mit fortschreitendem Wachstum in der exponentiellen oder stationären Phase die Population ein zunehmend einheitlicheres Expressionsprofil der *iol*-Gene mit geringerer Streuung ihrer Merkmalsausprägung aufwies. Außerdem konnte beobachtet

werden, dass die Bistabilität während der Transkription des *iolR*- und *reiD*-Gens nach der Produktion der Regulatoren nicht verloren gegangen ist. Durch die Berechnung des „noise-level“ wurde eine große Streubreite der Merkmalsausprägung im Vergleich zum Haushalts-Gen *rpsM* festgestellt. Essentielle Gene unterliegen generell geringeren Fluktuationen und müssen ein hohes Expressionslevel aufweisen, damit das Rauschen keinen Einfluss auf die Genaktivität nehmen kann (Newman *et al.*, 2006; Lehner, 2008). Es wurden für das Haushalts-Gen eine hohe durchschnittliche Fluoreszenzintensität und ein niedriger Variationskoeffizient der Genexpression während des Wachstums mit MI bestätigt (s. Tab. 22 und Abb. 39 im Anhang). Die Reporter-gen-Konstrukte zeigten untereinander deutliche Unterschiede in ihrer heterogenen Merkmalsausprägung, wobei MvP101 *iolR::gfp* die höchste durchschnittliche Streubreite aufwies. Mit abnehmenden durchschnittlichen VarK-Wert folgten die Stämme MvP101 *P_{iolE}::gfp*, MvP101 *reiD::gfp*, MvP101 *P_{reiD}::gfp* und MvP101 *P_{iolR}::gfp* (s. Abb. 39 im Anhang). Der Variationskoeffizient in der Aktivität der *iol*-Gene deckte neben der allgemein heterogenen *iol*-Genexpression u.a. auf, dass das Rauschen des in der Genregulation nachfolgenden *iolE*-Gens im Vergleich zu *reiD* größer ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Variabilität innerhalb der Expression übergeordneter Gene in der Aktivität der ihnen nachgeschalteten Gene fortsetzt. Die Transmission wurde als dominante Quelle des Rauschens bereits identifiziert (Pedraza & van Oudenaarden, 2005; Rosenfeld *et al.*, 2005). Regulatoren nehmen in Gen-Netzwerken eine Schlüsselrolle ein und unterliegen unter Bedingungen, in denen sie benötigt werden, geringeren Schwankungen in ihrer Genexpression. Um die Präzision der Genregulation zu erhöhen, muss das Rauschen innerhalb der Genexpression minimiert werden. Dafür haben Bakterien Mechanismen auf Ebene der Genregulation oder während des Zellzyklus entwickelt, um ihre Genexpression unter bestimmten Bedingungen präzise einzustellen (Ozbudak *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2004; Thattai & van Oudenaarden, 2004, Raser & O’Shea, 2004, 2005; Smits *et al.*, 2006). Einerseits können Bakterien durch ein erhöhtes Expressionslevel den Einfluss von Fluktuationen reduzieren, indem sie dem *small number effect* entgegenwirken (Elowitz *et al.*, 2002; Newman *et al.*, 2006; Lehner, 2008; Tănase-Nicola & ten Wolde, 2008). Andererseits können sie Fluktuationen in nachgeschalteten Genen reduzieren, indem sie eine vorliegende negative Rückkopplung bzw. den Repressor kontrollieren (Becskei & Serrano, 2000; Elowitz *et al.*, 2000; Ozbudak *et al.*, 2002; Pedraza & van Oudenaarden, 2005). Durch Expansion des Zellvolumens während des Zellzyklus können Schwankungen der

Genproduktkonzentration, die auf die stattfindende Genreplikation zurückzuführen sind, innerhalb der Zelle ausgeglichen werden (Kiviet *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2016). Ebenfalls wurde beobachtet, dass die Promotoraktivität des *iolR*- und *reiD*-Gens einen niedrigeren Variationskoeffizienten aufwies als die translationalen Fusionskonstrukte. Das Rauschen, welches auf die vorgeschaltete Transkription der Regulator-Gene einwirkt, setzt sich mit größerem Ausmaß in der Translation fort. Ebenso könnten extrinsische Faktoren auf die Variation der *iol*-Genexpression Einfluss nehmen wie z.B. Fluktuationen in der Abundanz der RNA-Polymerase (Yang *et al.*, 2014), exponentielles Wachstum des Zellvolumens (Walker *et al.*, 2016) oder andere metabolische Reaktionen ohne spezifische regulatorische Interaktion (Kiviet *et al.*, 2014). Die geringe Entfernung der GEI4417/4436 zum Replikationsursprung des Chromosoms von *S. Typhimurium* könnte mit einer stochastisch einsetzenden Replikation zum Rauschen in der *iol*-Genexpression führen (McClelland *et al.*, 2001). Durch Fluktuationen in der Genreplikation liegt zu einem bestimmten Zeitpunkt eine erhöhte Kopienzahl des Gens in der Zelle vor, wodurch dessen transkriptionale Aktivität verdoppelt werden kann (Rosenfeld *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Marathe *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2016).

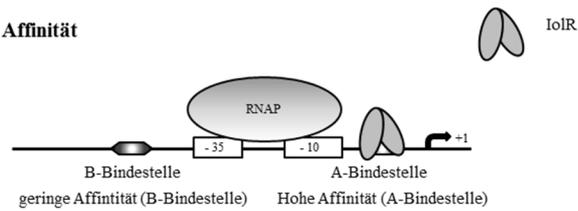
4.1.2. Ein mehrstufiger Regulationsmechanismus des Repressors führt bei fluktuierender Proteinmenge zu einem bistabilen Verhalten innerhalb einer isogenen Population

Die Expression der MI-abbauenden Gene wird in Abwesenheit des Polyols durch den Regulator IolR stark reprimiert. Diese Repression ist an der langen Anlaufphase der Bakterien während des Wachstums mit MI und der starken Induktion der *iol*-Gene nach Deletion des *iolR*-Gens zu erkennen (Kröger & Fuchs, 2009). Eine strikte Repression der *iol*-Gene unter Bedingungen ohne MI ist sinnvoll, da *S. Typhimurium* viele Substrate als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann, und MI nicht den energieeffizientesten Nährstoff für die Bakterien darstellt (Staib & Fuchs, 2014). Durch diesen Mechanismus wird eine *iol*-Genexpression verhindert, wenn das Substrat in der Umgebung nicht verfügbar ist.

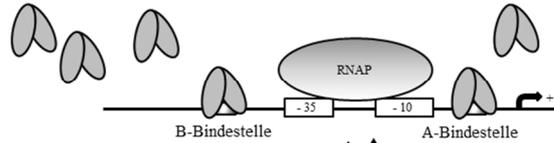
Die SPR-Spektroskopie ermöglicht eine detailliertere Beschreibung der Interaktion der Protein-DNS-Interaktion und kann zur Aufklärung der transkriptionellen Repression der *iol*-Gene durch den Repressor IolR beitragen. Für die Untersuchung wurde der Promotor des Haupttransporters P_{iolT1} , der des Aktivators P_{reiD} , der die Genexpression der initialen Enzyme für den Abbau von MI induziert und sein eigener Promotor P_{iolR} ausgewählt.

Innerhalb dieser *iol*-Promotorfragmente wurden mittels IM-Analyse zwei Bindestellen identifiziert, die von dem Repressor mit einer unterschiedlichen Affinität gebunden werden. Die DNS-Zielstruktur, zu der der Repressor eine 400-fach stärkere Anziehungskraft aufweist, ist von einer schnellen Bindung und einem langsamen Ablösen des IolR-Proteins geprägt (A-Bindestelle). Der K_D -Wert der Protein-DNS-Interaktion liegt in einem Bereich von 0,8 bis 6,6 nM. Der Repressor weist eine niedrige Affinität zu der anderen DNS-Zielstruktur innerhalb der *iol*-Promotorfragmente auf (B-Bindestelle), wobei die K_D -Werte in einem Bereich von 312 bis 425 nM für die *iol*-Promotorfragmente liegen. Diese Protein-DNS-Interaktion ist von einer schnellen Assoziation sowie Dissoziation des Repressors von seiner DNS-Zielstruktur geprägt. Alle ermittelten K_D -Werte der Interaktion des Repressor mit seinen DNS-Zielstrukturen innerhalb der *iol*-Promotoren liegen im nanomalen Bereich. Diese Werte sind für die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen charakteristisch (Katayama *et al.*, 2012; Gopinath & Kumar, 2014), wodurch die bereits beschriebene strikte Kontrolle der *iol*-Gene durch den Repressor genauer bestimmt wird (Kröger & Fuchs, 2009). Für die Protein-DNS-Interaktionen innerhalb eines *iol*-Promotorfragmentes konnte eine gleiche Gewichtung des Bindevorkommens an der Gesamtbindung festgestellt werden, wodurch IolR beide Bindestellen in gleichermaßen besetzt. Das Vorkommen von mehreren Bindungsvorkommen, die von unterschiedlichen Affinitäten geprägt sind, lässt auf einen komplexeren kooperativen DNS-Bindung von IolR innerhalb der Promotorregionen in einer Art AB-BA Mechanismus schließen, wie er für den bakteriellen Regulator YpdB beschrieben wurde (Behr *et al.*, 2016). Durch eine aufeinanderfolgende kooperative Promotorbindung durch mehrere YpdB-Proteine kommt es zu einer schnellen sukzessiven Promotorfreisetzung, die sich in einer pulsartigen Genexpression äußert. Die aus der SPR-Spektroskopie gewonnenen Erkenntnisse trugen zur Erstellung eines vorläufigen molekularen Regulationsmechanismus des Repressors und der von ihm kontrollierten *iol*-Promotoren bei (s. Abb. 32).

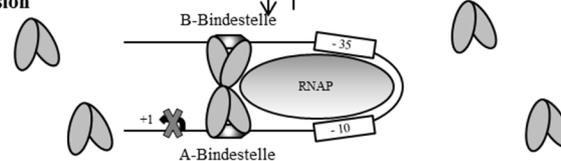
1. Initiale Bindung an DNS-Bindestelle mit höher Affinität



2. Bindung an DNS-Bindestelle mit geringerer Affinität



3. IolR Oligomerisierung und Promotor-Repression



4. Sukzessive Promotorfreisetzung und transkriptionale Aktivierung

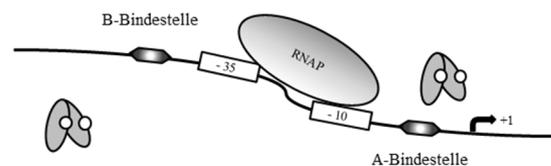


Abb. 32: Vorläufiges Modell des molekularen Bindemechanismus des Repressors IolR an die *iol*-Promotorregion. Der Bindemechanismus teilt sich in vier Phasen auf. Zuerst erfolgt die initiale Bindung des Repressors an die DNS-Bindestelle mit der höheren Affinität, wenn ein Substrat mit einem höheren Energiegehalt als *myo*-Inositol in der Zelle verfügbar ist, und der Repressor durch Induktion der *iolR*-Genexpression vermehrt gebildet wird. Anschließend erfolgt bei erhöhter IolR-Menge die Bindung an die DNS-Bindestelle mit geringerer Affinität. Durch eine stattfindende Oligomerisierung des IolR-Proteins verändert sich die DNS-Raumstruktur und es kommt zur Transkriptionssinhibition durch die in der Schleifenstruktur eingeschlossenen RNA-Polymerase. In der letzten Phase wurde das Substrat aufgebraucht und der Metabolismus wieder auf die Verstoffwechslung von *myo*-Inositol umgestellt. Infolge dessen verringert sich die IolR-Menge innerhalb der Zelle durch Abbau oder durch den nicht-kompetitiven Inhibitor DKGP wieder. Es folgt die Promotorfreisetzung zunächst von der DNS-Bindestelle mit der geringeren und anschließend von der mit höherer Affinität. Die DNS-Raumstruktur wird wiederhergestellt und die RNA-Polymerase kann die Transkription wieder durchführen (Hellinckx *et al.*, 2017).

Der Bindemechanismus und die damit einhergehende Repression der *iol*-Genexpression auf transkriptioneller Ebene teilt sich in vier ablaufende Phasen der IolR-Bindung an seine DNS-Zielstruktur auf (Hellinckx *et al.*, 2017). Unter nährstoffreichen Umgebungsbedingungen ist eine Kohlenstoffquelle mit einem effizienteren Energiegehalt im Vergleich zu MI für die Salmonellen verfügbar, woraufhin die Expression der einzelnen *iol*-Gene durch mehrere Repressor-Moleküle innerhalb der Zelle inhibiert werden muss. Durch die autoregulative Funktion des Regulators wird IolR, sowohl unter Bedingungen mit oder ohne MI, produziert und liegt in einer geringen

Menge innerhalb der Zelle vor. Durch die geringere Menge des Repressors wird die DNS-Bindestelle gebunden, zu der er eine stärkere Affinität aufweist. Die Bindung erfolgt innerhalb der Nukleotidsequenz, die den Bereich von - 18 bis + 50 Basenpaare in Hinsicht vom Transkriptionsstart des *reiD*-Gens umfasst (s. Abb. 41 im Anhang). Bei weiterem Anstieg der intrazellulären „aktiven“ IolR-Menge wird im nächsten Schritt auch die DNS-Bindestelle mit geringerer Affinität durch ein weiteres Repressor-Molekül besetzt, die innerhalb des *reiD*-Promotors auf die Nukleotide - 85 bis - 12 begrenzt werden konnte (s. Abb. 41 im Anhang). Die IolR-Moleküle binden somit innerhalb der Promotor-Gen-Region zwei voneinander entfernte DNS-Abschnitte in Hinsicht auf den *reiD*-Transkriptionsstart. Durch eine anschließende Oligomerisierung der gebundenen Repressor-Proteine wird die DNS-Raumstruktur verändert, so dass die RNA-Polymerase in der sich bildenden Schlaufenstruktur eingesperrt und eine transkriptionellen Aktivierung der *iol*-Gene unterbunden wird. Eine Oligomerisierung von IolR konnte bereits durch Größenausschlusschromatographie des aufgereinigten Regulators nachgewiesen werden. Dabei wurden nur Tetramere mit ~ 134 kDa identifiziert, wobei das IolR-Monomer ein Molekulargewicht von $\sim 31,4$ kDa aufweist (Hentchel *et al.*, 2015). In dieser Arbeit wurde eine Oligomerisierung des Repressors außerdem durch die experimentell ermittelte maximale *Resonance Unit* der SPR-Spektroskopie und durch eine zusätzliche retardierende Bande des Protein-DNS-Komplexes in der Gelmobilitätsstudie mit der P_{iolD1} -Sequenz belegt. Durch den molaren Überschuss an Repressormolekülen binden diese in der Gelmobilitätsstudie neben dem Promotorfragment auch andere an ihre DNS-Zielstruktur gebundene IolR-Proteine, wodurch die Wanderung der DNS in der Gelmatrix erschwert wird. In Abhängigkeit der Anzahl der gebundenen Proteine werden die Nukleotidfragmente unterschiedlich stark zurückgehalten und es werden mehrere Banden auf dem nativen Polyacrylamidgel detektiert. Die in der SPR-Spektroskopie ermittelte maximale Bindungskapazität lag bei ≥ 1.200 RU und weicht enorm von der theoretischen RU_{\max} von ~ 20 RU ab, wodurch eine Bindung des Repressors als höheres Oligomer angenommen werden kann, auch wenn mehrere Bindungsvorkommen in einem Promotorfragment vorliegen. Ist die Kohlenstoffquelle mit dem größeren Energiegehalt abgebaut, wird der Metabolismus bei Verfügbarkeit von MI auf dessen Abbau umgestellt. Innerhalb der Bakterienzelle verringert sich die Konzentration an IolR-Protein, z.T. durch dessen Proteolyse, aber hauptsächlich durch Inaktivierung mittels des nicht-kompetitiven Inhibitors DKGP, der infolge der Verstoffwechslung von MI gebildet wird. Durch eine nicht-kompetitive

Hemmung des Intermediates könnten die DNS-Bindungseigenschaften des Repressors, infolge einer eventuellen Konformationsänderung und der damit verbundenen Verschiebung der Position der DNS-bindenden Domäne verändert werden. Mit steigender DKGP-Konzentration dissoziiert der Repressor zunächst von der Bindestelle mit der niedrigen Affinität und verspätet von der DNS-Bindestelle mit der höheren Affinität, wodurch die DNS-Raumstruktur wiederhergestellt ist und die RNA-Polymerase wieder in der Lage ist, die Transkription auszuführen.

Eine Inhibition der Bindung der RNA-Polymerase an die DNS durch sterische Hinderung des Repressors ist ebenfalls denkbar, da die genaue Lokalisation der IolR-Bindestelle nicht ermittelt und dadurch eine Besetzung der -35- oder -10-Region des Promotors durch den Regulator nicht ausgeschlossen werden konnte. Bioinformatische Analysen der von IolR gebundenen *iol*-Promotorfragmente erbrachten keine eindeutige Konsensussequenz für die Bindung des Repressors. Da die Nukleotidsequenz des *iolR*-Gens von der von *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* abweicht, kann die von Yoshida *et al.* postulierte Zielstruktur nicht angenommen werden (Yoshida *et al.*, 1999; Kröger & Fuchs, 2009). Eine aktuellere Untersuchung des IolR-Repressors schränkte die Binderegion auf die Nukleotide –112 bis –70 der *pat*-Promotorregion ein, dessen Gen für eine Acetyltransferase des RLA (*reversible lysin acetylation*) Systems kodiert und durch IolR in seiner Expression aktiviert wird (Hentchel *et al.*, 2015). Die Binderegion des Regulators im *pat*-Promotor liegt von der –35 und –10-Region entfernt, wodurch die Annahme einer transkriptionellen Repression durch Polymerase-Sequestration bekräftigt wird. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit versucht, die DNS-Sequenz der IolR-Bindestelle durch ein DNA-Protektionsexperiment mit anschließender Subklonierung zu identifizieren. Die Sequenzierung der Vektoren zeigte jedoch, dass keine Insertion einer Nukleotidsequenz in das Vektorsystem erfolgte. Die Existenz und Anreicherung einer intakten Nukleotidsequenz der DNS-Bindestelle von IolR nach dem DNase-Verdau konnte nicht mittels Kapillarelektrophorese nachgewiesen werden. Da eine kurze Nukleotidsequenz der IolR-Bindestelle zu vermuten ist, würde ein Nachweis wahrscheinlich unter der instrumentellen Nachweisgrenze des Agilent 2100 Bioanalyser liegen. Der mitgeführte Marker lässt auf eine minimale detektierbare Länge eines 35 bp DNS-Fragment schließen.

Es können anhand von Promotorcharakteristika Hinweise auf den Repressionsmechanismus gewonnen werden (Rojo, 2001). Am Beispiel des Repressors LacI ist dessen Repressionseffizienz von der Konkurrenz der RNA-Polymerase an den überlappenden Bindestellen und von der Rate der Promotorfreisetzung abhängig (Rojo, 1999). Die Promotorfreisetzung ist von der Affinität der RNA-Polymerase abhängig, d.h. ist die Konsensussequenz stark konserviert und die Bindefestigkeit der RNA-Polymerase hoch, erfolgt eine Promotorfreisetzung mit einer geringeren Rate. Die Promotorstruktur der *iol*-Gene mit zwei IolR-Bindestellen, die hohe Repressionseffizienz infolge der Bindungsaffinität des Repressors zu seiner DNS-Zielstruktur und die Fähigkeit der Kooperation bzw. Oligomerisierung, bekräftigen die Annahme einer transkriptionellen Regulation des Repressors durch eine Veränderung der DNS-Topologie. Entweder wird RNA-Polymerase blockiert, oder kann durch sterische Hinderung nicht an seine DNS-Zielstruktur binden. Als weitere Untersuchung hätte die Bindungskinetik von IolR in An- und Abwesenheit der RNA-Polymerase verglichen werden können, um die Existenz von sich überlappenden Bindestellen nachzuweisen. Die RNA-Polymerase würde sich in der mobilen Phase befinden und vor der Injektion des Repressors über die Sensoroberfläche geschickt werden. Sobald die RNA-Polymerase bindet, sind bei sich überlappenden DNS-Zielstrukturen diese für IolR nicht mehr zugänglich, wodurch nach dessen Injektion keine Detektion der Bindung erfolgen würde. Überlappen sich die Bindestellen der beiden Proteine nicht, wäre nach Injektion des Repressors der typische Verlauf einer Assoziation zu erkennen.

In dieser Arbeit konnte ein Modell für die Transkriptionseinhibition der *iol*-Gene aufgestellt werden, wonach der heterogene Phänotyp von *S. Typhimurium* während des Wachstums mit MI von der Menge und Wirkungsweise des Repressors abhängig ist. In Anwesenheit von MI wurde die Expression des *iolR*-Gens nachgewiesen, die eine heterogene Merkmalsausprägung innerhalb der Population aufwies und im weiteren Verlauf des Wachstums zunehmenden einheitlicher wurde. Der bistabile Phänotyp kann durch eine variierende Kopienzahl des heterogen transkribierten IolR in den einzelnen Zellen entstehen. In einigen Zellen wird der Grenzwert an „aktiven“ IolR-Molekülen in Abhängigkeit eines hohen intrazellulären DKGP-Spiegels nicht überschritten, so dass die *iol*-Gene induziert werden können. In anderen Zellen greift nach einer Grenzwertüberschreitung des aktiven Proteinanteils bei einer niedrigen Konzentration des Intermediates die Repression der Zielgene. Im weiteren Verlauf des Wachstums mit

MI häuft sich das Intermediat DKGP innerhalb der Zelle immer weiter an, welches zunehmend den Repressor inaktiviert und dieser von der DNS dissoziiert, dass auch in den Zellen mit vorheriger Grenzwertüberschreitung der „aktiven“ IolR-Menge die Repression aufgehoben wird. Die Repression eines *iol*-Gens wird durch mindestens zwei oder mehr IolR-Proteine bewerkstelligt. Da IolR seine Funktion in gleichermaßen über die *iol*-Gene der GEI4417/4436 ausübt, ist eine erhöhte Kopienzahl an DKGP-ungebundenen Proteinen erforderlich, um alle *iol*-Gene an ihrer Expression bzw. zumindest die *reiD*-Genexpression zu reprimieren. Sobald der Aktivator in der Lage ist, durch den positiven Rückkopplungsmechanismus seine Produktion sowie die der initialen Enzyme IolG1 und IolE zu induzieren, kann durch die Genprodukte das Intermediat vermehrt gebildet und der Repressor vollständig inhibiert werden. Bistabilität konnte ebenfalls in der *reiD*-Genaktivität beobachtet werden. Der Aktivator unterliegt als nachgeschaltetes Gen der Kontrolle des heterogen exprimierten Repressors IolR, wodurch sich das Rauschen der *iolR*-Genexpression in der Genaktivität von *reiD* fortsetzt. Ein bistabiles Expressionsverhalten konnte somit für beide Regulatoren der GEI4417/4436 und die von ihnen kontrollierten Gene *iolC* und *iolE* auf Einzelzellebene beobachtet werden. Durch die Aufklärung des Bindungsverhaltens des Repressors IolR an seine Zielstrukturen innerhalb der *iol*-Promotoren konnte ein komplexer Bindemechanismus aufgedeckt werden, der sich gleichermaßen auf die *iol*-Promotoren auswirkt. Dieser ist durch zwei Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität gekennzeichnet und könnte durch zelluläre Entscheidungen in den individuellen Zellen ein bistabiles Verhalten innerhalb der isogenen Population zulassen. Es wurde bereits bewiesen, dass der diauxische Effekt auf die phänotypische Heterogenität koexistierender Zustände zurück zu führen ist und durch Entscheidungen auf zellulärer Ebene entstehen (Solopova *et al.*, 2014). Das Phänomen der Diauxie ist dabei abhängig von der Katabolitrepression, der mit der metabolischen Fitness zusammenhängenden stringenten Antwort und den vorangegangenen Bedingungen. Die zelluläre Entscheidung von *Salmonella* in Anwesenheit von MI wird durch die Fluktuationen in der *iolR*-Genexpression und die „aktive“ IolR-Menge innerhalb der jeweiligen Bakterienzelle diktiert, die wiederum von der DKGP-Konzentration beeinflusst wird und bei Grenzwertunterschreitung das Eintreten einer positiven Rückkopplung des Aktivators ermöglicht. Ein Zusammenhang zwischen der zellulären Entscheidung für einen Zustandswechsel und dem Auftreten von Fluktuationen wurde bereits für rauschanfällige Gen-Netzwerke und die Anwesenheit von Rückkopplungsmechanismen festgestellt

(Balázsi *et al.*, 2011). Die Anzahl an inaktiven IolR innerhalb der Zelle erlaubt bei Abnahme des intrazellulären DKGP-Spiegels infolge der sich verändernden Umweltbedingungen eine schnell einsetzende Repression der *iol*-Gene. Somit scheint die Bereitstellung des Intermediates über den Transport von MI ins bakterielle Zytosol und der von ReiD induzierte initiale Abbau durch IolG1 und IolE der zentrale Punkt für die zelluläre Entscheidung über einen Wechsel in Bezug auf einen induzierten Zustand für die *iol*-Genexpression zu sein.

4.2. Der Hysterese-Effekt unterliegt einem passiven Mechanismus, da eine anhaltende *iol*-Genexpression in Abwesenheit von MI mit einem Fitnessnachteil verbunden ist

4.2.1. Der Gedächtnisverlust kann durch zelluläre Entscheidungen sowie epigenetische Einflüsse erklärt werden und ist als passiver Mechanismus anzusehen

Die phänotypische Heterogenität wurde anhand der verschiedenartigen Koloniemorphologie von *S. Typhimurium* während des Wachstums auf Festmedium mit MI erkannt. Einige Bakterien der gesamten Zellpopulation wuchsen schneller als die restliche Population und bildeten Kolonien auf einem dünnen Bakterienrasen (Kröger *et al.*, 2011). Durch weitere Passagierung dieser Kolonien auf Festmedium mit MI konnte eine phänotypische Heterogenität nicht mehr beobachtet werden. Die Bistabilität von *S. Typhimurium* in Anwesenheit von MI wurde als reversibel angesehen, die nicht auf genetische Mutationen zurückzuführen war (Kröger *et al.*, 2011). Des Weiteren deckten quantitative Wachstumsdaten ein schnelles und einheitliches Wachstumsverhalten auf, wenn eine vorherige Anpassung der Salmonellen an diese Bedingungen erfolgte (Hellinckx & Fuchs, 2016). Die an MI-adaptierten Zellen wurden anschließend in nährstoffreichem Medium inkubiert, und nach Reinokulation in MM mit MI konnte eine graduell verlängerte Anlaufphase in Abhängigkeit der Inkubationszeit in LB-Medium beobachtet werden. Nach einer Inkubation von mehr als 8 Stunden unter nährstoffreichen Bedingungen wurde die Hysterese vollständig aufgehoben und erneut die verlängerte Anlaufphase der Salmonellen in Abhängigkeit von MI beobachtet. Dies wurde ebenfalls für *E. coli* bei zyklisch wechselnden Glukose-Laktose-Bedingungen beschrieben (Lambert & Kussell, 2014). Die sich graduell verlängernde Anlaufphase deutet auf ein Gedächtnis von *Salmonella* hin. Es erlaubt ihnen, ihren Metabolismus für den Abbau eines Substrates aufrechtzuerhalten, falls dieses Substrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle in der Umgebung wieder verfügbar wird.

In dieser Arbeit wurde ein Hysterese-Effekt von *S. Typhimurium* auf Einzelzellebene in Form einer anhaltenden transkriptionalen *iolE*-Genaktivität unter nährstoffreichen Bedingungen aufgedeckt. Während der Anpassung an diese Umgebungsbedingungen ist *Salmonella* bis zu 4 Stunden in der Lage das Substrat abzubauen, auch wenn der induzierende Stimulus in der nährstoffreichen Umgebung schon verschwunden ist. Durch die Bestimmung der Zellzahl der an MI-adaptierten Salmonellen während des Wachstums in LB-Medium (s. Tab. 19) konnte die Anzahl der Zellteilungen, sowie die Teilungsrate zwischen den Zeitpunkten t_0 und t_4 analog zur Formel 4 bzw. 5 berechnet werden.

Tab. 19: Die Zellzahl pro ml von MI-adaptierten Salmonellen während des Wachstums unter nährstoffreichen Bedingungen. Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Anpassung von *S. Typhimurium* 14028 an MI durch mehrere Passagen. Die optische Dichte einer MI-ÜNK dieses Bakterienstammes wurde auf 0,5 eingestellt, 1:300 in LB-Medium inokuliert und stehend für 8 Stunden bei 37 °C inkubiert. Stündlich wurde eine Probe entnommen, mehrere Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten ausplattiert und diese für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden ausgezählt und die Zellzahl analog zu Formel 1 von drei biologischen und zwei technischen Replikaten ermittelt.

Zeit [h]	Zellzahl pro ml
0	$1,18 \pm 0,11 \times 10^6$
2	$1,22 \pm 0,24 \times 10^6$
4	$3,72 \pm 0,66 \times 10^7$
6	$4,89 \pm 0,73 \times 10^8$
8	$5,99 \pm 0,64 \times 10^8$

Aus der Berechnung geht hervor, dass sich die Zellen mit einer Teilungsrate von $0,4 \text{ h}^{-1}$ innerhalb von vier Stunden ungefähr verdoppeln ($n = 1,66$). Durch die vermehrte Zellteilung in LB-Medium entstehen Tochterzellen, die auf der einen Seite einen Teil des Proteoms u.a. Membranproteine oder zytosolische Proteine von der Mutterzelle erhalten, und auf der anderen Seite die *iolE*-Genexpression durch die positive Rückkopplung des Aktivators aufrechterhalten können. Der epigenetische Ursprung der phänotypischen Heterogenität konnte bereits mehrfach auf das an die Tochterzellen weitergegebene Proteom der Zellmembran zurückgeführt werden (Ozbudak *et al.*, 2004; Marbach & Bettenbrock, 2012; Solopova *et al.*, 2014). Die vererbten *iol*-Genprodukte, z.B. *ReiD*, *IolG1*, *IolE* und *IolT1*, liegen als zelluläre Bestandteile, entweder frei löslich im Zytosol oder als membrangebundene Proteine in den sich teilenden Zellen vor und befähigen die Tochterzellen das Gedächtnis aufrechtzuerhalten, solange die intrazelluläre Konzentration der *iol*-Genprodukte einen bestimmten Grenzwert nicht unterschreitet. Durch die Deletion des Regulators zeigte sich ebenfalls eine Abnahme des Gedächtnisses,

bevor beim Eintritt der bakteriellen Kultur in die exponentielle Wachstumsphase die *iol*-Gene durch die fehlende Repression von IolR exprimiert wurden. Der Hysterese-Effekt ist somit unabhängig vom Regulator, was ebenfalls durch quantitative Wachstumsdaten beobachtet wurde (Hellinckx & Fuchs, 2016). Hier könnten andere globale Regulatoren, wie z.B. H-NS oder CRP die Deletion von IolR kompensieren. In aktuellen Untersuchungen zur Aufklärung des Hysterese-Effektes wurde der Begriff „zelluläres Gedächtnis“ eingeführt, das in seiner Ausprägung von der Halbwertszeit und Degradation der zellulären Komponenten bestimmt wird (Lambert & Kussell, 2014; Mathis & Ackermann, 2017). Der Grad des zellulären Gedächtnisses der Salmonellen an den Abbau von MI ist als gering einzuschätzen, wenn ein Gedächtnisverlust bereits nach zwei Zellteilungen eintritt und dieser unabhängig von dem unter diesen Bedingungen produzierten Repressor ist. Die notwendige Grenzwertüberschreitung des Repressors, die die *iol*-Genexpression zum Erliegen bringt, ist in den ersten 4 Stunden unter nährstoffreichen Bedingungen nicht ausschlaggebend. Eine Verdünnung der zellulären *iol*-Genprodukte durch Zellteilung würde den Verlust des zellulären Gedächtnisses erklären, wodurch es eher als passiver Mechanismus angesehen werden kann (Lambert & Kussell, 2014). Dabei könnte die Abundanz des Aktivators und die der Transportmoleküle für MI z.B. IolT1-Permease in der bakteriellen Zellmembran, sowie die extra- und intrazelluläre MI-Konzentration während des Gedächtnisverlust von Bedeutung sein. Durch die Verdünnung der *iol*-Genprodukte infolge der Zellteilung unter nährstoffreichen Bedingungen, wird die IolT1-Menge in der Zellmembran nahezu halbiert und infolge dessen weniger MI in die Zelle transportiert. Die intrazelluläre MI-Konzentration stellt die Menge des Ausgangsproduktes und diktiert die Höhe des DKGP-Spiegels. Die Produktion des Intermediates ist wiederum von der induzierenden Funktion des Aktivators abhängig. Die verbleibenden Transportproteine können nur in Abhängigkeit von der extrazellulären MI-Konzentration die benötigte Menge des Polyols in das Zytosol transportieren. Sollte sich die Umgebung wieder zu Bedingungen mit MI als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verändern, könnte bei hoher extrazellulärer MI-Konzentration und einer hohen Proteinaktivität der verbliebenen Transportmoleküle eine hohe intrazelluläre MI-Konzentration erreicht und der Stoffwechselweg über die nicht-kompetitive Hemmung des Repressors aufrechterhalten werden. Die Abhängigkeit des Wachstums von der extrazellulären MI-Konzentration, sowie eine hohe Enzymaktivität des IolT1-Transporters unter Bedingungen mit MI bestätigen die Vermutung, dass der Hysterese-Effekt auf molekularer Ebene von der Abundanz der

Transportmoleküle, sowie der extra- und intrazellulären MI-Konzentration abhängig sein könnte (Kröger & Fuchs, 2009; Kröger *et al.*, 2010).

Ein schwaches zelluläres Gedächtnis ermöglicht den Bakterien eine schnelle Reaktion auf eine sich verändernde Umwelt. Es kann in diesem Zusammenhang eine Strategie von *S. Typhimurium* darstellen, limitiert vorkommende Nährstoffe einer metabolischen Nische, wie z.B. des Darms zu nutzen, und, wenn diese nicht mehr verfügbar sind, einen Energieverlust durch eine unvorteilhafte Genexpression verhindern. Jedoch ist die Existenz eines Gedächtnisses von Relevanz, da *Salmonella* bei erneutem Wechsel der Umgebungsbedingungen mit MI als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle einen Selektionsvorteil hat, da eine Degradation des Polyols direkt einsetzen kann.

Bei der Betrachtung der Daten aus der Durchflusszytometrie muss die instrumentelle Nachweisgrenze des FACS ARIA II bedacht werden. Manche gemessenen Fluoreszenzsignale sind so gering, dass sie nicht mehr von der Fluktuation des Untergrundsignals oder des Blindwertes unterschieden werden können. In dieser Arbeit wurde als Referenzwert die Eigenfluoreszenz des parenteralen Stammes genommen und ein Bereich für diese Grenze der Lichtemission definiert. Die Autofluoreszenz von Bakterien beruht auf der Anregung endogener Fluorophore durch Licht, z.B. aromatischen Aminosäuren v.a. Tryptophan, die Coenzyme Flavin-Adenin-Dinukleotid bzw. Nikotinamidadenindinukleotid oder Porphyrine wie Cytochrome. Die Eigenfluoreszenz stellt zwar nur ein Schätzwert dar, der ebenfalls enormen Streuungen bei der Messung unterliegt, aber von großer Bedeutung für die vergleichende Betrachtung der Fluoreszenzwerte ist. Die Auswertung der bakteriellen Autofluoreszenz deckte eine gemittelte Fluoreszenzintensität von $233,6 \pm 220,2$ für MvP101 auf, die von einer hohen Standardabweichung, sowie einem hohen Variationskoeffizienten geprägt war (s. Abb. 38 und Abb. 39 im Anhang). Die Schlussfolgerung, dass der Gedächtnisverlust innerhalb von 4 Stunden in Abwesenheit von MI stattfindet, ist durch Werte der Fluoreszenzintensität für den Bakterienstamm MvP101 $P_{ioIE}::gfp$, die sich nahe an der durchschnittlichen Autofluoreszenz befanden, zeitlich nicht als präzise anzusehen. Die hohe bakterielle Autofluoreszenz, die Integration einer *gfp*-Genkopie im Chromosom und die niedrige Auflösungsgrenze des Durchflusszytometer erschwert einen präziseren zeitlichen Nachweis des Gedächtnisverlustes nach Überführung in nährstoffreiches Medium (s. Tab. 15). Die Fluoreszenzintensität stellt einen Zahlenwert ohne genaue

Maßeinheit dar, der von der Konzentration der Gfp-Moleküle innerhalb der bakteriellen Zelle abhängig ist, aber mit dieser in keinem linearen Verhältnis steht. Daher ist die gemessene Intensität als willkürliche Fluoreszenzeinheit und nicht als molekulare Einheit anzusehen, die eine quantitative Auswertung bzw. Rückschlüsse auf die Anzahl der Gfp-Moleküle verwehrt (Raj & van Oudenaarden, 2009).

4.2.2. Eine unpassende *iol*-Genexpression geht auf Kosten der bakteriellen Fitness unter nährstoffreichen Bedingungen

Im vorherigen Abschnitt wurde der Hysterese-Effekt als passiver Mechanismus enttarnt, der aufgrund eines epigenetischen Ursprunges der *iol*-Genprodukte für kurze Zeit in den Zellen aufrechterhalten wird. Mit zunehmenden Wachstum unter nährstoffreichen Bedingungen kommt die *iol*-Genexpression nach ungefähr zwei Zellteilungen vollständig zum Erliegen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bakterien in der Lage sind ihren Stoffwechsel schnell auf die neuen Umgebungsbedingungen umzustellen und dadurch keine Energieressourcen durch eine anhaltende unnötige Genexpression verschwenden. Der Energiehaushalt der bakteriellen Zelle spielt eine wichtige Rolle für das Überleben in einer sich verändernden Umwelt. Im Folgenden wurden die Kosten einer unpassenden *iol*-Genexpression auf die bakterielle Fitness von Salmonellen unter nährstoffreichen Umgebungsbedingungen untersucht.

Um den Zustand einer induzierten *iol*-Genexpression unabhängig von den Umgebungsbedingungen zu untersuchen, wurde der Repressor des MI-Metabolismus deletiert und dadurch eine andauernde Genaktivität künstlich erzeugt. Die Fitness der Bakterienstämme mit einer konstitutiven *iol*-Genexpression wurden in einem kompetitiven Index mit ihrem parenteralen Stamm verglichen. Es zeigte sich, dass der parenterale Stamm die Zellen mit unnötig induzierter *iol*-Genexpression in einer nährstoffreichen Umgebung überwächst und dass dessen Fitnessnachteil im Zusammenhang mit der Anwesenheit der *iol*-Gene steht, da durch die Deletion der GEI4417/4436 der Wachstumsnachteil gegenüber dem parenteralen Stamm aufgehoben wurde. Durch kreuzmarkierte Bakterienstämme konnte ein Fitnessnachteil aufgrund der Resistenzausbildung ausgeschlossen werden, da auch hier eine konstitutive *iol*-Genexpression zu einem Wachstumsnachteil führte. Der Einfluss der energieaufwändigen *iol*-Genexpression manifestierte sich in einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit der Salmonellen mit konstitutiver *iol*-Genexpression von 15,4 bzw. 27,0 % im Vergleich zum parenteral Stamm (s. Tab. 13). Die abnehmende

Wachstumsgeschwindigkeit jedes Bakterienstammes scheint in Abhängigkeit der fortlaufenden Passage des kompetitiven Index zu stehen, wobei der genaue Zusammenhang nicht näher untersucht wurde. Der Wachstumsnachteil einer konstitutiven *iol*-Genexpression unter nährstoffreichen Bedingungen konnte durch eine Komplementation mit dem Vektor pBR-*iolR* nicht vollständig aufgehoben werden, so dass eine funktionelle *in trans* Ergänzung der *iolR*-Deletion überwiegend anzunehmen ist. Wenn der kompetitive Index in MM mit MI durchgeführt wurde, zeigte sich ein signifikanter Selektionsvorteil durch eine induzierte *iol*-Genexpression, d.h. die Zellen, die auf diese Bedingungen vorbereitet sind, können bei einem zufälligen Wechsel mit für sie günstigen Umgebungsbedingungen das Substrat sofort abbauen und dadurch andere Zellen, die ihren Stoffwechsel erst umstellen müssen, verdrängen.

Bei einer Makrophageninfektionsanalyse zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Überlebensrate der *iolR*-Deletionsmutate von 32 % im Vergleich zum parenteralen Stamm, wodurch ein Wachstumsnachteil während der Infektion infolge der aufgehobenen Repression der *iol*-Gene auftrat (Klumpff & Fuchs, 2007). Die Produktion von bis zu 16 Enzyme im *iolR*-negativen Stamm beeinflusst somit die zelluläre Fitness und die Wachstumsgeschwindigkeit unter optimalen Umgebungsbedingungen. Dies konnte auch für missgefaltete Yfp-Proteine beobachtet werden, die einen Wachstumsnachteil von 3,2 % in Hefen bewirken (Geiler-Samerotte *et al.*, 2011). Weiterhin wäre der Transportprozess von MI zu betrachten, da dieser bei höherem Energieverbrauch für die bakterielle Zelle ungünstig wäre. Der Haupttransporter IolT1 wurde als MI/H⁺-Symporter identifiziert, wodurch der Transport des Polyols ins bakterielle Zytosol durch den sekundär aktiven Transport der Protonen (H⁺) ermöglicht wird. Dieser Transport wiederum wird energetisch durch den Protonengradienten getrieben, der unter ATP-Verbrauch aufgebaut wurde. Dieser Symporter trägt zum Protonengradienten an der Cytoplasmaseite bei, wodurch das elektrochemische Potential und damit die Elektronentransportkette aufrechterhalten wird. Das führt zu dem Schluss, dass der Transport von MI über den Haupttransporter IolT1 von dem Konzentrationsgefälle des Protonengradienten abhängig ist, aber nicht als energieaufwändiger Prozess angesehen werden kann. Die physiologische Last der Zelle infolge einer unnötigen Genexpression oder Proteinaktivität konnte bereits mehrfach bestätigt werden. So zeigt sich beispielsweise im Laktoseabbau, dass die Kosten der bakteriellen Fitness mit der Transkription und Translation der *lac*-Gene, aber nicht mit den Genprodukten

zusammenhängen (Stoebel *et al.* 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der *lac*-Permease LacY zur physiologischen Last in *E. coli* führt (Eames & Kortemme, 2012). Auch die Expression von Virulenzgenen, die das T3SS exprimieren, kann sich negativ auf das Wachstumsverhalten von *Salmonella* auswirken (Sturm *et al.*, 2011).

Die Resistenz gegenüber Kanamycin wird durch ein chromosomal integriertes Gen ermöglicht, das für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase kodiert. Kanamycin wird durch dieses Enzym an einer spezifischen Stelle phosphoryliert und unwirksam gemacht, so dass es nicht mehr an die 30S-Untereinheit der Ribosomen binden und die Translation nicht behindern kann. Vor Beginn des Index wurde die Kan^R-Mutante als Kontrolle auf Festmedium mit und ohne Kanamycinzusatz ausplattiert, um beurteilen zu können inwiefern die ermittelte Zellzahl pro ml auf dem Kanamycin-haltigen Festmedium die tatsächliche Anzahl der resistenten Bakterien widerspiegelt, die im Index vorhanden sind. Nach der Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden wurde die Zellzahl pro ml auf dem jeweiligen Medium bestimmt. Nach der Berechnung des Wachstumsnachteils analog zu Formel 3 wurde eine durchschnittliche Abweichung von $10,12 \pm 4,13$ % für 14028 *iolR*::Kan^R und $3,74 \pm 5,82$ % für 14028 *dacB*::Kan^R zur tatsächlichen Anzahl der Kanamycin-resistenten Bakterien ermittelt, wenn diese auf einem Festmedium ohne Antibiotikum ausplattiert werden.

Tab. 20: Wachstumsnachteil der Kanamycin-resistenten Bakterienstämme des kompetitiven Index durch paralleles Ausplattierung auf LB-Agarplatten mit und ohne Kanamycinzusatz. Die Berechnung erfolgte analog zu Formel 3 und wurden aus drei biologischen und drei technischen Replikaten ermittelt. Ein Wachstumsvorteil des Stammes auf Festmedium mit Kanamycinzusatz wurde mit einer Null aufgeführt.

Bakterienstamm (Kan ^R)	Zellzahl pro ml auf Festmedium		Wachstumsnachteil [%]
	ohne Antibiotikazusatz	mit Kanamycinzusatz	
14028 <i>iolR</i> ::Kan ^R	$4,25 \times 10^8$	$3,96 \times 10^8$	6,78
	$4,42 \times 10^8$	$3,77 \times 10^8$	14,74
	$3,10 \times 10^8$	$2,82 \times 10^8$	8,83
14028 <i>dacB</i> ::Kan ^R	$2,91 \times 10^8$	$2,98 \times 10^8$	0 [†]
	$4,77 \times 10^8$	$4,34 \times 10^8$	9,06
	$3,67 \times 10^8$	$3,58 \times 10^8$	4,64

[†] Der Vorteil auf Festmedium mit Kanamycin betrug für dieses biologische Replikat 2,47 %

Bei einem biologischen Replikat wurde eine höhere Zellzahl pro ml auf Festmedium mit Kanamycinzusatz ermittelt, wodurch sich ein Wachstumsvorteil von 2,47 % für diesen Stamm ergab. Die Ausbildung der Kanamycin-Resistenz nimmt somit Einfluss auf das

Wachstumsverhalten der eingesetzten Stämme, aber diktiert nicht das Ergebnis des kompetitiven Index, da ein hoch signifikanter Unterschied davon nicht abgedeckt wird. Vorangegangene Untersuchung bestätigen, dass die Resistenzen gegenüber Antibiotika auf Kosten der bakteriellen Fitness geht (Andersson & Levin, 1999; Wichelhaus *et al.*, 2002; Enne *et al.*, 2004; Gagneux *et al.*, 2006).

4.2.3. Eine *bet-hedging* Strategie konnte für die Verstoffwechslung von *myo*-Inositol in *Salmonella* ausgeschlossen werden

Bei der *bet-hedging* Strategie werden verschiedene Nachkommen mit gleichem Genotyp aus einer Generation hervorgebracht, die sich aber in ihrer Anpassung an die Umwelt unterscheiden. Diese Strategie stellt durch Ausbildung mehrerer Varianten eine Art Risikostreuung der Bakterien dar, wobei ein Teil der Population unter gleichbleibenden Bedingungen zwar geringere Überlebenschancen hat, aber der Fortbestand der eigenen Art durch mindestens einen adaptierten Phänotyp in einer sich schnell ändernden Umwelt gesichert ist. Beispielsweise können verschiedene metabolische Zustände zur selben Zeit in einer isogenen Bakterienpopulation koexistieren, sodass bei sich verändernden Bedingungen zumindest eine Variante die Substrate in der Umgebung sofort verstoffwechseln kann (Solopova *et al.*, 2014). Die den Bakterien innenwohnende Stochastizität der Genaktivität ermöglicht die Ausbildung und Koexistenz metabolischer Zustände innerhalb einer isogenen Population (Kiviet *et al.*, 2014). Des Weiteren können sich im Wirt verschiedene *Salmonella*-Subpopulationen bilden, die entweder den Weg einer Infektion beschreiten oder den Zustand der Persistenz ausbilden, der sie vor den Abwehrmechanismen des Wirts und einer antibiotischen Behandlung schützt, sowie einen relapsierenden Infektionsverlauf zulässt (Balaban *et al.*, 2004; Helaine *et al.*, 2014). Der Modellorganismus *Bacillus subtilis* kann eine große Vielzahl von Phänotypen entwickeln, um sein Überleben unter nährstofflimitierenden Bedingungen zu sichern, z.B. die Induktion der Sporulation (Veening *et al.*, 2008a, 2008b), der Wechsel zwischen einem motilen und sessilen Zustand (Piggot, 2010), der Kannibalismus als Sporulations-Verzögerungsmechanismus (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003; Chastanet *et al.*, 2010) und der Zustand der Kompetenz (Dubnau & Losick, 2006; Veening *et al.*, 2008b; Yüksel *et al.*, 2016). Letzteres wurde in *Streptococcus pneumoniae* durch eine antibiotische Behandlung induziert (Prudhomme *et al.*, 2006; Slager *et al.*, 2014).

In Bezug auf den MI-Metabolismus würden Varianten mit aktiver *iol*-Genexpression als Nachkommen hervorgebracht, die an eine Umwelt mit MI als einzige Kohlenstoff- und

Energiequelle bereits angepasst sind, obwohl sie dieser bisher noch nie ausgesetzt waren. Aus Tab. 16 ist zu erkennen, dass mit fortschreitendem Wachstum unter nährstoffreichen Bedingungen Nachkommen hervorgebracht werden, die sich anhand der *iolE*-Genexpression in einem induzierten Zustand für den Abbau von MI befinden. Diese Subpopulation wies ein Fluoreszenzsignal von mehr als 3×10^2 FI auf, und macht einen Anteil von 0,3 bis 0,1 % innerhalb der Population aus. Die durchschnittliche Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101 umfasst den Bereich der Fluoreszenzintensität von $233,6 \pm 220,2$ FI, wodurch sich der gewählte Grenzwert der Gfp-Signalstärke im Bereich der Standardabweichung der Autofluoreszenz befindet. Daher ist der Anteil der induzierten Subpopulation als falsch-positives Ergebnis zu interpretieren, da man das Gfp-Signal weder von der bakteriellen Autofluoreszenz, noch von dem Hintergrundrauschen des Durchflusszytometers unterscheiden kann. Durch diese Untersuchung konnte das Auftreten des *bet-hedging* für die *iol*-Genexpression in *S. Typhimurium* während des Wachstums unter nährstoffreichen Bedingungen nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend wurde die *iol*-Genexpression von *S. Typhimurium* auf die Beschaffenheit des Hysterese-Effektes, als Gedächtnis an eine vorangegangene Umgebung, und auf die potentielle Anwendung einer *bet-hedging* Strategie, als Vorbereitung auf ungewisse zukünftige Bedingungen untersucht. Die Anwendung einer *bet-hedging* Strategie für die *iol*-Genexpression konnte in *Salmonella* nicht beobachtet werden. Das Auftreten von Hysterese im bakteriellen Reich wurde bereits mehrfach beschrieben, z.B. zeigt *Caulobacter crescentus* bei Inkubation mit moderaten Natriumchloridkonzentrationen eine größere Überlebenschance bei höheren Konzentrationen in Abhängigkeit der Zeit zwischen den Expositionen (Mathis & Ackermann, 2016). In einer weiterführenden Studie von Mathis & Ackermann zeigte derselbe Modellorganismus ein asymmetrisches Gedächtnis zwischen sessiler Mutterzelle und motiler Tochterzelle, die den Nachkommen einen hohen Grad des zellulären Gedächtnisses mit auf den Weg in eine ungewisse Zukunft geben (Mathis & Ackermann, 2017). Die Ausbildung eines motilen oder sessilen Zustandes bei *Bacillus subtilis* unterliegt ebenfalls einem Hysterese-Effekt (Norman *et al.*, 2013). *E. coli* zeigte in einer Umgebung mit fluktuierenden Kohlenstoffquellen zwei Arten eines nicht-genetisch bedingten Gedächtnisses, welche in Abhängigkeit der auftretenden Fluktuationen jeweils von Vorteil sind. Das phänotypische Gedächtnis wird als adaptierte

Ausprägung angesehen, indem der induzierte Zustand bis zur Unterschreitung der minimal benötigten Proteinkonzentration, infolge der Zellteilung, aufrechterhalten wird. Diese Strategie ist bei Fluktuationen über mehrere Generationen vorteilhaft. Auf der anderen Seite steht das reaktionsabhängige Gedächtnis, dass eine anhaltende Genexpression in Abwesenheit des induzierenden Stimulus aufrechterhält, und bei schnell auftretenden Schwankungen innerhalb einer Generation einen Selektionsvorteil mit sich bringt (Lambert & Kussell, 2014). Für *S. Typhimurium* konnte ein Gedächtnis bei einer transkriptionellen Hitzeschockantwort beobachtet werden, weil die Hitzeschock-induzierenden Gene in einem induzierten Zustand bleiben, auch wenn die Stressbedingungen nicht mehr vorhanden sind (Pin *et al.*, 2012). Die Faktoren, die den instabilen Hysterese-Effekt von *S. Typhimurium* diktieren, sind noch nicht vollständig aufgedeckt, wobei der Einfluss von deterministischen Komponenten, wie beispielsweise stochastische Fluktuationen der IolR-Menge, der positive Rückkopplungsmechanismus und die intrazelluläre DKGP-Konzentration, aber auch epigenetische Faktoren in Form des Proteoms der Mutterzelle maßgeblich sein können. Das Gedächtnis von *Salmonella* an den Abbau von MI über zwei Zellteilungen hinweg kann jedoch als passiver Mechanismus angesehen werden. Dadurch entstehen der bakteriellen Zelle keine langfristigen energetischen Kosten, aber durch den Einfluss der Epigenetik, sowie der Architektur der Rückkopplungsschleifen von *ReiD* ein Nutzen für sie, falls sich die Bedingungen wieder verändern und nur das Polyol in der Umgebung verfügbar ist.

4.3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein komplexer und kooperativer DNS-Bindemechanismus des IolR-Repressor an seine DNS-Zielstrukturen innerhalb der *iol*-Promotoren P_{iolT1} , P_{iolR} und P_{reiD} aufgedeckt. Die *iol*-Promotoren weisen zwei voneinander entfernte IolR-Bindestellen auf, die mit unterschiedlicher Affinität vom Repressor gebunden werden. Die Werte der Affinitätskonstante liegen im nanomolaren-Bereich, wodurch die bereits beschriebene strikte Kontrolle der *iol*-Gene erklärt wird (Kröger & Fuchs, 2009). Die transkriptionelle Repression läuft in Prinzip eines AB-BA-Mechanismus mit anschließender Oligomerisierung ab, wodurch sich die Topologie der DNS verändert und die RNA-Polymerase in ihrer Funktion blockiert wird. Der Repressor wird sowohl in An- als auch in Abwesenheit von MI produziert (Kröger & Fuchs, 2009) und kann über eine nicht-kompetitive Hemmung von dem Intermediat DKGP inhibiert werden (Yoshida *et al.*, 2008), sodass er durch eine induzierte Konformationsänderung

von seiner DNS-Zielstruktur dissoziiert. Die IolC-Kinase liegt durch die zunehmende *iolC*-Genaktivität innerhalb der bakteriellen Zelle vor und gewährleistet einen hohen intrazellulären DKGP-Spiegel für eine anhaltende Inaktivierung des Repressors in Anwesenheit von MI.

Auf Einzelzellebene konnte das Phänomen der Bistabilität für die Genaktivität der Regulatoren und für die ihnen nachgeschalteten Gene *iolE* bzw. *iolC* beobachtet werden. Zudem unterlag die Genaktivität als auch die Produktion der Regulatoren großen Fluktuationen, die sich auf der Genexpression der von ihnen kontrollierten Genen auswirkte. Eine Bistabilität innerhalb der *iol*-Genexpression von *S. Typhimurium* kann während des Wachstums mit MI durch eine variierende Kopienzahl des heterogen transkribierten Repressors und dem intrazellulären DKGP-Spiegels, der wiederum von der Anzahl bzw. Aktivität der Transportmoleküle sowie der Funktion des Aktivators abhängig ist, erklärt werden. Die Genaktivität des *iolT1*-Gens blieb unterhalb der instrumentellen Nachweisgrenze, so dass entweder nur eine geringe IolT1-Menge erforderlich ist oder mehrere Transportmoleküle beteiligt sind. Unter Wachstumsbedingungen mit MI ist die Menge an „aktiven“ IolR-Molekülen und eine ausreichende Anzahl an DKGP-Molekülen für die zelluläre Entscheidung eines Zustandswechsels entscheidend. Bei einem niedrigen DKGP-Spiegel und einer Grenzwertüberschreitung des Repressors liegen die Zellen in einem uninduzierten Zustand der *iol*-Genexpression vor. Sollte eine Grenzwertunterschreitung bzw. eine hohe intrazelluläre DKGP-Konzentration in der Zelle vorherrschen, dann kommt es zu einem Wechsel in den induzierten Zustand der *iol*-Genexpression. Die Bistabilität von *S. Typhimurium* während des Abbaus von MI kann jedoch als transienter Zustand angesehen werden, da im weiteren Verlauf des Wachstums immer mehr Zellen einen Zustandswechsel vollziehen und der Variationskoeffizient abnimmt. Die inaktivierten IolR-Moleküle ermöglichen bei einer abnehmenden DKGP-Konzentration eine schnell einsetzende Repression bei sich verändernden Umgebungsbedingungen.

Der Hysterese-Effekt ist als bakterielles Gedächtnis anzusehen, das sich in Form eines anhaltenden Zustandes äußert, auch wenn der induzierende Stimulus nicht mehr vorhanden ist. Während des Wachstums von *S. Typhimurium* unter nährstoffreichen Bedingungen konnte beobachtet werden, dass die *iolE*-Genexpression für 4 Stunden aufrechterhalten wurde. Jedoch unterliegt dieser Effekt in *Salmonella* einem passiven

Mechanismus, da nach zwei Zellteilungen unabhängig von dem Repressor die *iol*-Genexpression zum Erliegen kommt. Die Verdünnung der zellulären Komponenten, z.B. der IolT1-Permease in der Zellmembran oder die zytosolisch vorliegenden Proteine ReiD, IolE bzw. IolG1 können infolge der Zellteilung als epigenetische Ursache den geringen Grad des Gedächtnisses erklären. Der für die Derepression der *iol*-Gene benötigte DKGP-Spiegel ist abhängig von der Anzahl und Aktivität der Transportmoleküle und der extrazellulären MI-Konzentration. Die Hysterese in *Salmonella* ermöglicht ihnen eine schnelle Reaktionsfähigkeit unter sich schnell verändernden Umweltbedingungen, um einem Energieverlust zu verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass eine ungünstige *iol*-Genexpression unter nährstoffreichen Bedingungen die Wachstumsgeschwindigkeit von *Salmonella* bis zu 27,0 % reduziert. Der Einsatz von regulatorischen Mechanismen befähigen Bakterien dazu, den Ausgleich zwischen Fitnesskosten durch Genexpression und enzymatische Aktivität zu schaffen (Perfeito *et al.*, 2011).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die Anwendung einer *bet-hedging* Strategie für die *iol*-Genexpression während des Wachstums der Salmonellen in Abwesenheit des induzierenden Stimulus ausgeschlossen. Dennoch wäre diese Strategie vorteilhaft für *Salmonella* während einer Infektion, da sie die Besetzung verschiedenster metabolischer Nischen durch mindestens einen adaptiven Phänotyp ermöglicht, auch wenn diese mit einem Fitnessnachteil verbunden ist. Die zahlreichen Beispiele im bakteriellen Reich zeigen, dass die Mikroorganismen diese physiologische Last in Kauf nehmen, um sich auf eine ungewisse Zukunft vorzubereiten. Dieser Kompromiss ist als adaptive Evolution der Bakterien zu betrachten, die während des diauxischen Wachstums in *E. coli* eine hohe durchschnittliche Teilungsrate mit geringer Varianz hervorbringt (Solopova *et al.*, 2014). Dem zellulären Metabolismus wohnt prinzipiell eine Stochastizität inne, die als Quelle der phänotypischen Heterogenität auch in *Salmonella* zum *bet-hedging* führen kann (Kiviet *et al.*, 2014).

5. Ausblick

Es existieren viele methodische Verfahrensweisen, die zur Aufklärung des molekularen Ursprungs der phänotypischen Heterogenität bei Bakterien herangezogen werden. Diesen liegen Untersuchungen auf Einzelzellebene zugrunde, die zu einem hohen Maß von der technischen Entwicklung abhängen. Das Forschungsfeld wird dabei dominiert von mathematischen Modellierungen (Kiviet *et al.*, 2014), Einsatz von mikrofluidischen Systeme mit *cell-tracking* Software (Binder *et al.*, 2016; Klein *et al.*, 2012) oder der SPR-Spektroskopie (Behr *et al.*, 2016). Idealerweise sollte die Einzelmolekül-Technologie ihre Anwendung finden, indem die Produktion, der Abbau und der funktionelle Zustand der Biomoleküle in Echtzeit in lebenden Zellen analysiert werden kann (Raj & van Oudenaarden, 2009; Larson *et al.*, 2009).

Die SPR-Spektroskopie bietet viele Einsatzmöglichkeiten, die eine weitere und detaillierte Aufklärung der *iol*-Genregulation ermöglichen. Beispielsweise könnte die Fragestellung geklärt werden, ob das Intermediat DKGP die Affinität des Repressors beeinflusst. Für diesen Ansatz muss DKGP nach Yoshida *et al.* aus *Salmonella* isoliert werden (Yoshida *et al.*, 2008). Mit Hilfe der Vektoren pET28b-*iolC* bzw. pBAD-Myc/HisC-*iolC* würde die IolC-Kinase isoliert, mit 250 mg kommerziell erwerblichem Kaliumgluconat inkubiert und durch die Kinaseaktivität zu DKGP umgesetzt werden. Mittels Gelmobilitätsstudien könnte vor der SPR-Spektroskopie getestet werden, ob die gewonnene DKGP-Menge die Funktion von IolR inhibiert. Vor der Durchführung der SPR-Spektroskopie muss der Repressor über seinen Polyhistidin-Anhang mit Hilfe eines His Capture Kit (GE Healthcare, Freiburg, DE) auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert werden. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht die Analyse der Interaktion zwischen dem immobilisierten IolR-Protein und des Intermediates DKGP, dass in die mobile Phase zugegeben wird. In einem weiteren Ansatz kann durch eine Injektion des Repressors und der RNA-Polymerase festgestellt werden, ob sich die Bindestellen in den *iol*-Promotorbereichen überlappen und inwiefern die Affinität der RNA-Polymerase die Transkriptionseffizienz diktiert. Zunächst wird die RNA-Polymerase in die mobile Phase gegeben, und sollte überlappenden DNS-Zielstrukturen vorliegen, ist eine nachfolgende Bindung von IolR nicht mehr möglich. Überlappen sich die Bindestellen der beiden Proteine nicht, wäre nach Injektion des Repressors der typische Verlauf eines Sensogrammes zu erkennen. Eine detailliertere Aufklärung der Bindungskinetik und Lokalisation der Bindestelle des anderen Regulators der GEI4417/4436 könnte zur

Klärung des molekularen Ursprungs der Bistabilität beitragen. In dieser Arbeit gelang es zwar ReiD in ausreichender Menge unter denaturierenden Bedingungen zu isolieren, aber eine Rückfaltung des Proteins in seine funktionale Konformation konnte nicht erzielt werden. Um die Bedingungen der Rückfaltung zu optimieren, sollte das isolierte Protein in einem größeren Volumen von 2 Litern Rückfaltungspuffer, mit einmaligen Wechsel innerhalb der 36-stündigen Inkubation, bei 4 °C dialysiert werden. Für die SPR-Spektroskopie ist bereits ein geringer aktiver Proteinanteil für die Aufnahme der Bindungskinetik ausreichend. Durch die Daten der SPR-Spektroskopie kann geklärt werden, wie der Aktivator mit seinen Zielstrukturen interagiert und so im Vergleich mit dem Repressor die Stärke der beiden Rückkopplungsmechanismen verglichen werden. Diese müssten jedoch nahezu gleich sein, da nur dann das Auftreten einer Bistabilität möglich ist. In dieser Arbeit wurde versucht die IolR-Bindestelle mittels DNS-Protektionsexperiment und anschließender Subklonierung zu identifizieren, wobei eine weitere Methodenetablierung zur Überprüfung der Anwesenheit und Anreicherung der unverdauten Nukleotidsequenz erforderlich ist. Eine genaue Identifizierung der Nukleotidsequenz der Bindestellen der Regulatoren könnte nach Heinrich *et al.* mittels Gelmobilitätsstudien erfolgen (Heinrich *et al.*, 2016).

In einem anderen Ansatzpunkt könnte der Ursprung der phänotypischen Heterogenität durch eine nähere Betrachtung der Transportproteine für MI aufgedeckt werden. Der Haupttransporter IolT1 befördert MI in das Zytosol der Zelle, wo es infolge des initialen Abbau zu DKGP umgewandelt und die positive Rückkopplung einleitet werden kann. Durch die geringe Auflösungsgrenze der Durchflusszytometrie ist dieses Messverfahren ungeeignet für eine genauere Betrachtung der Transportproteine während der An- und Abwesenheit des induzierenden Stimulus, aber mittels anderer hochauflösender aber kostenintensivere Verfahren, wie z.B. PALM-(*photoactivated localization microscopy*) Aufnahmen könnte die Verteilung des IolT1-Transporter während der Inkubation in nährstoffreichen Bedingungen untersucht werden (Manck & Fischer, 2012). Dessen Abundanz und Stabilität in der bakteriellen Zellmembran könnte den instabilen Hysterese-Effekt bzw. den epigenetischen Ursprung dieses Phänomen während der Zellteilung erklären. Durch die Ermittlung der extra- und intrazelluläre MI-Konzentration während des Wachstums von *Salmonella* mit MI könnte der Wechsel in einen induzierten Zustand für die *iol*-Genexpression näher beschrieben und ein Grenzwert für den Zustandswechsel identifiziert werden. Die Bestimmung der Konzentration des Polyols in

einer *Salmonella*-Kultur kann in Abhängigkeit des Wachstums der *ino1*-defizienten *Sachharomyces cerevisiae* erfolgen. Diese Mutante weist keine Inositolphosphat-Synthase auf, wodurch eine *de novo* Synthese von *myo*-Inositol nicht erfolgen kann und sie eine Auxotrophie gegenüber diesem Substrat aufweist (Henry *et al.*, 2014). Die erreichte optische Dichte der Hefe-Kultur wird als Maß für die intrazellulären MI-Konzentration aus einem Zelllysat der bakteriellen Kultur oder für die extrazelluläre Konzentration des Polyols aus dem Kulturüberstand herangezogen. Zu den verschiedenen Wachstumsphasen der Salmonellen mit MI würde die Konzentration des Substrates ermittelt und der Zustandswechsel in Abhängigkeit der extra- und intrazellulären MI-Konzentration charakterisiert werden.

Durch den Einsatz von *time-lapse* Experimenten in Kombination mit *cell-tracking* Software könnte das Einzelzellschicksal von Zellen im induzierten Zustand für die *iol*-Genexpression über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Durch die Berechnung der Teilungsrate mit simultaner Fluoreszenzabnahme in Echtzeit könnte der Hysterese-Effekt noch genauer charakterisiert werden. Der einfachste experimentelle Aufbau einer *time-lapse* Analyse könnte nach Jong *et al.* erfolgen, indem eine *Salmonella*-Kultur zu einer OD₆₀₀ von 0,01 - 0,03 verdünnt und auf einem Agar-Pad aufgetragen wird (Jong *et al.*, 2011). Nach der Anfertigung des mikroskopischen Präparates erfolgt die automatisierte Aufnahme von mindestens 10 markierten Positionen bzw. Bakterien an einem Fluoreszenzmikroskop. Für den Einsatz von mikrofluidischen Systemen müsste ein *Flagella*-defizienter Bakterienstamm von *S. Typhimurium* 14028 verwendet werden, damit die Salmonellen in den Kavitäten der Vorrichtung bleiben. Die Deletion des *invA*-Gens führt in *Salmonella* zu einem nicht-invasiven Phänotyp in Zellkulturanalysen und würde sich für den Einsatz in mikrofluidischen Systemen eignen (Galán *et al.*, 1992). Während der Versuchsdurchführung mit mikrofluidischen Systemen könnte durch einen ständigen Mediumwechsel zwischen MM mit MI und Glukose das Schicksal der Zellen im uninduzierten Zustand bei sich verändernden Umgebungsbedingungen verfolgt werden. Durch diesen Versuchsansatz könnte geklärt werden, ob die Zellen mit induzierter *iol*-Genexpression die Zellen, die sich in einem uninduzierten Zustand der *iol*-Gene befinden, überwachsen oder ob letztere in einen induzierten Zustand aktiv wechseln.

Durch das Zusammentragen der Ergebnisse aus den zuvor erwähnten Versuchsbeschreibungen, wie z.B. die genaue Lokalisation der Bindestellen der Regulatoren innerhalb der GEI4417/4436, sowie dessen Affinitäten zu ihrer DNS-Zielstruktur, könnte in einer mathematischen Modellierung der molekulare Mechanismus der Bistabilität in seiner Komplexität dargestellt und die einflussnehmenden Faktoren identifiziert werden. Die Aufstellung eines mathematischen Modells ermöglicht aus einer Vielzahl von Möglichkeiten diejenige auszuwählen, die am ehesten zur phänotypischen Heterogenität führen kann. Bei diesem Modell handelt es sich um eine Vereinfachung, da nie der reale Vorgang mit all seiner Komplexität erfasst werden könnte. Durch ein qualitatives Modell könnte beispielsweise aufgeklärt werden, ob der molekulare Bindemechanismus des IolR-Repressors zur Bistabilität führen kann. In einem quantitativen Modell können Voraussagen der Werte von gewissen Variablen gemacht werden. Durch die Aufklärung der Bindungskinetik der Regulatoren der GEI4417/4436 und dessen Regulationsmechanismus, sowie die Identifizierung der DKGP-Konzentration, die für den Zustandswechsel erforderlich ist, können gewisse Variablen definiert werden. Es gilt zu klären, welche Faktoren die zelluläre Entscheidung eines Wechsels in den induzierten Zustand der *iol*-Genexpression in *Salmonella* beeinflusst und welche zellulären Komponenten für die Bistabilität verantwortlich sind.

6. Literaturverzeichnis

- ABEL, K., ANDERSON, R. A. & SHEARS, S. B. (2001). Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism. *Journal of cell science* **114**, 2207–2208.
- ABUAITA, B. H. & WITHEY, J. H. (2009). Bicarbonate Induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity. *Infection and immunity* **77**, 4111–4120.
- ACAR, M., METTETAL, J. T. & VAN OUDENAARDEN, A. (2008). Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nature genetics* **40**, 471–475.
- ACKERMANN, M. (2015). A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nature reviews. Microbiology* **13**, 497–508.
- ACKERMANN, M., STECHER, B., FREED, N. E., SONGHET, P., HARDT, W.-D. & DOEBELI, M. (2008). Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* **454**, 987–990.
- ANDERSON, W. A. & MAGASANIK, B. (1971). The pathway of *myo*-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Conversion of 2-deoxy-5-keto-D-gluconic acid to glycolytic intermediates. *The Journal of biological chemistry* **246**, 5662–5675.
- ANDERSSON, D. I. & LEVIN, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology* **2**, 489–493.
- BALABAN, N. Q., MERRIN, J., CHAIT, R., KOWALIK, L. & LEIBLER, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 1622–1625.
- BALÁZSI, G., VAN OUDENAARDEN, A. & COLLINS, J. J. (2011). Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals. *Cell* **144**, 910–925.
- BAQUERO, M. R., BOUZON, M., QUINTELA, J. C., AYALA, J. A. & MORENO, F. (1996). *dacD*, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *Journal of bacteriology* **178**, 7106–7111.
- BATEMAN, A. (1999). The SIS domain: a phosphosugar-binding domain. *Trends in biochemical sciences* **24**, 94–95.
- BECSKEI, A., SERAPHIN, B. & SERRANO, L. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *The EMBO journal* **20**, 2528–2535.
- BECSKEI, A. & SERRANO, L. (2000). Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* **405**, 590–593.
- BEHR, S., HEERMANN, R. & JUNG, K. (2016). Insights into the DNA-binding mechanism of a LytTR-type transcription regulator. *Bioscience reports* **36**.
- BENNETT, M. R. & HASTY, J. (2007). A DNA methylation-based switch generates bistable gene expression. *Nature genetics* **39**, 146–147.
- BERGMILLER, T. & ACKERMANN, M. (2011). Pole age affects cell size and the timing of cell division in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of bacteriology* **193**, 5216–5221.

- BERMAN, T. & MAGASANIK, B. (1966). The pathway of *myo*-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Dehydrogenation and dehydration. *The Journal of biological chemistry* **241**, 800–806.
- BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **62**, 293–300.
- BETSCHIEDER, D. & JOSE, J. (2009). Nile blue A for staining *Escherichia coli* in flow cytometer experiments. *Analytical biochemistry* **384**, 194–196.
- BfR. Melonen: Gesundheitsgefahr durch Verunreinigung mit pathogenen Bakterien: Stellungnahme 021/2013 des BfR vom 9. August 2013.
- BIGGER, J. W. (1944). Treatment of Staphylococcal infections with penicillin: by intermittent sterilisation. *The Lancet* **244**, 497–500.
- BINDER, D., PROBST, C., GRÜNBERGER, A., HILGERS, F., LOESCHCKE, A., JAEGER, K.-E., KOHLHEYER, D. & DREPPER, T. (2016). Comparative Single-Cell Analysis of Different *E. coli* Expression Systems during Microfluidic Cultivation. *PloS one* **11**, e0160711.
- BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R. L., BETLACH, M. C. & BOYER, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene* **2**, 75–93.
- BONGAERTS, R. J. M., HAUTEFORT, I., SIDEBOTHAM, J. M. & HINTON, J. C. D. (2002). Green fluorescent protein as a marker for conditional gene expression in bacterial cells. *Methods in enzymology* **358**, 43–66.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J., TAUXE, R. & SWAMINATHAN, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology* **38**, 2465–2467.
- BUCHWALD, D. S. & BLASER, M. J. (1984). A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Reviews of infectious diseases* **6**, 345–356.
- CARNELL, S. C., BOWEN, A., MORGAN, E., MASKELL, D. J., WALLIS, T. S. & STEVENS, M. P. (2007). Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 1940–1952.
- CASADESÚS, J. & D'ARI, R. (2002). Memory in bacteria and phage. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**, 512–518.
- CASADESÚS, J. & LOW, D. A. (2013). Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *The Journal of biological chemistry* **288**, 13929–13935.
- CHAO, Y., PAPPENFORTH, K., REINHARDT, R., SHARMA, C. M. & VOGEL, J. (2012). An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *The EMBO journal* **31**, 4005–4019.
- CHASTANET, A., VITKUP, D., YUAN, G.-C., NORMAN, T. M., LIU, J. S. & LOSICK, R. M. (2010). Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8486–8491.

- CHAUDHURI, R. R., MORGAN, E., PETERS, S. E., PLEASANCE, S. J., HUDSON, D. L., DAVIES, H. M., WANG, J., VAN DIEMEN, P. M., BUCKLEY, A. M., BOWEN, A. J., PULLINGER, G. D., TURNER, D. J., LANGRIDGE, G. C., TURNER, A. K., PARKHILL, J., CHARLES, I. G., MASKELL, D. J. & STEVENS, M. P. (2013). Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS genetics* **9**, e1003456.
- CHAUDHURI, R. R., PETERS, S. E., PLEASANCE, S. J., NORTHEN, H., WILLERS, C., PATERSON, G. K., CONE, D. B., ALLEN, A. G., OWEN, P. J., SHALOM, G., STEKEL, D. J., CHARLES, I. G. & MASKELL, D. J. (2009). Comprehensive identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes required for infection of BALB/c mice. *PLoS pathogens* **5**, e1000529.
- CIRILLO, D. M., VALDIVIA, R. H., MONACK, D. M. & FALKOW, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular microbiology* **30**, 175–188.
- CLARK, M. A., JEPSON, M. A., SIMMONS, N. L. & HIRST, B. H. (1994). Preferential interaction of *Salmonella* Typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. *Research in microbiology* **145**, 543–552.
- COHN, M. & HORIBATA, K. (1959b). Analysis of the differentiation and of the heterogeneity within a population of *Escherichia coli* undergoing induced beta-galactosidase synthesis. *Journal of bacteriology* **78**, 613–623.
- COHN, M. & HORIBATA, K. (1959a). Inhibition by glucose of the induced synthesis of the beta-galactoside-enzyme system of *Escherichia coli*. Analysis of maintenance. *Journal of bacteriology* **78**, 601–612.
- CORDERO-ALBA, M., BERNAL-BAYARD, J. & RAMOS-MORALES, F. (2012). SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *Journal of bacteriology* **194**, 4226–4236.
- COSSART, P. & SANSONETTI, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 242–248.
- DADDAOUA, A., KRELL, T. & RAMOS, J.-L. (2009). Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21360–21368.
- DANDEKAR, T., FIESELMANN, A., FISCHER, E., POPP, J., HENSEL, M. & NOSTER, J. (2015). *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **4**, 191.
- DATSENKO, K. A. & WANNER, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6640–6645.
- DIARD, M., GARCIA, V., MAIER, L., REMUS-EMSERMANN, M. N. P., REGOES, R. R., ACKERMANN, M. & HARDT, W.-D. (2013). Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature* **494**, 353–356.
- DUBNAU, D. & LOSICK, R. (2006). Bistability in bacteria. *Molecular microbiology* **61**, 564–572.
- EAMES, M. & KORTEMME, T. (2012). Cost-benefit tradeoffs in engineered *lac* operons. *Science (New York, N.Y.)* **336**, 911–915.

- EISENREICH, W., DANDEKAR, T., HEESEMANN, J. & GOEBEL, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 401–412.
- ELOWITZ, M. B. & LEIBLER, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* **403**, 335–338.
- ELOWITZ, M. B., LEVINE, A. J., SIGGIA, E. D. & SWAIN, P. S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. *Science (New York, N.Y.)* **297**, 1183–1186.
- ENNE, V. I., DELSOL, A. A., ROE, J. M. & BENNETT, P. M. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53**, 203–207.
- FABER, F., THIENNIMITR, P., SPIGA, L., BYNDLOSS, M. X., LITVAK, Y., LAWHON, S., ANDREWS-POLYMENIS, H. L., WINTER, S. E. & BAUMLER, A. J. (2017). Respiration of Microbiota-Derived 1,2-propanediol Drives *Salmonella* Expansion during Colitis. *PLoS pathogens* **13**, e1006129.
- FÀBREGA, A. & VILA, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews* **26**, 308–341.
- FARMER, J. J., DAVIS, B. R., HICKMAN-BRENNER, F. W., MCWHORTER, A., HUNTLEY-CARTER, G. P., ASBURY, M. A., RIDDLE, C., WATHEN-GRADY, H. G., ELIAS, C. & FANNING, G. R. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* **21**, 46–76.
- FERRELL, J. E. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: Positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 140–148.
- FLANNAGAN, R. S., COSIO, G. & GRINSTEIN, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 355–366.
- FOSTER, J. W. & SPECTOR, M. P. (1995). How *Salmonella* survive against the odds. *Annual review of microbiology* **49**, 145–174.
- FRASER, H. B., HIRSH, A. E., GIAEVER, G., KUMM, J. & EISEN, M. B. (2004). Noise minimization in eukaryotic gene expression. *PLoS biology* **2**, e137.
- FUCHS, T. M., EISENREICH, W., HEESEMANN, J. & GOEBEL, W. (2012). Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS microbiology reviews* **36**, 435–462.
- GAGNEUX, S., LONG, C. D., SMALL, P. M., VAN, T., SCHOOLNIK, G. K. & BOHANNAN, B. J. M. (2006). The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 1944–1946.
- GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C. & COSTEAS, P. (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of InvA to members of a new protein family. *Journal of bacteriology* **174**, 4338–4349.
- GARAI, P., GNANADHAS, D. P. & CHAKRAVORTTY, D. (2012). *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**, 377–388.

- GARDNER, T. S., CANTOR, C. R. & COLLINS, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* **403**, 339–342.
- GEILER-SAMEROTTE, K. A., DION, M. F., BUDNIK, B. A., WANG, S. M., HARTL, D. L. & DRUMMOND, D. A. (2011). Misfolded proteins impose a dosage-dependent fitness cost and trigger a cytosolic unfolded protein response in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 680–685.
- GERLACH, R. G., CLAUDIO, N., ROHDE, M., JACKEL, D., WAGNER, C. & HENSEL, M. (2008). Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cellular microbiology* **10**, 2364–2376.
- GERLACH, R. G., JACKEL, D., GEYMEIER, N. & HENSEL, M. (2007). *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infection and immunity* **75**, 4697–4709.
- GONZÁLEZ-PASTOR, J. E., HOBBS, E. C. & LOSICK, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 510–513.
- GOPINATH, S. C. B. & KUMAR, P. K. R. (2014). Biomolecular discrimination analyses by surface plasmon resonance. *The Analyst* **139**, 2678–2682.
- GÖTZ, A. & GOEBEL, W. (2010). Glucose and glucose 6-phosphate as carbon sources in extra- and intracellular growth of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Microbiology (Reading, England)* **156**, 1176–1187.
- GRAUMANN, P. L. (2006). Different genetic programmes within identical bacteria under identical conditions: the phenomenon of bistability greatly modifies our view on bacterial populations. *Molecular microbiology* **61**, 560–563.
- GRIMONT, P. A. D. & WEILL, F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* Serovars: 2007, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur.
- GROISMAN, E. A. & OCHMAN, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology* **5**, 343–349.
- GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS, P. I., BOCKEMUHL, J., GRIMONT, P. A. D. & WEILL, F.-X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in microbiology* **161**, 26–29.
- GUTNICK, D., CALVO, J. M., KLOPOTOWSKI, T. & AMES, B. N. (1969). Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella* Typhimurium LT-2. *Journal of bacteriology* **100**, 215–219.
- HANNING, I. B., NUTT, J. D. & RICKE, S. C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne pathogens and disease* **6**, 635–648.
- HARAGA, A., OHLSON, M. B. & MILLER, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 53–66.
- HAROS, M., CARLSSON, N.-G., ALMGREN, A., LARSSON-ALMINGER, M., SANDBERG, A.-S. & ANDLID, T. (2009). Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *International journal of food microbiology* **135**, 7–14.

- HARVEY, P. C., WATSON, M., HULME, S., JONES, M. A., LOVELL, M., BERCHIERI, A., JR, YOUNG, J., BUMSTEAD, N. & BARROW, P. (2011). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. *Infection and immunity* **79**, 4105–4121.
- HAZAFY, D., SALVIA, M.-V., MILLS, A., HUTCHINGS, M. G., EVSTIGNEEV, M. P. & PARKINSON, J. A. (2011). NMR analysis of Nile Blue (C. I. Basic Blue 12) and Thionine (C. I. 52000) in solution. *Dyes and Pigments* **88**, 315–325.
- HEINRICH, A. K., GLAESER, A., TOBIAS, N. J., HEERMANN, R. & BODE, H. B. (2016). Heterogeneous regulation of bacterial natural product biosynthesis via a novel transcription factor. *Heliyon* **2**, e00197.
- HELAINÉ, S., CHEVERTON, A. M., WATSON, K. G., FAURE, L. M., MATTHEWS, S. A. & HOLDEN, D. W. (2014). Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science (New York, N.Y.)* **343**, 204–208.
- HELLINCKX, J. & FUCHS, T. M. (2016). Hysteresis in *myo*-inositol utilization by *Salmonella* Typhimurium. *MicrobiologyOpen*.
- HELLINCKX, J., HEERMANN, R., FELSL, A. & FUCHS, T. M. (2017). High binding affinity of repressor IolR avoids costs of untimely induction of *myo*-inositol utilization by *Salmonella* Typhimurium. *Scientific reports* **7**, 44362.
- HENRY, S. A., GASPAR, M. L. & JESCH, S. A. (2014). The response to inositol: regulation of glycerolipid metabolism and stress response signaling in yeast. *Chemistry and physics of lipids* **180**, 23–43.
- HENSEL, M. (2000). *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular microbiology* **36**, 1015–1023.
- HENSEL, M., HINSLEY, A. P., NIKOLAUS, T., SAWERS, G. & BERKS, B. C. (1999). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular microbiology* **32**, 275–287.
- HENTCHEL, K. L., THAO, S., INTILE, P. J. & ESCALANTE-SEMERENA, J. C. (2015). Deciphering the Regulatory Circuitry That Controls Reversible Lysine Acetylation in *Salmonella enterica*. *mBio* **6**, e00891.
- HOBMAN, J. L., PATEL, M. D., HIDALGO-ARROYO, G. A., CARISS, S. J. L., AVISON, M. B., PENN, C. W. & CONSTANTINIDOU, C. (2007). Comparative genomic hybridization detects secondary chromosomal deletions in *Escherichia coli* K-12 MG1655 mutants and highlights instability in the *flhDC* region. *Journal of bacteriology* **189**, 8786–8792.
- HOLDEN, D. W. (2002). Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **3**, 161–169.
- HOLTKÖTTER, P. & HENSEL, M. (2016). Metabolism of Intracellular *Salmonella enterica*. In *Host - pathogen interaction: Microbial metabolism, pathogenicity and anti-infectives*, v. 6. *Drug discovery in infectious diseases* (ed. A. SCHÜFFLER, E. THINES & G. UNDEN), pp. 37–55. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim.

- HUANG, J. Y., HENAO, O. L., GRIFFIN, P. M., VUGIA, D. J., CRONQUIST, A. B., HURD, S., TOBIN-D'ANGELO, M., RYAN, P., SMITH, K., LATHROP, S., ZANSKY, S., CIESLAK, P. R., DUNN, J., HOLT, K. G., WOLPERT, B. J. & PATRICK, M. E. (2016). Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2012-2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* **65**, 368–371.
- HURLEY, B. P. & MCCORMICK, B. A. (2003). Translating tissue culture results into animal models: The case of *Salmonella typhimurium*. *Trends in Microbiology* **11**, 562–569.
- HURLEY, D., MCCUSKER, M. P., FANNING, S. & MARTINS, M. (2014). *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Frontiers in immunology* **5**, 481.
- JARVIK, T., SMILLIE, C., GROISMAN, E. A. & OCHMAN, H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of bacteriology* **192**, 560–567.
- JONG, H. K. de, PARRY, C. M., VAN DER POLL, T. & WIERSINGA, W. J. (2012). Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS pathogens* **8**, e1002933.
- JONG, I. G. de, BEILHARZ, K., KUIPERS, O. P. & VEENING, J.-W. (2011). Live Cell Imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using Automated Time-lapse Microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- JOSHI-SAHA, A. & REDDY, K. S. (2015). Repeat length variation in the 5'UTR of *myo*-inositol monophosphatase gene is related to phytic acid content and contributes to drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Journal of experimental botany* **66**, 5683–5690.
- KAMADA, N., CHEN, G. Y., INOHARA, N. & NUNEZ, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology* **14**, 685–690.
- KATAYAMA, M., SATO, T. & KUROMITSU, J. (2012). Capture molecules preconditioned for kinetic analysis of high-affinity antigen-antibody complex in Biacore A100. *Analytical biochemistry* **424**, 168–177.
- KAWSAR, H. I., OHTANI, K., OKUMURA, K., HAYASHI, H. & SHIMIZU, T. (2004). Organization and transcriptional regulation of *myo*-inositol operon in *Clostridium perfringens*. *FEMS microbiology letters* **235**, 289–295.
- KEREN, I., SHAH, D., SPOERING, A., KALDALU, N. & LEWIS, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **186**, 8172–8180.
- KIVIET, D. J., NGHE, P., WALKER, N., BOULINEAU, S., SUNDERLIKOVA, V. & TANS, S. J. (2014). Stochasticity of metabolism and growth at the single-cell level. *Nature* **514**, 376–379.
- KLAFFL, S., BROCKER, M., KALINOWSKI, J., EIKMANN, B. J. & BOTT, M. (2013). Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator IolR as a repressor of *myo*-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of bacteriology* **195**, 4283–4296.

- KLEIN, J., LEUPOLD, S., BIEGLER, I., BIEDENDIECK, R., MÜNCH, R. & JAHN, D. (2012). TLM-Tracker: software for cell segmentation, tracking and lineage analysis in time-lapse microscopy movies. *Bioinformatics (Oxford, England)* **28**, 2276–2277.
- KLUMPP, J. & FUCHS, T. M. (2007). Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella* Typhimurium replication in macrophages. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 1207–1220.
- KOHLER, P. R. A., CHOONG, E.-L. & ROSSBACH, S. (2011). The RpiR-like repressor IolR regulates inositol catabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* **193**, 5155–5163.
- KOLB, A., BUSBY, S., BUC, H., GARGES, S. & ADHYA, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annual review of biochemistry* **62**, 749–795.
- KRÖGER, C., COLGAN, A., SRIKUMAR, S., HANDLER, K., SIVASANKARAN, S. K., HAMMARLOF, D. L., CANALS, R., GRISSOM, J. E., CONWAY, T., HOKAMP, K. & HINTON, J. C. D. (2013). An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell host & microbe* **14**, 683–695.
- KRÖGER, C., DILLON, S. C., CAMERON, A. D. S., PAPENFORT, K., SIVASANKARAN, S. K., HOKAMP, K., CHAO, Y., SITTKA, A., HEBRARD, M., HANDLER, K., COLGAN, A., LEEKITCHAROENPHON, P., LANGRIDGE, G. C., LOHAN, A. J., LOFTUS, B., LUCCHINI, S., USSERY, D. W., DORMAN, C. J., THOMASON, N. R., VOGEL, J. & HINTON, J. C. D. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E1277-86.
- KRÖGER, C. & FUCHS, T. M. (2009). Characterization of the *myo*-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **191**, 545–554.
- KRÖGER, C., SRIKUMAR, S., ELLWART, J. & FUCHS, T. M. (2011). Bistability in *myo*-inositol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **193**, 1427–1435.
- KRÖGER, C., STOLZ, J. & FUCHS, T. M. (2010). *myo*-Inositol transport by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology (Reading, England)* **156**, 128–138.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- LAMBERT, G. & KUSSELL, E. (2014). Memory and fitness optimization of bacteria under fluctuating environments. *PLoS genetics* **10**, e1004556.
- LARSON, D. R., SINGER, R. H. & ZENKLUSEN, D. (2009). A single molecule view of gene expression. *Trends in cell biology* **19**, 630–637.
- LAWLEY, T. D., CHAN, K., THOMPSON, L. J., KIM, C. C., GOVONI, G. R. & MONACK, D. M. (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS pathogens* **2**, e11.
- LEHNER, B. (2008). Selection to minimise noise in living systems and its implications for the evolution of gene expression. *Molecular systems biology* **4**, 170.
- LEWIS, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 48–56.

- LEYN, S. A., LI, X., ZHENG, Q., NOVICHKOV, P. S., REED, S., ROMINE, M. F., FREDRICKSON, J. K., YANG, C., OSTERMAN, A. L. & RODIONOV, D. A. (2011). Control of proteobacterial central carbon metabolism by the HexR transcriptional regulator: a case study in *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry* **286**, 35782–35794.
- LINDENSTRAUß, A. G. (2012). Distribution of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and its adaption to conditions in the intestinal tract: Dissertation, Technische Universität München, Deutschland.
- LOOMIS, W. F., JR & MAGASANIK, B. (1967). Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **93**, 1397–1401.
- LOW, D. A., WEYAND, N. J. & MAHAN, M. J. (2001). Roles of DNA adenine methylation in regulating bacterial gene expression and virulence. *Infection and immunity* **69**, 7197–7204.
- LUCCHINI, S., ROWLEY, G., GOLDBERG, M. D., HURD, D., HARRISON, M. & HINTON, J. C. D. (2006). H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS pathogens* **2**, e81.
- MALOY, S. R. (1990). *Experimental techniques in bacterial genetics*. Jones and Bartlett, Boston, Mass.
- MANCK, R. & FISCHER, R. (2012). Mikroskopie jenseits der Auflösungs Grenze. *Biologie in unserer Zeit* **42**, 244–253.
- MANSKE, C., SCHELL, U. & HILBI, H. (2016). Metabolism of *myo*-Inositol by *Legionella pneumophila* Promotes Infection of Amoebae and Macrophages. *Applied and environmental microbiology* **82**, 5000–5014.
- MARATHE, R., BIERBAUM, V., GOMEZ, D. & KLUMPP, S. (2012). Deterministic and Stochastic Descriptions of Gene Expression Dynamics. *Journal of Statistical Physics* **148**, 608–627.
- MARBACH, A. & BETTENBROCK, K. (2012). *lac* operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology* **157**, 82–88.
- MARCUS, S. L., BRUMELL, J. H., PFEIFER, C. G. & FINLAY, B. B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection* **2**, 145–156.
- MARTIN, F.-P. J., WANG, Y., YAP, I. K. S., SPRENGER, N., LINDON, J. C., REZZI, S., KOCHHAR, S., HOLMES, E. & NICHOLSON, J. K. (2009). Topographical variation in murine intestinal metabolic profiles in relation to microbiome speciation and functional ecological activity. *Journal of proteome research* **8**, 3464–3474.
- MATHIS, R. & ACKERMANN, M. (2016). Response of single bacterial cells to stress gives rise to complex history dependence at the population level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 4224–4229.
- MATHIS, R. & ACKERMANN, M. (2017). Asymmetric cellular memory in bacteria exposed to antibiotics. *BMC evolutionary biology* **17**, 73.
- MATSUMOTO, M., KIBE, R., OOGA, T., AIBA, Y., KURIHARA, S., SAWAKI, E., KOGA, Y. & BENNO, Y. (2012). Impact of intestinal microbiota on intestinal luminal metabolome. *Scientific reports* **2**, 233.

- MCCLELLAND, M., SANDERSON, K. E., SPIETH, J., CLIFTON, S. W., LATREILLE, P., COURTNEY, L., PORWOLLIK, S., ALI, J., DANTE, M., DU, F., HOU, S., LAYMAN, D., LEONARD, S., NGUYEN, C., SCOTT, K., HOLMES, A., GREWAL, N., MULVANEY, E., RYAN, E., SUN, H., FLOREA, L., MILLER, W., STONEKING, T., NHAN, M., WATERSTON, R. & WILSON, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852–856.
- MEDINA, E., PAGLIA, P., NIKOLAUS, T., MULLER, A., HENSEL, M. & GUZMAN, C. A. (1999). Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella* Typhimurium are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infection and immunity* **67**, 1093–1099.
- MIAO, E. A., FREEMAN, J. A. & MILLER, S. I. (2002). Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *Journal of bacteriology* **184**, 1493–1497.
- MILLER, J. S. & QUARLES, J. M. (1990). Flow cytometric identification of microorganisms by dual staining with FITC and PI. *Cytometry* **11**, 667–675.
- MIWA, Y. & FUJITA, Y. (2001). Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *Journal of bacteriology* **183**, 5877–5884.
- MONOD, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* **3**, 371–394.
- MOXON, E. R., RAINEY, P. B., NOWAK, M. A. & LENSKI, R. E. (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current biology : CB* **4**, 24–33.
- MURPHY, K. C. & CAMPPELLONE, K. G. (2003). Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *BMC molecular biology* **4**, 11.
- NAVARRE, W. W., PORWOLLIK, S., WANG, Y., MCCLELLAND, M., ROSEN, H., LIBBY, S. J. & FANG, F. C. (2006). Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 236–238.
- NEWMAN, J. R. S., GHAEMMAGHAMI, S., IHMELS, J., BRESLOW, D. K., NOBLE, M., DERISI, J. L. & WEISSMAN, J. S. (2006). Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* **441**, 840–846.
- NG, K. M., FERREYRA, J. A., HIGGINBOTTOM, S. K., LYNCH, J. B., KASHYAP, P. C., GOPINATH, S., NAIDU, N., CHOUDHURY, B., WEIMER, B. C., MONACK, D. M. & SONNEBURG, J. L. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature* **502**, 96–99.
- NIHASHI, J. & FUJITA, Y. (1984). Catabolite repression of inositol dehydrogenase and gluconate kinase syntheses in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et biophysica acta* **798**, 88–95.
- NIKOLIC, N., BARNER, T. & ACKERMANN, M. (2013). Analysis of fluorescent reporters indicates heterogeneity in glucose uptake and utilization in clonal bacterial populations. *BMC microbiology* **13**, 258.
- NOLLE, N., FELSL, A., HEERMANN, R. & FUCHS, T. M. (2017). Genetic Characterization of the Galactitol Utilization Pathway of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **199**.

- NORMAN, T. M., LORD, N. D., PAULSSON, J. & LOSICK, R. (2013). Memory and modularity in cell-fate decision making. *Nature* **503**, 481–486.
- NOVICK, A. & WEINER, M. (1957). ENZYME INDUCTION AS AN ALL-OR-NONE PHENOMENON. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **43**, 553–566.
- OHL, M. E. & MILLER, S. I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual review of medicine* **52**, 259–274.
- OLD, D. C. (1972). Temperature-dependent utilization of *meso*-inositol: a useful biotyping marker in the genealogy of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of bacteriology* **112**, 779–783.
- OZBUDAK, E. M., THATTAI, M., KURTSEY, I., GROSSMAN, A. D. & VAN OUDENAARDEN, A. (2002). Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nature genetics* **31**, 69–73.
- OZBUDAK, E. M., THATTAI, M., LIM, H. N., SHRAIMAN, B. I. & VAN OUDENAARDEN, A. (2004). Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature* **427**, 737–740.
- PEDRAZA, J. M. & VAN OUDENAARDEN, A. (2005). Noise propagation in gene networks. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1965–1969.
- PERFEITO, L., GHOZZI, S., BERG, J., SCHNETZ, K. & LASSIG, M. (2011). Nonlinear fitness landscape of a molecular pathway. *PLoS genetics* **7**, e1002160.
- PHILIPPI, T. & SEGER, J. (1989). Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends in ecology & evolution* **4**, 41–44.
- PIATKEVICH, K. D., HULIT, J., SUBACH, O. M., WU, B., ABDULLA, A., SEGALL, J. E. & VERKHUSHA, V. V. (2010a). Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5369–5374.
- PIATKEVICH, K. D., MALASHKEVICH, V. N., ALMO, S. C. & VERKHUSHA, V. V. (2010b). Engineering ESPT pathways based on structural analysis of LSSmKate red fluorescent proteins with large Stokes shift. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 10762–10770.
- PIATKEVICH, K. D. & VERKHUSHA, V. V. (2011). Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods in cell biology* **102**, 431–461.
- PIGGOT, P. (2010). Epigenetic switching: bacteria hedge bets about staying or moving. *Current biology : CB* **20**, R480-2.
- PIN, C., HANSEN, T., MUNOZ-CUEVAS, M., JONGE, R. de, ROSENKRANTZ, J. T., LOFSTROM, C., AARTS, H. & OLSEN, J. E. (2012). The transcriptional heat shock response of *Salmonella* Typhimurium shows hysteresis and heated cells show increased resistance to heat and acid stress. *PloS one* **7**, e51196.
- POTEETE, A. R., FENTON, A. C. & NADKARNI, A. (2004). Chromosomal duplications and cointegrates generated by the bacteriophage lambda Red system in *Escherichia coli* K-12. *BMC molecular biology* **5**, 22.

- PRICE-CARTER, M., TINGEY, J., BOBIK, T. A. & ROTH, J. R. (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *Journal of bacteriology* **183**, 2463–2475.
- PRUDHOMME, M., ATTAIECH, L., SANCHEZ, G., MARTIN, B. & CLAVERYS, J.-P. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science (New York, N.Y.)* **313**, 89–92.
- RAJ, A. & VAN OUDENAARDEN, A. (2009). Single-molecule approaches to stochastic gene expression. *Annual review of biophysics* **38**, 255–270.
- RASER, J. M. & O'SHEA, E. K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science (New York, N.Y.)* **304**, 1811–1814.
- RASER, J. M. & O'SHEA, E. K. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science (New York, N.Y.)* **309**, 2010–2013.
- REDDY, N. R. (2001). Occurrence, Distribution, Content, and Dietary Intake of Phytate. In *Food Phytates* (ed. N. R. REDDY & S. SATHE). CRC Press.
- REUVEN, P. & ELДАР, A. (2011). Macromotives and microbehaviors: the social dimension of bacterial phenotypic variability. *Current opinion in genetics & development* **21**, 759–767.
- ROBERT, L., PAUL, G., CHEN, Y., TADDEI, F., BAIGL, D. & LINDNER, A. B. (2010). Pre-dispositions and epigenetic inheritance in the *Escherichia coli* lactose operon bistable switch. *Molecular systems biology* **6**, 357.
- ROBERT KOCH-INSTITUT. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2015, Berlin, 2016.
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2006). Epidemiologisches Bulletin: Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health, 1–8.
- ROBERT KOCH-INSTITUT (2012). Epidemiologisches Bulletin: Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health, 1–12.
- RODERICK, S. L. (2005). The *lac* operon galactoside acetyltransferase. *Comptes rendus biologies* **328**, 568–575.
- RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* **17**, 319–339.
- ROHMER, L., HOCQUET, D. & MILLER, S. I. (2011). Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology* **19**, 341–348.
- ROJO, F. (1999). Repression of transcription initiation in bacteria. *Journal of bacteriology* **181**, 2987–2991.
- ROJO, F. (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Current opinion in microbiology* **4**, 145–151.
- ROLLENHAGEN, C. & BUMANN, D. (2006). *Salmonella enterica* highly expressed genes are disease specific. *Infection and immunity* **74**, 1649–1660.
- ROSENFELD, N., YOUNG, J. W., ALON, U., SWAIN, P. S. & ELOWITZ, M. B. (2005). Gene regulation at the single-cell level. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1962–1965.

- ROSENKRANTZ, J. T., AARTS, H., ABEE, T., ROLFE, M. D., KNUDSEN, G. M., NIELSEN, M.-B., THOMSEN, L. E., ZWIETERING, M. H., OLSEN, J. E. & PIN, C. (2013). Non-essential genes form the hubs of genome scale protein function and environmental gene expression networks in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC microbiology* **13**, 294.
- ROTEM, E., LOINGER, A., RONIN, I., LEVIN-REISMAN, I., GABAY, C., SHORESH, N., BIHAM, O. & BALABAN, N. Q. (2010). Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12541–12546.
- ROTHHARDT, J. E., KROGER, C., BROADLEY, S. P. & FUCHS, T. M. (2014). The orphan regulator ReiD of *Salmonella enterica* is essential for myo-inositol utilization. *Molecular microbiology* **94**, 700–712.
- RUIZ-ALBERT, J., YU, X.-J., BEUZÓN, C. R., BLAKEY, A. N., GALYOV, E. E. & HOLDEN, D. W. (2002). Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Molecular microbiology* **44**, 645–661.
- SALMON, D. E. (1884). THE DISCOVERY OF THE GERM OF SWINE-PLAGUE. *Science (New York, N.Y.)* **3**, 155–158.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BAUMLER, A. J. & ADAMS, L. G. (2003). Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas **36**, 3–12.
- SANTOS, R. L., ZHANG, S., TSOLIS, R. M., KINGSLEY, R. A., ADAMS, L. G. & BAUMLER, A. J. (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and infection* **3**, 1335–1344.
- SILANDER, O. K., NIKOLIC, N., ZASLAVER, A., BREN, A., KIKOIN, I., ALON, U. & ACKERMANN, M. (2012). A genome-wide analysis of promoter-mediated phenotypic noise in *Escherichia coli*. *PLoS genetics* **8**, e1002443.
- SIMON, R., PRIEFER, U. & PÜHLER, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784–791.
- SITTKA, A., PFEIFFER, V., TEDIN, K. & VOGEL, J. (2007). The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Molecular microbiology* **63**, 193–217.
- SLAGER, J., KJOS, M., ATTAIECH, L. & VEENING, J.-W. (2014). Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell* **157**, 395–406.
- SMITS, W. K., VEENING, J.-W. & KUIPERS, O. P. (2008). Phenotypic Variation and Bistable Switching in Bacteria. In *Bacterial Physiology: A Molecular Approach* (ed. W. EL-SHAROUD), pp. 339–365. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- SMITS, W. K., KUIPERS, O. P. & VEENING, J.-W. (2006). Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nature reviews. Microbiology* **4**, 259–271.

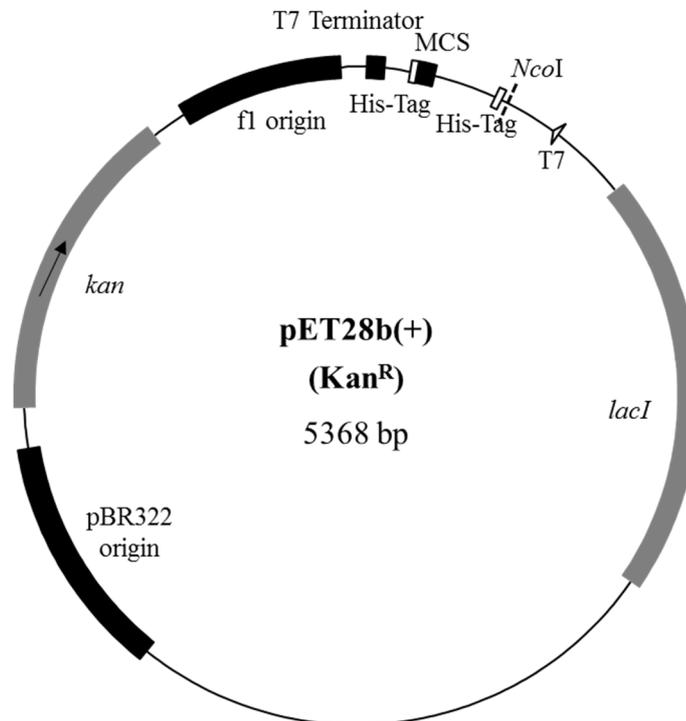
- SOLOPOVA, A., BACHMANN, H., TEUSINK, B., KOK, J., NEVES, A. R. & KUIPERS, O. P. (2012). A specific mutation in the promoter region of the silent *cel* cluster accounts for the appearance of lactose-utilizing *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and environmental microbiology* **78**, 5612–5621.
- SOLOPOVA, A., VAN GESTEL, J., WEISSING, F. J., BACHMANN, H., TEUSINK, B., KOK, J. & KUIPERS, O. P. (2014). Bet-hedging during bacterial diauxic shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 7427–7432.
- SØRENSEN, K. I. & HOVE-JENSEN, B. (1996). Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *Journal of bacteriology* **178**, 1003–1011.
- SRIKUMAR, S. & FUCHS, T. M. (2011). Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in food and in nematodes. *Applied and environmental microbiology* **77**, 281–290.
- STAIB, L. & FUCHS, T. M. (2014). From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology (Reading, England)* **160**, 1020–1039.
- STAIB, L. & FUCHS, T. M. (2015). Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in microbiology* **6**, 1116.
- STARKE, M., RICHTER, M. & FUCHS, T. M. (2013). The insecticidal toxin genes of *Yersinia enterocolitica* are activated by the thermolabile LTTR-like regulator TcaR2 at low temperatures. *Molecular microbiology* **89**, 596–611.
- STEEB, B., CLAUDI, B., BURTON, N. A., TIENZ, P., SCHMIDT, A., FARHAN, H., MAZE, A. & BUMANN, D. (2013). Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. *PLoS pathogens* **9**, e1003301.
- STOEBEL, D. M., FREE, A. & DORMAN, C. J. (2008). Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology (Reading, England)* **154**, 2533–2545.
- STUDIER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J. & DUBENDORFF, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology* **185**, 60–89.
- STURM, A., HEINEMANN, M., ARNOLDINI, M., BENECKE, A., ACKERMANN, M., BENZ, M., DORMANN, J. & HARDT, W.-D. (2011). The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS pathogens* **7**, e1002143.
- SWAIN, P. S., ELOWITZ, M. B. & SIGGIA, E. D. (2002). Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12795–12800.
- TÂNASE-NICOLA, S. & TEN WOLDE, P. R. (2008). Regulatory control and the costs and benefits of biochemical noise. *PLoS computational biology* **4**, e1000125.
- THATTAI, M. & VAN OUDENAARDEN, A. (2004). Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* **167**, 523–530.

- THIENNIMITR, P., WINTER, S. E., WINTER, M. G., XAVIER, M. N., TOLSTIKOV, V., HUSEBY, D. L., STERZENBACH, T., TSOLIS, R. M., ROTH, J. R. & BAUMLER, A. J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17480–17485.
- TOMLJENOVIC-BERUBE, A. M., MULDER, D. T., WHITESIDE, M. D., BRINKMAN, F. S. L. & COOMBES, B. K. (2010). Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS genetics* **6**, e1000875.
- VAN DIEPEN, A., van de Gevel, Joke S, KOUDIJS, M. M., OSSENDORP, F., BEEKHUIZEN, H., JANSSEN, R. & VAN DISSEL, J. T. (2005). Gamma irradiation or CD4+T-cell depletion causes reactivation of latent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in C3H/HeN mice. *Infection and immunity* **73**, 2857–2862.
- VAZQUEZ-TORRES, A. & FANG, F. C. (2001). *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes and infection* **3**, 1313–1320.
- VEENING, J.-W., SMITS, W. K. & KUIPERS, O. P. (2008b). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual review of microbiology* **62**, 193–210.
- VEENING, J.-W., STEWART, E. J., BERNGRUBER, T. W., TADDEI, F., KUIPERS, O. P. & HAMOEN, L. W. (2008a). Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4393–4398.
- WALKER, N., NGHE, P. & TANS, S. J. (2016). Generation and filtering of gene expression noise by the bacterial cell cycle. *BMC biology* **14**, 11.
- WANG, Y., HOLMES, E., COMELLI, E. M., FOTOPOULOS, G., DORTA, G., TANG, H., RANTALAINEN, M. J., LINDON, J. C., CORTHESEY-THEULAZ, I. E., FAY, L. B., KOCHHAR, S. & NICHOLSON, J. K. (2007). Topographical variation in metabolic signatures of human gastrointestinal biopsies revealed by high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. *Journal of proteome research* **6**, 3944–3951.
- WATERS, L. S. & STORZ, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**, 615–628.
- WHO. *Salmonella* (non-typhoidal): Fact sheet.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>, 17.03.2017
- WICHELHAUS, T. A., BODDINGHAUS, B., BESIER, S., SCHAFER, V., BRADE, V. & LUDWIG, A. (2002). Biological Cost of Rifampin Resistance from the Perspective of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3381–3385.
- WILHARM, G. & HEIDER, C. (2014). Interrelationship between type three secretion system and metabolism in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **4**, 150.
- WILMES-RIESENBERG, M. R., FOSTER, J. W. & CURTISS, R. 3. (1997). An altered *rpoS* allele contributes to the avirulence of *Salmonella* Typhimurium LT2. *Infection and immunity* **65**, 203–210.
- WINTER, S. E., THIENNIMITR, P., WINTER, M. G., BUTLER, B. P., HUSEBY, D. L., CRAWFORD, R. W., RUSSELL, J. M., BEVINS, C. L., ADAMS, L. G., TSOLIS, R. M., ROTH, J. R. & BAUMLER, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–429.

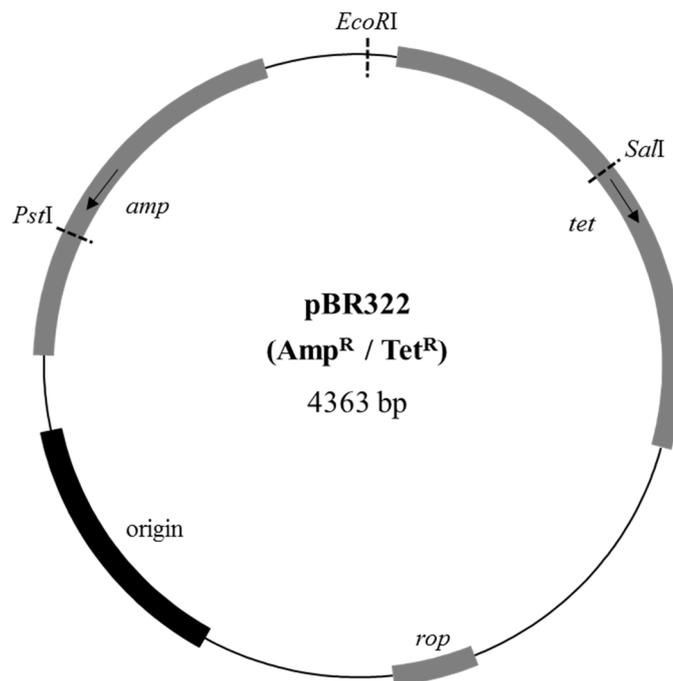
- WORLEY, M. J., CHING, K. H. & HEFFRON, F. (2000). *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular microbiology* **36**, 749–761.
- WORRALL, L. J., LAMEIGNERE, E. & STRYNADKA, N. C. J. (2011). Structural overview of the bacterial injectisome. *Current opinion in microbiology* **14**, 3–8.
- WYCUFF, D. R. & MATTHEWS, K. S. (2000). Generation of an AraC-araBAD promoter-regulated T7 expression system. *Analytical biochemistry* **277**, 67–73.
- YANG, S., KIM, S., RIM LIM, Y., KIM, C., AN, H. J., KIM, J.-H., SUNG, J. & LEE, N. K. (2014). Contribution of RNA polymerase concentration variation to protein expression noise. *Nature communications* **5**, 4761.
- YEBRA, M. J., ZUNIGA, M., BEAUFILS, S., PEREZ-MARTINEZ, G., DEUTSCHER, J. & MONEDERO, V. (2007). Identification of a gene cluster enabling *Lactobacillus casei* BL23 to utilize *myo*-inositol. *Applied and environmental microbiology* **73**, 3850–3858.
- YOSHIDA, K. I., AOYAMA, D., ISHIO, I., SHIBAYAMA, T. & FUJITA, Y. (1997). Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **179**, 4591–4598.
- YOSHIDA, K. I., SHIBAYAMA, T., AOYAMA, D. & FUJITA, Y. (1999). Interaction of a repressor and its binding sites for regulation of the *Bacillus subtilis* *iol* divergon. *Journal of molecular biology* **285**, 917–929.
- YOSHIDA, K.-I. (2001). Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* **29**, 683–692.
- YOSHIDA, K.-I., YAMAGUCHI, M., IKEDA, H., OMAE, K., TSURUSAKI, K.-I. & FUJITA, Y. (2004). The fifth gene of the *iol* operon of *Bacillus subtilis*, *iolE*, encodes 2-keto-*myo*-inositol dehydratase. *Microbiology (Reading, England)* **150**, 571–580.
- YOSHIDA, K.-I., YAMAGUCHI, M., MORINAGA, T., KINEHARA, M., IKEUCHI, M., ASHIDA, H. & FUJITA, Y. (2008). *myo*-Inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10415–10424.
- YOSHIDA, K.-I., YAMAMOTO, Y., OMAE, K., YAMAMOTO, M. & FUJITA, Y. (2002). Identification of two *myo*-inositol transporter genes of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **184**, 983–991.
- YU, J., XIAO, J., REN, X., LAO, K. & XIE, X. S. (2006). Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *Science (New York, N.Y.)* **311**, 1600–1603.
- YÜKSEL, M., POWER, J. J., RIBBE, J., VOLKMANN, T. & MAIER, B. (2016). Fitness Trade-Offs in Competence Differentiation of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in microbiology* **7**, 888.
- ZHU, Y., NANDAKUMAR, R., SADYKOV, M. R., MADAYIPUTHIYA, N., LUONG, T. T., GAUPP, R., LEE, C. Y. & SOMERVILLE, G. A. (2011). RpiR homologues may link *Staphylococcus aureus* RNAlII synthesis and pentose phosphate pathway regulation. *Journal of bacteriology* **193**, 6187–6196.
- ZKBS (1998). Einstufung der *Salmonella* Typhimurium Stämme MvP101 und MvP103 (HH104) mit Mutationen in den Genen *sseD* bzw. *sseC*.

7. Anhang

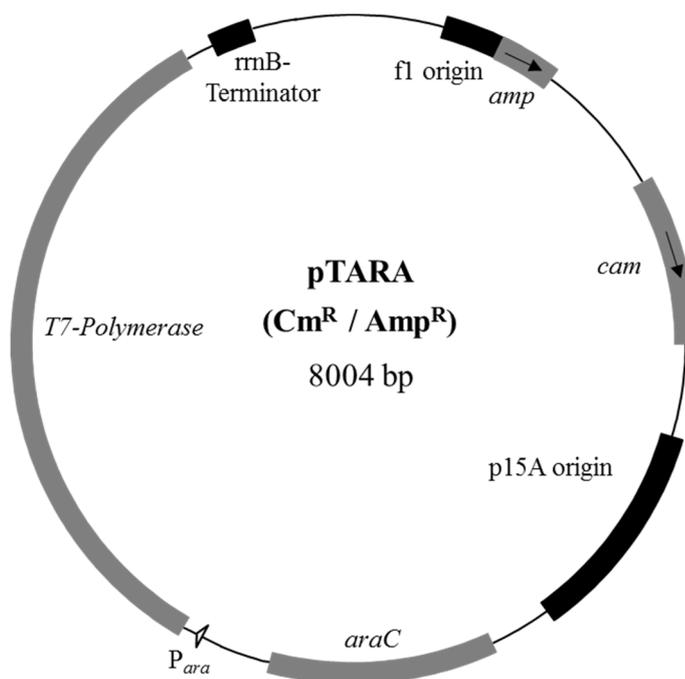
Abb. 33: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pET28b(+) (Kan^R)



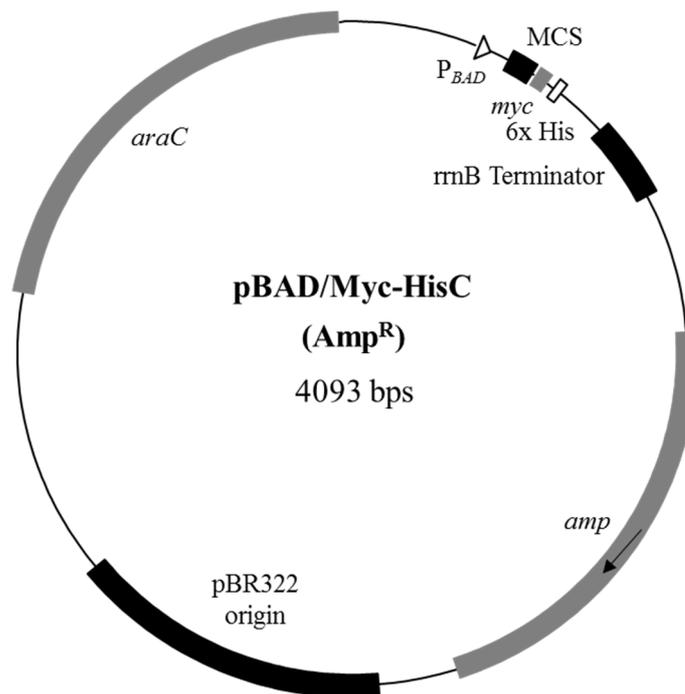
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
T7 Terminator	26	72	Terminator
6x His	140	157	C-terminaler Polyhistidin-Anhang
MCS	158	203	<i>multiple cloning site</i> (enthält <i>XhoI</i> -Schnittstelle)
6x His	270	287	N-terminaler Polyhistidin-Anhang
T7	385	367	T7-Promotor
<i>lacI</i>	763	1854	<i>lacI</i> -Gen
pBR322 origin	3269	3888	Replikationsursprung
<i>kan</i>	3994	4809	Kanamycin-Resistenzgen
f1 origin	4903	5328	Replikationsursprung

Abb. 34: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pBR322 (Amp^R / Tet^R)

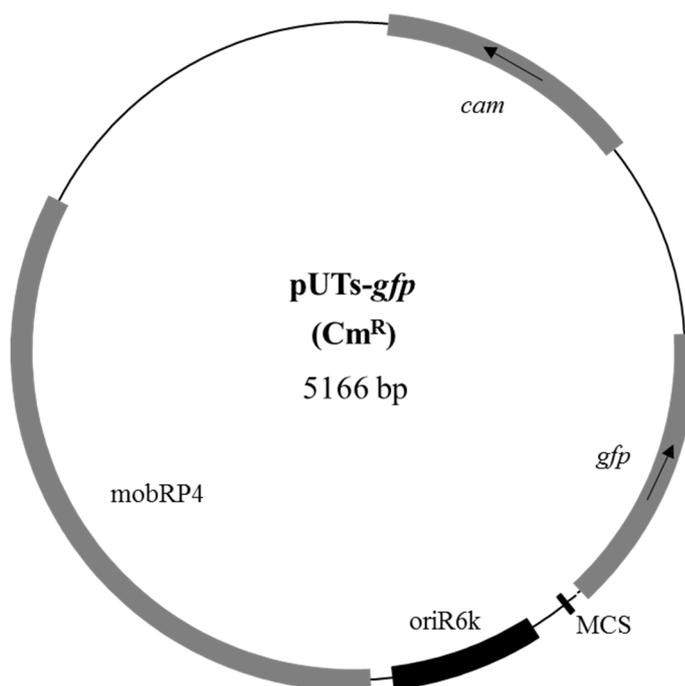
Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>tet</i>	86	1276	Tetrazyklin-Resistenzgen
<i>rop</i>	1918	2108	<i>rop</i> -Gen
origin	3124	2536	Replikationsursprung
<i>amp</i>	4155	3295	Ampicillin-Resistenzgen

Abb. 35: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pTARA (Cm^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
fl origin	354	653	Replikationsursprung
<i>amp</i>	576	803	Ampicillin-Resistenzgen
<i>cam</i>	1346	2005	Chloramphenicol-Resistenzgen
p15A origin	2367	3206	Replikationsursprung
<i>araC</i>	3450	4328	<i>araC</i> -Gen
P _{ara}	4602	4630	Arabinose-Promotor
T7-Polymerase	4685	7336	T7-Polymerase-Gen
rrnB Terminator	7449	7606	

Abb. 36: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pBAD/Myc-HisC (Amp^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>P_{BAD}</i>	248	276	<i>araBAD</i> Promotorregion
MCS	317	370	<i>multiple cloning site</i> (enthält <i>Nco</i> I- und <i>Hind</i> III-Schnittstelle)
<i>myc</i>	376	405	<i>myc</i> -Epitop
6x His	421	438	C-terminaler Polyhistidin-Anhang
<i>amp</i>	980	1840	Ampicillin-Resistenzgen
pBR322 origin	1995	2614	Replikationsursprung
<i>araC</i>	3189	4067	<i>araC</i> -Gen

Abb. 37: Plasmidkarte und Eigenschaften des Vektors pUTs-*gfp* (Cm^R)

Bezeichnung	Start	Ende	Beschreibung
<i>cam</i>	746	87	Chloramphenicol-Resistenzgen
<i>gfp</i>	1963	1247	Promotorloses <i>gfp</i> -Gen
MCS	2017	2005	<i>multiple cloning site</i> (enthält <i>KpnI</i> -Schnittstelle)
ori6k	2482	2113	R6K-Replikationsursprung
mobRP4	4267	2540	Mobilitätsregion

Tab. 21: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide und deren Anwendungsgebiet.

Nummer	Nukleotidsequenz von 5' → 3'	Modifikation	Target
<i>Generierung der Fragmente für die pUTs-Konstrukte</i>			
4	CGGggtaccCAGCGTATTAATGAC	<i>Kpn</i> I	P _{iolR}
2332	CGGggtaccGCATGATACTCTAATAG	<i>Kpn</i> I	~
53	CGGggtaccCCCTTGCCTGTTGAG	<i>Kpn</i> I	P _{iolTI}
54	CGGggtaccGCAATCGCGCAGA	<i>Kpn</i> I	~
2401	CGGggtaccCTGGGTGACCTGACG	<i>Kpn</i> I	P _{reiD}
2250	CGGggtaccGCATGATTTACCCTCC	<i>Kpn</i> I	~
2405	CGGggtaccGAATTTAAACGCCGC	<i>Kpn</i> I	P _{iolE}
2254	CGGggtaccCCACTTAATGAAACGC	<i>Kpn</i> I	~
22	CGGggtaccCCCCTAACAGAAGACGG	<i>Kpn</i> I	P _{iolC}
24	CGGggtaccCCCGTGGCCAAAATG	<i>Kpn</i> I	~
28	CGGggtaccAAAATGCGGATGAAGGGG	<i>Kpn</i> I	<i>iolR</i>
29	CGGggtaccCCAGTGAAACCGCTAACG	<i>Kpn</i> I	~
31	CGGggtaccACCATTATGCGACGGTGG	<i>Kpn</i> I	<i>reiD</i>
33	CGGggtaccGCGACCATTCTCATGACGA	<i>Kpn</i> I	~
34	CGGggtaccGGCAGCTTTTATGCGAAGG	<i>Kpn</i> I	<i>iolE</i>
36	CGGggtaccGCCGATACCTACAATACCTGC	<i>Kpn</i> I	~
43	CGGggtaccAAGCGCTGGAGTATGC	<i>Kpn</i> I	<i>iolC</i>
45	CGGggtaccGTGGCGCGATAACCACT	<i>Kpn</i> I	~
63	CGGggtaccACCCTGGTTGGTGC	<i>Kpn</i> I	P _{rpsM}
64	CGGggtaccACGGGCCACTATGC	<i>Kpn</i> I	~
14	CGGggtaccGTTCCACACATAACCGG	<i>Kpn</i> I	P _{argS}
3	TTTggtaccCGGAATACCTTACGTTTATG	<i>Kpn</i> I	~
<i>Prüfung auf chromosomale Integration der pUTs-Konstrukte</i>			
26	TGCGGATGAAGTGTTC	-	P _{iolR}
56	GATTCATCATCGCCG	-	P _{iolTI}
2400	TCGTCCCGATGCTTTTCC	-	P _{reiD}
2404	TTCTATGAGCCAATTCGG	-	P _{iolE}
27	GCAGCAAAGCAGTGG	-	P _{iolC}
58	GTGGTCAACGCCGTAT	-	P _{rpsM}

Fortsetzung von Tab. 21

Durchführen einer Deletionsmutagenese

1984	TACGAAATTTTCGTTCTATTAGAGTATCATGCATGTCT AAACATCAAACCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT	<i>iolR</i>
1985	ATCGGCTTGTTTTTTTACTCCGTCGCCAGCGCCAGTGA AACCGCTAACGTCATATGAATATCCTCCTTA	~
2052	GTATTTAGCGATCATCGGCATTGTGGTGAAACTTAAT CAGAATAACGTTTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>iolT1</i>
2107	AAATCCACCCGTTTTTAAACGTCCGAGTAGCTCCCGCTC GATCCGCTCGCGCATATGAATATCCTCCTTA	<i>iolH</i>
6	ACGGCTTGTTTCCAGGGTGTTAGCGCGAGATTATGCG ATTTTCCAGATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>dacB</i>
7	CCGGCAATAAATGCACTCAGTTATTCTGATAAATATC CTTATAACAACCGACTCCATATGAATATCCTCCTTA	~
139	GCAATCCTGACTCATTAAAGGACACGACAATGACGATT TTTGATAATTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>araA</i>
140	CAATCCGTTTCACCAATTAACGTTTGAACCCGTAATAC ACCTCGTTCCAGCATATGAATATCCTCCTTA	~
141	CATCGGGGGGTAGAGAAATCATGGCTGAAACGCAAA ATGATCCGCTATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>araC</i>
142	CTTTGTGGACACATCATTCACTTTTTATTACATCCGG CCCTGAACCTCGCCATATGAATATCCTCCTTA	~

Nachweis der Deletion bzw. Kanamycin-Resistenzkassette

1986	TATGTTCAAGTTCATTTGTGC	-	<i>iolR</i>
1987	TATTCTGATTAAGTTTCACC	-	~
1990	TTGCTCAGAACCCAGCCC	-	~
1991	CTGCAGCCAATTCAAACCG	-	~
189	CCGAAATCAGCGCGTC	-	<i>iolH</i>
1557	GTATGCAGCCGCCGC	-	Kan ^R
2043	CGATGCCTGCTTGCCG	-	~
15	GGGCAATGAACTCTACCC	-	<i>dacB</i>
16	GCAGCTGGCTGAAGTGGAAG	-	~
143	GATGGCGCTTCGCTTATC	-	<i>araA</i>
144	AGCTTTACCGCCGCTACCAGCAG	-	~
145	TGTGGACATTCCAGCCATAG	-	<i>araC</i>
146	GCAGGGATTCTGCTTACC	-	~

Fortsetzung von Tab. 21

Nachweis der Plasmide in der Bakterienzelle

2153	TGCCACCTGACGTCTAAG	-	pBR322
25	GCTGACATTCATCCGG	-	pKD4
87	CAGTGAGCGCAACG	-	pUC18
174	TAGGGGAATTGTGAGCGG	-	pET28b
175	GTTATTGCTCAGCGGTGG	-	~
180	GAAGCACGCTTCCGC	-	pTARA
181	CCTCAGCAGCCAGCAG	-	~
3696	TGGAATTCTGACTCTTATAC		pUTs
3697	CAGGTATTTATTCGGCGC		~

Für die Durchführung der Gelmobilitätsstudien

138	TTGCTCAGAACCCAGC	-	P_{iolR}
139	CTGCGGATATCATCCTGC	-	~
140	CACTAAGAGTGTTCCGCC	-	~
141	CGCAAACGTTGAAAGGC	-	~
142	GCCTTTCAACGTTTGCG	-	~
143	GTACAGAATTTGCTGGCG	-	~
144	CAATCGCGCAGATGC	-	P_{iolT1}
145	GCTACGGCAATGACCG	-	~
146	CTTATGTCGGTCATTGCC	-	~
147	AGCACTGCGTAAAACG	-	~
148	TTTACGCAGTGCTCTCC	-	~
149	CGAAATGGAGATGTTCCAGG	-	~
150	AGTTCAGGTAAGTTCGCG	-	~
158	AATTTGTCAGGGGCCG	-	P_{iolT2}
159	ACGTACACATAGGCCG	-	~
162	CTGCTGCTCAGTGTCG	-	P_{iolA}
163	GCTGCACATAACCCTCG	-	~
164	CGAGGGTATGTGCAGC	-	~
165	TGTGGTGCCGAAACCC	-	~
166	TTCAGGGGGGTTTCGG	-	~
167	AACTGGGGGCTGAGC	-	~

Fortsetzung von Tab. 21

168	CCATTGATGACACACC	-	~
169	GGTGTGTCATCAATGG	-	~
151	TCCAGCGGCTTTTGC	-	P _{iolC1}
152	ATCATGCCCGTTGCC	-	~
153	CATTTCCGGGCAACG		
154	TCGACATTCAGGCG		
155	ACGCCTGAATGTCG		
156	ATGCATCGCTTCAGCC		
157	ATGGGAAGGAGATC	-	~
160	CGATGCATAAGCAGGC	-	P _{iolD1}
161	AAAGCGCACCAAAGCC	-	~
2073	CAACCTTTGATTTGATTGG	-	P _{argS}
2074	AAGAGCCTGAATATTCAC	-	~
2	TTTggtaccGAGTGAATCGCGGTAAATC	KpnI	~
3	TTTggtaccCGGAATACCTTACGTTTATG	KpnI	~
191	GGTTGTCTGTTGTGACGAGG	-	P _{reiD}
192	CCACACCAAATGAAACAAAATGC	-	~
193	GGTGTGGTATAAAAATTCAAATTCAGG	-	~
194	GCACAAGCGCATGATTTACC	-	~

Surface Plasmon Resonance

88	TTGCTCAGAACCCAGC	biotinyliert	P _{iolR}
89	CTGCGGATATCATCCTGC	~	~
98	AACGATAAAAAACGCCAG	biotinyliert	P _{iolT1}
99	CTTATGTTCGGTCATTGCC	~	~
92	GGTGTGTCATCAATGG	biotinyliert	P _{reiD}
93	TGTGGTGCCGAAACCC	~	~
extern	GGGGTAATTTTTGTAAATTAACCCTTGTGTG AGAACACAAATGAATGCGCGTTATTGTAA GGGG	biotinyliert	P _{pcfA}
extern	CCCCTTAACAATAAGCGCATTCAATTTGTGTT CTCACACAAGGGTTAATTAACAAAATTAC CCC	~	~

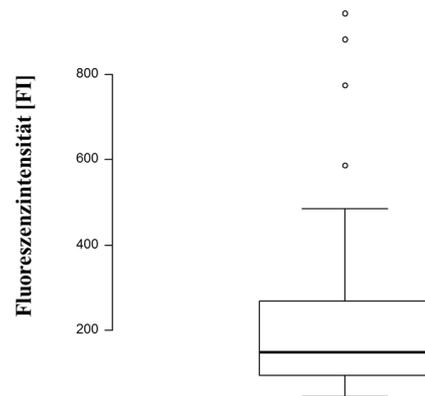


Abb. 38: gemittelte Autofluoreszenz des parenteral Stammes MvP101 während des Wachstums in LB-Medium und MM mit MI. Die optische Dichte einer ÜNK von MvP101 wurde auf 0,8 eingestellt, 1:500 in LB-Medium (zwei biologische Replikate) bzw. MM mit MI (zwei biologische Replikate) inokuliert und stehende bei 37 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkte des Wachstums wurden Proben aus der bakteriellen Kultur entnommen und die Gfp-exprimierenden Zellen im FACS Aria II Durchflusszytometer gemessen.

Tab. 22: Varianz der *rpsM*-Expression auf transkriptioneller Ebene während des Wachstums in MM mit MI oder LB-Medium. Fluoreszenzintensität des *Salmonella* Stamm MvP101 $P_{rpsM}::gfp$ berechnet Die Varianz wurde wie in der Legende von Tab. 9 berechnet.

	Zeit [h]	Mittelwert der Fluoreszenzintensität	Variationskoeffizient [VarK]
1	0	2.389	75
	4	2.540	67
	10	2.774	58
	14	4.860	50
	22	2.261	70
	24	2.362	52
	30	3.919	63
	38	1.922	54
	48	4.448	48
	2	0	7.020
13		10.175	44
15		12.228	36
17		12.423	48
19		11.952	52
24		6.085	53
26		5.641	54
28		6.607	75
3	0	11.845	62
	4	15.103	40
	8	11.177	38
	12	12.074	37
	16	12.955	33
	24	9.895	50
	28	8.218	44
	32	6.148	47

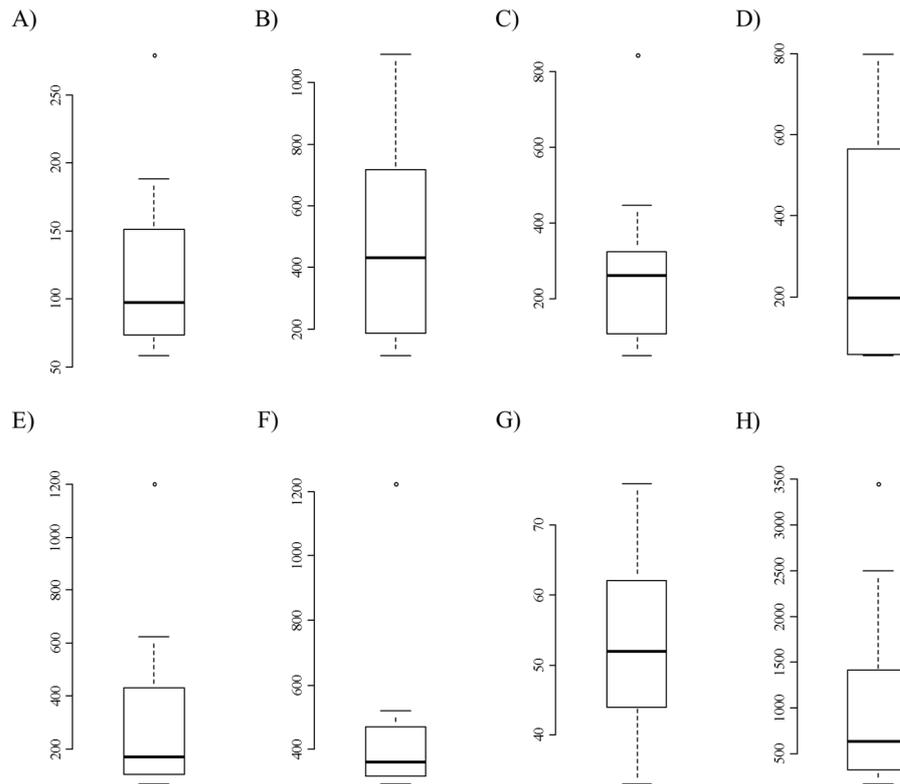


Abb. 39: Streuung innerhalb der *iol*-Genexpression während des Wachstums von *S. Typhimurium* mit *myo*-Inositol. Der Variationskoeffizient der Merkmalsausprägung von den *Salmonella* Stämmen MvP101 $P_{iolR}::gfp$ (A), MvP101 $iolR::gfp$ (B), MvP101 $P_{reiD}::gfp$ (C), MvP101 $reiD::gfp$ (D), MvP101 $P_{iolE}::gfp$ (E), MvP101 $P_{iolT1}::gfp$ (F), MvP101 $P_{rpsM}::gfp$ (G) und MvP101 (H) wurde in seiner Verteilung über den gesamten Wachstumsverlauf in Abhängigkeit von MI dargestellt. Aus dieser Fünf-Punkte-Zusammenfassung sind der Median, die zwei Quartile und die Extremwerte mit eventuellen Ausreißern zu erkennen.

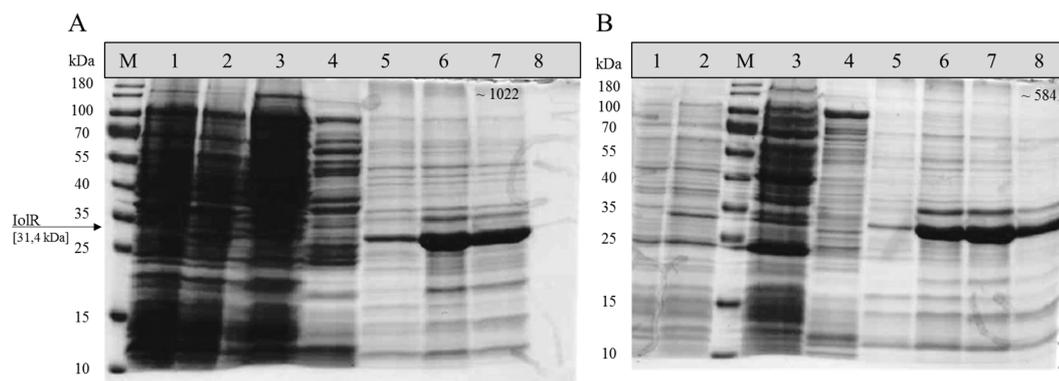


Abb. 40: Isolation des Repressor IolR aus heterologen und nativen Wirt kultiviert in LB-Medium mittels HisTrap-Säule von GE Healthcare und dem ÄKTA-System. *E. coli* BL21 pET28b-IolR6xHis (A) und *S. Typhimurium* $\Delta araA$ pET28b-IolR6xHis pTARA (B) wurde in LB-Medium inokuliert und IolR-Überexpression gezielt induziert. M: Größenstandard [kDa], vor Induktion (1), nach Induktion (2), Filtrat (3), Durchfluss (4), erste Waschfraktion (5), zweite Waschfraktion (6), erstes Eluat (7) und zweites Eluat (8). Konzentrationsbestimmung der ersten Eluatsfraktion erfolgte mittels Bradford und die Proteinmenge ist in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.

7.1. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, die mich auf meinem Weg stets begleitet, unterstützt und motiviert haben. Ihnen gilt meine größte Anerkennung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thilo M. Fuchs bedanken, der mich ermutigt hat diese Herausforderung anzunehmen und mit mir diesen Weg bestritten hat. Ich blicke auf viele Gespräche und eine Handlungsfreiheit zurück, die mich zu der Naturwissenschaftlerin gemacht hat, die ich heute bin. Durch ihn konnte ich über mich hinaus wachsen und dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl, Leiter des Lehrstuhls für Mikrobiologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, für die schnelle und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. S. Scherer, der als Leiter des Lehrstuhls für mikrobielle Ökologie, Department für Grundlagen der Biowissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan mir meine Doktorarbeit ermöglichte und immer ein offenes Ohr hatte. Außerdem bin ich froh darüber, ihn als Prüfungsvorsitzenden gewonnen zu haben.

Ein besonderer Dank geht an die derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der AG Fuchs: Tanja Kern, Nicoletta Nolle, Johannes Rothhardt, Jakob Schardt, Katharina Springer, Lena Staib und Mandy Starke. Dank ihrer stets offenen und hilfsbereiten Art konnte ich die Arbeit meistern. Die Zeit mit ihnen, ob auf der Arbeit oder Privat war toll. Danke!

Ein herzliches Dankeschön geht an die technischen Assistenten Angela Felsl, Patrick Schiwiek und Christine Polte, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die ich so manches Mal nicht weitergekommen wäre.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dominik Brokatzky bedanken, der in einer schwierigen Zeit wie „das Licht im Dunkel“ für mich war. Ich danke meinen Praktikanten Franziska Wagner, Sabine Behrend und Anna-Lena Ammend für ihre tüchtige Arbeit und wünsche ihnen alles Gute für euren weiteren Weg.

Ein spezielles Dankeschön möchte ich an die anderen Arbeitsgruppenleiter und Doktoranden des Lehrstuhls für mikrobielle Ökologie aussprechen, um sie zu sehen bin

ich immer gerne zur Arbeit gekommen. Danke für die Ratschläge, Hilfe und Kritik, die mich und meine Arbeit vorangebracht haben.

Ebenso möchte ich der Deutsche Forschungsgemeinschaft und den gesamten Mitgliedern des Förderungsschwerpunktes SPP1617 „*phenotypic heterogeneity and sociobiology of bacterial population*“ danken, die mit ihrer Forschung meine bereichert haben. Vor allem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartner PD Dr. Ralf Heermann bedanken, der die Analysen der SPR-Spektroskopie übernommen hat und für meine zahlreichen Fragen immer zur Verfügung stand.

Ein besonderer Dank gilt den anonymen Gutachtern meiner Veröffentlichungen in *Scientific Reports* und *Microbiology Open*, durch die ich weitere Erkenntnisse erlangen konnte und meine Arbeit dadurch an Substanz dazugewonnen hat.

Von tiefsten Herzen danke ich meinen Eltern Michaela Ströher-Hellinckx und Jürgen Gocke, sowie meinem Stiefvater Thomas Ströher und meinen Geschwistern Thomas, Patric, Désirée, Kilian und Stivalis-Susanna, die mich mit viel Geduld in vielen Lebenslagen unterstützt und mir diesen Weg ermöglicht haben.

7.2. Veröffentlichungen

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

Publikation

Hellinckx, J. and Fuchs, T.M. Hysteresis in *myo*-inositol utilization by *Salmonella* Typhimurium. *MicrobiologyOpen*, 2017;6:e431; doi:10.1002/mbo3.431 (2016).

Hellinckx, J.; Heermann, R.; Felsl, A. and Fuchs, T.M. High binding affinity of repressor IolR avoids costs of untimely induction of *myo*-inositol utilization by *Salmonella* Typhimurium. *Scientific Reports* 7, 44362; doi:10.1038/srep44362 (2017).

Tagungsbeiträge

Hellinckx, J., Fuchs T.M. Bistability and hysteresis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during *myo*-inositol utilization. *Posterpräsentation im Rahmen einer internationalen Konferenz des Schwerpunktprogrammes „Phänotypische Heterogenität und Soziobiologie“ (SPP1617) der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Irsee (15. – 17.10.2014)*

Hellinckx, J., Fuchs T.M. Bistability of *S. Typhimurium* during *myo*-inositol degradation. *Vortrag im Rahmen des Schwerpunktprogrammes „Phänotypische Heterogenität und Soziobiologie“ (SPP1617) der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Bad Staffelstein (27. – 29.11.2013)*

Hellinckx, J., Fuchs T.M. Bistability of *S. Typhimurium* during *myo*-inositol degradation. *Vortrag im Rahmen des Schwerpunktprogrammes „Phänotypische Heterogenität und Soziobiologie“ (SPP1617) der Deutschen Forschungsgemeinschaft in München (16. – 18.12.2012)*

7.3. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jessica Hellinckx, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Analyse des Repressors IolR im *myo*-Inositol-Stoffwechsel von *Salmonella enterica serovar* Typhimurium“

selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Pulheim, den

Jessica Hellinckx