

**Untersuchungen zur
Verbreitung und Funktion
des äußere-Membran-Proteins
OmpW von *Salmonella* spp.**

Alexander Postel

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet. beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

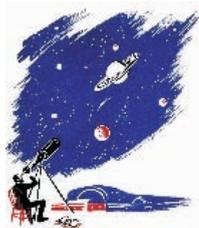
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Bauerfeind

**Untersuchungen zur Verbreitung und Funktion des
äußere-Membran-Proteins OmpW von *Salmonella* spp.**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Alexander Postel

Tierarzt aus Göttingen

Gießen, 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Prof. Dr. C. Greveling

Tag der Disputation: 26.09.2008

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Postel, A., Barth, S., Bauerfeind, R.

Molekulargenetische Untersuchungen über Vorkommen und Organisation des Omp21-Genlokus im Genus *Salmonella*

30.06.2004: Drittmittelforschung am Fachbereich Veterinärmedizin der J.-L.-Universität Gießen, Gießen (Poster).

Postel, A., Tedin, K., Barth, S., Bauerfeind, R.

Verbreitung und Expression des äußere-Membran-Proteins OmpW bei Salmonellen

15.06.2006: Fachgruppentagung Bakteriologie und Mykologie der DVG, Wetzlar (Vortrag).

Postel, A., Barth, S., Tedin, K., Bauerfeind, R.

„Distribution and expression of the outer membrane protein OmpW among *Salmonella* spp.“; 01.-04.10.2006: 58. Jahrestagung der DGHM, Würzburg (Poster).

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des **Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“**

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
2 SCHRIFTTUM	3
2.1 Porine bei Gram-negativen Bakterien.....	3
2.2 Porine bei Salmonellen	4
2.3 Das putative Porin OmpW.....	12
2.3.1 Lokalisation und Organisation von <i>ompW</i> im Genom.....	12
2.3.2 Struktur und Aufbau des Proteins OmpW	16
2.3.3 OmpW-Homologa bei Salmonellen und anderen Bakterien	19
2.3.4 Regulation der Expression von OmpW	21
2.3.5 Lokalisation von OmpW in der Bakterienzelle	25
2.3.6 Milieuabhängige Expression und mögliche Funktionen von OmpW und seinen Strukturhomologa	26
2.3.6.1 Eigenschaften als Pore oder Bestandteil eines Transportsystems	26
2.3.6.2 Bedeutung von OmpW für die Stabilisierung der äußeren Membran.....	30
2.3.6.3 OmpW-vermittelte Virulenzeigenschaften	31
2.3.7 Immunogene Eigenschaften von OmpW	33
3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 Bakterienstämme und Zelllinien.....	34
3.2 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen	40
3.3 Plasmide	40
3.4 Impfstoffe.....	45
3.5 Tiere	46

3.6	Bakteriologische Methoden	46
3.6.1	Anzucht von Bakterien	46
3.6.2	Keimzahlbestimmung	48
3.6.3	Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation mit DNS	48
3.6.4	Phänotypische Charakterisierung von <i>Salmonella enterica</i> -Stämmen.....	48
3.7	Molekulargenetische Methoden.....	51
3.7.1	Präparation von DNS	51
3.7.2	Aufreinigung von DNS.....	52
3.7.3	Bestimmung von DNS-Konzentrationen	53
3.7.4	Restriktion von DNS.....	53
3.7.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
3.7.6	Agarosegelelektrophorese	60
3.7.7	Pulsfeld-Gelelektrophorese	60
3.7.8	DNS-DNS-Hybridisierung.....	61
3.7.9	Klonierung.....	63
3.7.9.1	Klonierung der Gene <i>stm1733</i> und <i>ompW</i> in den pET-24b(+)-Vektor	63
3.7.9.2	Klonierung des <i>katN</i> -Gens in den pET-24b(+)-Vektor	63
3.7.9.3	Klonierung von <i>ompW</i> in pBR322 zur Komplementierung von SL1344 Δ <i>ompW</i>	64
3.7.10	Transformation mit DNS.....	65
3.7.11	Generation einer <i>ompW</i> -Deletionsmutante von <i>S. Tm.</i> SL1344	66
3.7.12	Sequenzierung.....	68
3.8	Proteinanalytische und -präparative Methoden	68
3.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	68
3.8.2	SDS-PAGE	68
3.8.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni ²⁺ -NTA-Matrix.....	69
3.8.4	Entsalzung von Proteinfractionen.....	69
3.9	Serologische Methoden	70
3.9.1	Serotypisierung.....	70
3.9.2	Antikörper und Seren	70
3.9.3	Serumabsorption.....	72
3.9.4	Immuno-Blot.....	72
3.9.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	73
3.9.6	Fluorescence-Assisted Cell Sorting (FACS).....	73
3.10	Impfungen und Serumgewinnung.....	74

3.11	Datenhaltung und Auswertung.....	75
3.11.1	Bilddokumentation	75
3.11.2	Auswertung von DNS- und Aminosäure-Sequenzdaten	75
3.11.3	Statistische Auswertung.....	75
4	ERGEBNISSE.....	76
4.1	Rekombinante Herstellung von OmpW-, STM1733- und KatN-Histidin- markierten Fusionsproteinen zur Herstellung polyklonaler Hyperimmunseren.....	76
4.2	Vorkommen von OmpW bei Salmonellen und anderen Bakterien.....	84
4.2.1	Vorkommen von OmpW bei Salmonellen.....	84
4.2.2	Vorkommen von OmpW bei anderen Bakterien	90
4.3	Untersuchungen zur biologischen Funktion von OmpW bei Salmonellen	93
4.3.1	Verifizierung OmpW-exprimierender und -defizienter Salmonellen-Stämme .	93
4.3.1.1	Charakterisierung der natürlichen <i>ompW</i> -Deletionsmutante SARC9.....	93
4.3.1.2	Charakterisierung der gentechnisch erzeugten <i>ompW</i> -Knockout- Mutante SL1344 Δ <i>ompW</i>	97
4.3.2	Untersuchungen zur physiologischen Funktion von OmpW	108
4.3.2.1	Biochemische StoffwechsellLeistungen	108
4.3.2.2	Fitness unter verschiedenen <i>in vitro</i> -Wachstumsbedingungen.....	110
4.3.2.3	Widerstandsfähigkeit gegen Chemotherapeutika und Detergentien	119
4.3.2.4	Invasionsfähigkeit und intrazelluläres Überleben von Salmonellen	124
5	DISKUSSION.....	126
6	ZUSAMMENFASSUNG	149
7	SUMMARY.....	151
8	LITERATURVERZEICHNIS	153
9	ANHANG	175
10	DANKSAGUNG	182

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

#	Datenbanknummer eines NCBI-Datenbankeintrages
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin bzw. Carbenicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	Arabinose
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
<i>bla</i>	Gen für Ampicillin bzw. Carbenicillin-Resistenz
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
<i>C.</i>	<i>Comamonas</i> spp.
Da	Dalton
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DIG	Digoxigenin
DIVA	differentiating infected from vaccinated animals
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsDNS	Doppelsträngige DNS
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescent-activated cell sorting, Durchflusszytometer
Fur	eisenabhängiges Regulatorprotein (ferric uptake regulator)
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
H1/H2	Homologe Extensionen der Rekombinationsprimer
HGT	Horizontaler Gentransfer
His	Histidin-Marker
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
h	Stunde
iFA	inkomplettes Freundesches Adjuvans
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen
Ig	Immunglobulin
i. m.	intramuskulär
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
k. A.	keine Angabe

<i>kan</i>	Gen für Kanamycin-Resistenz
<i>katN</i>	Gen der Non-Haem-Katalase KatN
Kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
L	Leucin
<i>lacI</i>	<i>lac</i> -Repressorgen
LBA	Luria Bertani-Agar
LBM	Luria Bertani-Medium
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M9-CA	mit Casaminosäuren supplementiertes M9-Minimalmedium
mA	Milliampere
MDR	Multi-Drug-Resistant
MEM	modified Eagle medium
MG	Molekulargewicht
MH	Müller-Hinton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MV	Methylviologen
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM	Molekulare Masse
ms	Millisekunden
MV	Methylviologen
n	Stichprobenumfang
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA
NCTC	National Collection of Type Cultures, Salisbury, England
OD600	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>ompW</i>	Gen des äußere-Membran-Proteins OmpW
OMV	Outer membrane vesicle
OPD	Ortho-Phenylen-Diphosphat
<i>ori</i>	origin of replication, Replikationsursprung
P	Prolin
<i>P.</i>	<i>Pasteurella</i> spp.
P1/P2	Bindungsstellen der Rekombinationsprimer im Template-Plasmid pKD4
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle
<i>rop</i>	Regulatorgen für low-copy Replikationsursprung
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SARB	<i>Salmonella</i> reference collection B
SARC	<i>Salmonella</i> reference collection C
<i>s. k.</i>	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
<i>spn</i>	Gen für Spectinomycin-Resistenz
ssDNS	Einzelsträngige DNS
STEC	Shigatoxin-bildende <i>E. coli</i>
<i>S. Tm.</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>stm1733</i>	Leserahmen 1733 von <i>S. Tm.</i>
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tag	Markierung, Anhängsel
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N ,N' ,N'-Tetramethyldiamin
<i>tet</i>	Gen für Tetrazyklin-Resistenz
Tc	Tetrazyklin
TOPO	Erkennungssequenz für Topoisomerase-vermittelte Integration
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v	Volumeneinheit
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i> spp.
<i>var. Cop.</i>	<i>variatio</i> Copenhagen
w	Gewichtseinheit
W	Tryptophan
<i>X.</i>	<i>Xanthomonas</i> spp.
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i> spp.

1 EINLEITUNG

Salmonellen gehören weltweit zu den bedeutendsten Infektionserregern bei Mensch und Tier (Fisher, 2004; Galanis *et al.*, 2006). Insbesondere Lebensmittel liefernde Nutztiere stellen eine wichtige Infektionsquelle für den Menschen dar (Plym, 2006). Aus diesem Grund sind die Diagnose, die Bekämpfung und die Immunprophylaxe von Salmonelleninfektionen bei Tieren nicht nur von veterinärmedizinischer Bedeutung, sondern auch von Relevanz für die Lebensmittelhygiene und die menschliche Gesundheit. Die große Heterogenität im Genus *Salmonella*, die fakultativ intrazelluläre Lebensweise und die intermittierende Ausscheidung des Erregers sind Faktoren, die die Diagnostik und Bekämpfung von Salmonelleninfektionen erschweren und die Suche nach verbesserten Bekämpfungsstrategien erforderlich machen.

Aufgrund ihrer Lokalisation an der Grenzschicht zwischen Bakterium und Umwelt spielen Proteine der äußeren Membran von Salmonellen und anderen Gram-negativen Bakterien eine Schlüsselrolle bei der Adaptation des Pathogens an die unterschiedlichen Milieubedingungen innerhalb und außerhalb des Wirtsorganismus. Insbesondere energieabhängige Transporter und Diffusionsporen für niedermolekulare Stoffe, die Porine, sind für die Anpassung der Salmonellen an veränderte Milieubedingungen verantwortlich. Vor diesem Hintergrund ist es verständlich, dass der Verlust von Porinen und anderen Transportmolekülen oft nicht nur mit einer verminderten Adaptationsfähigkeit, sondern auch mit einer herabgesetzten „Fitness“ der Salmonelle einhergeht. Bei pathogenen Bakterien zieht der Verlust an Porinen mitunter auch den Verlust an Virulenz mit sich. So sind z. B. Salmonellen-Stämme, denen die Porine OmpS1 oder OmpS2 fehlen, hochgradig attenuiert (Rodriguez-Morales *et al.*, 2006). Die Porine sind bei den verschiedenen Stämmen einer Bakterienart, bei der sie vorkommen, jeweils recht weit verbreitet und in ihrer Struktur zumindest teilweise auch sehr gut konserviert. Aus diesem Grunde eignen sich Porine und auch andere Proteine der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien als Kennzeichen für diagnostische Anwendungen in der medizinischen und veterinärmedizinischen Mikrobiologie (Amavisit *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Singh, 2003; Vora *et al.*, 2005). Für Salmonellen fehlen derzeit systematische Untersuchungen über die Verbreitung und die Prävalenz der verschiedenen Porine, jedoch konnte das Porin-Gen *ompC* als spezifischer Marker von Salmonellen-DNS aus Pferdekotproben in einem PCR-Test bereits erfolgreich eingesetzt werden (Amavisit *et al.*, 2001). Die hohe Immunogenität von Porinen macht auch einen Einsatz in der Serodiagnostik möglich (Kurupati *et al.*, 2006). Die oft guten immunogenen Eigenschaften von Salmonellen-Porinen beruhen auf TH1- und TH2-vermittelten Immunantworten und könnten dazu genutzt werden, einen auf Porinen und anderen äußere-Membran-Proteinen (outer membrane proteins, OMPs) basierenden Salmonellen-Impfstoff zu entwickeln (Galdiero *et al.*, 1998b; Isibasi *et al.*, 1994; Salazar-Gonzalez *et al.*, 2004; Secundino *et al.*, 2006). Solche Impfstoffe hätten möglicherweise den Vorteil gegenüber den herkömmlichen, auf dem Lipopolysaccharid als Antigen basierenden Impfstoffen, einen O-Gruppe-unabhängigen

Schutz zu induzieren (Boyce *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2000; Tabaraie *et al.*, 1994). Im Falle einer Attenuierung durch Porin-Verlust ist auch ein Einsatz als Impfstamm in einem Lebendimpfstoff denkbar, wobei das fehlende Porin oder dessen spezifische Antikörper gleichzeitig als Marker für den Impfstamm im Sinne eines DIVA (differentiating infected from vaccinated animals)-Impfkonzeptes eingesetzt werden könnten. Erste Versuche zur Entwicklung eines DIVA-Impfstoffes basierend auf einer *S. Typhimurium*-Knockout-Mutante für das Porin OmpD lieferten vielversprechende Ergebnisse (Selke *et al.*, 2007). Auch die Verwendung von solchen attenuierten Salmonellen-Stämmen als Vektoren für heterologe Impfantigene ist möglich (Husseiny & Hensel, 2005, 2006; Wang *et al.*, 2001).

Auf der Suche nach neuen, für alle Serovare einsetzbaren Markern und Impfantigenen bei Salmonellen wurde in dieser Arbeit das bislang wenig charakterisierte äußere-Membran-Protein OmpW von *Salmonella enterica* näher untersucht. Bei OmpW handelt es sich aufgrund von Strukturmerkmalen wahrscheinlich um ein Porin, welches nicht nur bei Salmonellen vorkommt, sondern auch bei anderen Bakteriengenera in der Familie der Enterobacteriaceae. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass OmpW von *Salmonella* eisenabhängig exprimiert wird und *in vivo* bei verschiedenen Tierarten in der Lage ist, spezifische Antikörper zu induzieren. Diese Eigenschaften und die Tatsache, dass OmpW bei *Vibrio* sp. als potentieller Virulenzfaktor gehandelt wird, machen OmpW zu einer möglichen molekularen Zielstruktur für diagnostische Anwendungen und neue Bekämpfungsstrategien. Um die Eignung von OmpW für derartige Anwendungen näher zu untersuchen, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie weit ist OmpW innerhalb des Genus *Salmonella* verbreitet?
2. Ist OmpW ein essentieller Vitalfaktor für Salmonellen?
3. Hat das Fehlen von OmpW einen Einfluss auf die Integrität der bakteriellen Zellwand?
4. Spielt OmpW bei der Adaptation von Salmonellen an das umgebende Milieu eine Rolle?

2 **SCHRIFTTUM**

2.1 **Porine bei Gram-negativen Bakterien**

Gram-negative Bakterien sind charakterisiert durch ihren typischen Zellwandaufbau. Die Zellwand besteht aus einem, die innere Zytoplasmamembran umgebenden Mureinnetzwerk, welches der Stabilisierung der Bakterienzelle dient, und der äußeren Membran, deren äußere Oberfläche eine Kontaktfläche zum Umgebungsmilieu darstellt (Benz & Bauer, 1988). Als periplasmatischer Raum wird der etwa 40 nm breite Spalt zwischen Zytoplasmamembran und äußerer Membran bezeichnet. Er ist ein zelluläres Kompartiment für Stoffwechselreaktionen und ein bedeutender Ort für posttranslationelle Modifikationen von Proteinen. Sowohl die Zytoplasmamembran als auch die äußere Membran sind nach dem Grundprinzip von biologischen Membranen aufgebaut und bestehen im Wesentlichen aus zwei lipidhaltigen Schichten. Das Vorhandensein von Zytoplasmamembran und äußerer Membran ist für bestimmte Substrate beim Stoffaustausch zwischen Bakterium und Umwelt eine Barriere.

Die Existenz einer inneren und einer äußeren Membran findet sich außer bei Gram-negativen Bakterien auch bei Mitochondrien oder Plastiden (z. B. Chloroplasten) eukaryotischer Zellen (Bolter & Soll, 2001; De Pinto *et al.*, 1987; 2003). Während die Permeation kleinerer lipophiler Moleküle durch diese Lipidmembranen über einfache Diffusion möglich ist, sind für den Stoffaustausch größerer Moleküle oder hydrophiler Substanzen Strukturen wie Poren, Transportproteine oder Transportsysteme notwendig (Benz & Bauer, 1988; Saier, 2000b). Der Stoffaustausch zwischen Zytoplasmamembran und periplasmatischem Raum wird in der Regel durch hochspezifische Transportsysteme vermittelt, der Austausch über die äußere Membran meist über Diffusion durch sogenannte Porine. Porine im engeren Sinne fungieren als Diffusionsporen ohne Substratspezifität (Achouak *et al.*, 2001; Lengeler, 1999). Auch eukaryotische Zellorganellen wie Mitochondrien und Plastiden besitzen in ihrer äußeren Membran Porine für den Stoffaustausch mit dem Zytoplasma der Zelle, so dass ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung mit Prokaryonten vermutet wird (Benz, 1994). Phylogenetische Studien von Porinen unterstützen die Endosymbiontentheorie, nach der sich Mitochondrien und Plastiden aus phagozytierten Bakterien entwickelten, die mit ihrer Wirtszelle endosymbiotische Wechselwirkungen eingingen (Bolter & Soll, 2001; Saccone *et al.*, 2003). Bei Gram-negativen Bakterien erfüllen Porine neben der Aufnahme nutritiver Substanzen bzw. der Abgabe von Stoffwechselmetaboliten häufig zahlreiche weitere Funktionen wie Vermittlung von Antibiotikaresistenz, Adhärenz an und Invasion in Wirtszellen sowie Adaptation an Milieubedingungen innerhalb und außerhalb des Wirtes, weshalb sie die Virulenzeigenschaften von manchen bakteriellen Krankheitserregern wesentlich beeinflussen (Achouak *et al.*, 2001).

Porine durchspannen die etwa 2,5 nm starke bakterielle äußere Membran und sind als integrale OMPs fast vollständig in die Membran eingebettet. Funktionell bilden die

klassischen Porine Homotrimeren, wohingegen andere Porine auch als Monomere vorliegen können. Allen Porinen sind gewisse strukturelle Merkmale gemeinsam. Die eigentlichen Poren haben einen Durchmesser von etwa 1 nm und werden durch mehrere Beta-Faltblatt-Stränge gebildet, die die Membran durchspannen und eine fassförmige Struktur bilden: das Beta-Faltblatt-Fass („beta-barrel“). Die Übergänge zwischen den Beta-Faltblatt-Strängen werden periplasmaseitig durch wenige Aminosäuren („short turns“) und auf der nach außen gerichteten Membranseite durch längere Peptidschleifen („long loops“) gebildet, die auch für die Funktion der verschiedenen Porine eine wichtige Rolle spielen. Die außen exponierten Peptidschleifen der Porine stabilisieren die Homotrimer-Ausbildung der klassischen Porine und führen bei einigen Porinen durch eine Verengung des Eintrittslumens zur Substratspezifität. Diese Peptide fungieren darüber hinaus als Rezeptoren für Colicine oder Bakteriophagen und sind aufgrund von antigenen Eigenschaften auch Angriffspunkt für die zelluläre wie auch humorale Erregerabwehr des Wirtes (Galdiero *et al.*, 1990; 1998a; 1998b; 1999; 2001; 2003; Secundino *et al.*, 2006). Dies erklärt die hohe Strukturvariabilität dieser Schleifen, wohingegen die Beta-Faltblatt-Strukturen, die Liganden-Bindungsstellen und auch die Ladungsverteilung im Lumen in der Regel hoch konserviert sind (Koebnik *et al.*, 2000).

2.2 Porine bei Salmonellen

Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft konnten im Genom des *Salmonella* Typhimurium (*S. Tm.*) Stammes LT2 etwa 150 Gene für integrale äußere-Membran-Proteine (OMPs) oder potentielle OMPs identifiziert werden (McClelland *et al.*, 2001). Davon werden 15 OMPs (FadL, LamB, OmpA, OmpC, OmpD, OmpF, OmpG, OmpN, OmpS1, OmpS2, OmpW, PhoE, ScrY, Stm2816 und Tsx) als Porine angesehen oder es wird aufgrund ihrer Struktur eine Porinfunktion gemutmaßt. Eine Übersicht über Proteine von *S. Typhimurium*, für die eine Porinfunktion bekannt ist oder vermutet wird gibt **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Übersicht über Porine und deren mutmaßliche Funktion bei *S. Typhimurium*

Porin		Strukturelle Charakteristika		Funktion
Klassifizierung	Name	Anzahl β -Faltblätter	Oligomerisierung	
klassische Porine	OmpC	16	Trimer	Substrattransport
	OmpF	16	Trimer	Substrattransport
	PhoE	16	Trimer	Substrat-, Phosphat-ionentransport
	OmpD	16	Trimer	Effluxsystem mit YddG für Methylviologen, Substrattransport
	OmpN	16	Trimer	k. A.
	OmpS1, OmpS2	16	Trimer	k. A.
langsame Porine	OmpA-Familie	8	Monomer bzw. Oligomer	Beteiligung an Zellintegrität, Zellwachstum, Konjugation, Rezeptor, Virulenz, Transport
substratspezifische Porine	LamB	18	Trimer	Kohlenhydrattransport
	ScrY	18	Trimer	Kohlenhydrattransport
	FadL	14	Monomer	Fettsäuretransport
	Tsx	12	k. A.	Nukleosidtransport
ohne Zuordnung	OmpW	8	k. A.	Substrattransport?, Rezeptor?
	OmpG	k. A.	Monomer	Oligosaccharidtransport?
	Stm2816	k. A.	k. A.	k. A.

Erläuterungen: k. A.: keine Angaben bzw. unbekannt

Klassische Porine

Klassische Porine können als einfache wassergefüllte Poren betrachtet werden, durch die ein unspezifischer Stoffaustausch kleiner hydrophiler Moleküle (Ausschlussgröße etwa 600 kDa) über Diffusion erfolgt (Koebnik *et al.*, 2000). Diese Art von Porinen besitzt typischer Weise 16 antiparallele Beta-Faltblatt-Stränge, die das Beta-Faltblatt-Fass bilden (Achouak *et al.*, 2001; Benz & Bauer, 1988; Koebnik *et al.*, 2000; Nikaido, 2003). Klassische Porine liegen in der Membran als Homotrimere vor, deren Stabilisierung durch die langen Peptidschleifen (insbesondere Peptidschleife 2, L2) sowie über hydrophobe und polare Interaktionen zwischen den Monomeren erfolgt (Nikaido, 2003). Darüber hinaus faltet sich die dritte der Peptidschleifen (L3) wieder zurück in das Lumen der Pore bis etwa auf halbe Höhe des Kanals und bildet dort eine Nadelöhr-artige Verengung („eyelet“), die an der Ausbildung eines transversen elektrostatischen Feldes beteiligt ist. Diese „eyelet“-Region hat maßgeblichen Einfluss auf die Ionenselektivität und die Membranpotential-abhängige Öffnungswahrscheinlichkeit der Pore („voltage gating“). Innerhalb des Genus *Salmonella* sind OmpC, OmpD, OmpF und PhoE die zahlenmäßig wichtigsten Porine und bilden klassische trimere Poren.

OmpC und **OmpF** sind sich strukturell hochgradig ähnlich. OmpF bildet im Vergleich zu OmpC eine etwas größere Pore und lässt eine geringfügige Kationenselektivität erkennen, während OmpC eher selektiv für Anionen ist (Phale *et al.*, 2001; Saint *et al.*, 1996; Schirmer & Phale, 1999). OmpC und OmpF sind Teile eines regulatorischen Systems zur Adaptation der Bakterienzelle an Milieus mit unterschiedlicher Osmolarität und werden in Abhängigkeit von der Umgebungsosmolarität und der Temperatur reziprok exprimiert (Nikaido, 2003; Wu *et al.*, 2006). Möglicherweise spielt dieser Mechanismus auch eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Salmonellen an ein Leben im Wirbeltierwirt. Hohe Osmolarität und hohe Temperaturen, wie sie im Wirtorganismus anzutreffen sind, führen zu einer gesteigerten Expression von OmpC. OmpF hingegen wird bei niedrigerer Temperatur und geringer Osmolarität verstärkt exprimiert, also unter Bedingungen, wie sie außerhalb des Wirtes in einem wässrigem Milieu anzutreffen sind (Nikaido, 2003). OmpC und OmpF sind beteiligt an der Aufnahme niedermolekularer hydrophiler Substrate (z. B. Peptide) und von Monosacchariden. Die Anwesenheit von Glukose im Umgebungsmilieu führt zu einer bis zu 20-fach erhöhten OmpF Expression (Achouak *et al.*, 2001). Bei Mangel an Kohlenstoffquellen ist das Wachstum direkt korreliert mit der OmpF-Expression. Oxidativer Stress, Salizylsäure und saure pH-Werte (unter pH 5,2) führen zu einer Hemmung der OmpF-Expression bei erhöhter OmpC-Expression. Die osmo- und pH-abhängige OmpF/OmpC-Expression wird über das Zwei-Komponentensystem OmpR/EnvZ reguliert und ist beeinflusst von der Art der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle (Thomas & Booth, 1992). Außerdem erfolgt eine posttranskriptionale Regulation in Abhängigkeit von der Temperatur über die kurzkettige antisense Ribonukleinsäure („small RNA“, sRNS) *micF* (Chen *et al.*, 2004; Delilhas, 1995). Beide Porine sind darüber hinaus in die Aufnahme von Beta-Laktam-Antibiotika involviert. Beispielsweise nimmt *E. coli* das Cephalosporin Cefepim über das Porin OmpF auf. Verändert man die

„eyelet“-Region durch gezielte Mutagenese, dann ist dieser Aufnahmeprozess inhibiert (Bredin *et al.*, 2003; Simonet *et al.*, 2000). In ähnlichem Sinne soll ein klinisches Isolat von *S. Tm.* nach Verlust des Porins OmpC eine erhöhte Resistenz gegen mehrere Cephalosporine aufgewiesen haben (Medeiros *et al.*, 1987). Der Verlust des Porins OmpF bei gleichzeitiger Expression der CMY-4 Beta-Laktamase führt bei *S. Wien* zu Resistenz gegen das Beta-Laktam-Antibiotikum Imipenem (Armand-Lefevre *et al.*, 2003).

Ein weiteres klassisches Porin, **PhoE** von *Salmonella* und *E. coli*, besitzt eine so hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu OmpF und OmpC, dass experimentell funktionsfähige gemischte Trimere erzeugt werden können (Gehring & Nikaido, 1989). PhoE wird unter Phosphatmangel induziert, da sein Gen Bestandteil des Phosphatregulons ist und es selbst der Aufnahme von Phosphationen dient (Tomassen & Lugtenberg, 1982). PhoE besitzt dementsprechend eine Kationenselektivität, die auf die Ladung des Lumens und der extrazellulär gerichteten Peptidschleifen zurückzuführen ist (Karshikoff *et al.*, 1994; Van Gelder *et al.*, 1997a; 1997b).

Das Porin **OmpD** von *Salmonella* ist ein Homolog zu NmpC von *E. coli* (86 % Identität zu OmpD von *S. Tm.* LT2) und besitzt eine ähnliche Leitfähigkeit wie OmpC/OmpF. Über die Ionenselektivität von OmpD ist noch nichts bekannt. Allerdings besitzt NmpC von *E. coli* in seinen funktionellen Domänen große strukturelle Ähnlichkeit zu PhoE und OmpF, was auf eine gewisse Kationenselektivität hindeutet (Nikaido, 2003). OmpD repräsentiert bei *S. Tm.* mit einem Massenanteil von etwa 50 % an allen exprimierten Porinen und einem Anteil von ca. 1 % an der Gesamtproteinmasse ein Hauptporin von Salmonellen (Santiviago *et al.*, 2002; 2003). Das obligatorische Vorkommen von OmpD innerhalb des Serovars *S. Tm.*, verbunden mit dem hohen Expressionsniveau und der guten Immunogenität machen OmpD zu einem interessanten Negativmarker für einen in der Entwicklung befindlichen DIVA-Schweineimpfstoff gegen dieses Serovar (Selke *et al.*, 2007). Die OmpD-Expression ist trotz der Strukturähnlichkeit zu OmpC und OmpF unabhängig von der Osmolarität und dem Zwei-Komponentensystem OmpR/EnvZ (Santiviago *et al.*, 2003). Die Inaktivierung von *ompD* führt zu einer Hypersensibilität des entsprechenden Bakteriums gegen Methylviologen, die wahrscheinlich auf einem aktiven Effluxmechanismus beruht, an dem der auf der Zytoplasmamembran lokalisierte Transporter YddG mitwirkt und wobei OmpD einen TolC-ähnlichen Kanal in der äußeren Membran bildet (Santiviago *et al.*, 2002; 2003). Darüber hinaus dient OmpD, nicht aber OmpC, der Adhärenz von *S. Tm.* an humane Epithelzellen und Makrophagen (Hara-Kaonga & Pistole, 2004). OmpD kommt interessanterweise nicht bei *S. Typhi* vor. Da OmpD bei anderen Salmonellen-Serovaren als Rezeptor für die Adhärenz an die Wirtszelle funktioniert, könnte das Fehlen von OmpD ein Grund für die strikte Wirtsspezifität auf menschliche Zellen sein (Santiviago *et al.*, 2001). Das für *S. Enteritidis* beschriebene Porin OmpE ist wahrscheinlich identisch mit OmpD (Chart *et al.*, 1993; Nikaido, 2003).

Neben den Hauptporinen existieren bei Salmonellen die den klassischen Porinen sehr ähnlichen Porine **OmpN**, **OmpS1** und **OmpS2**, die jedoch auf nur sehr niedrigem

Niveau exprimiert werden und daher auch als „stille Porine“ („quiescent porins“) bezeichnet werden. Dabei ist unklar, ob die Expression dieser Porine durch bislang nicht identifizierte Stimuli induziert werden kann. OmpN kommt auch bei *E. coli* vor und hat wahrscheinlich OmpC-ähnliche Kanaleigenschaften. Die Porine OmpS1 und OmpS2 besitzen untereinander Sequenzähnlichkeit und unterliegen der Transkriptionsregulation des OmpR/EnvZ Zwei-Komponentensystems, werden jedoch, anders als die Porine OmpC und OmpF, osmounabhängig exprimiert (Fernandez-Mora *et al.*, 2004; Rodriguez-Morales *et al.*, 2006). Eine negative Transkriptionsregulation des Gens *ompS1* erfolgt zudem über das Nukleoid-assoziierte Protein HN-S. Das Gen *ompS2* wird durch das Regulator-Protein LeuO positiv reguliert (Fernandez-Mora *et al.*, 2004; Flores-Valdez *et al.*, 2003; Oropeza *et al.*, 1999). Mutationen im OmpS1-Porin von *S. Tm.* führen zu herabgesetztem Schwärmverhalten und gestörter Biofilm-Bildung (Toguchi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). *S. Tm.*-Knockout-Mutanten für *ompS1*, *ompS2* und *leuO* sind im Mausinfektionsmodell gegenüber dem isogenen Wildtyp hochgradig attenuiert, zeigen aber keine Unterschiede im *in vitro*-Wachstum unter verschiedenen Milieubedingungen (Rodriguez-Morales *et al.*, 2006).

„Langsame“ Porine

Unter dem Begriff „langsame“ Porine versteht Nikaido (2003) Porine, die sich von den klassischen Porinen dadurch unterscheiden, dass sie (a) keine stabilen Oligomere bilden, (b) die Diffusion größerer Substrate, allerdings mit niedrigerer Durchflussrate ermöglichen und (c) das charakteristische Phänomen einer herabgesetzten Mobilität im SDS-Gel nach Erhitzung zeigen („Hitze-Modifizierbarkeit“). Vertreter der „langsamen“ Porine sind OmpA von *Salmonella* spp. und *E. coli* sowie OprF von *Pseudomonas* spp. Bei den Pseudomonaden stellt OprF das Hauptporin dar und übernimmt die Porinfunktion der klassischen Porine, die diesem Bakteriengenus fehlen. Pseudomonaden sind daher ein geeignetes Modell zur Aufklärung von Funktionen der „langsamen“ Porine. Die Diffusionsrate der „langsamen“ Porine ist verglichen mit den klassischen Porinen nur halb so groß. Das Fehlen klassischer Porine führt daher bei Pseudomonaden in Vergleich zu Bakterien mit klassischen Porinen, wie Salmonellen oder *E. coli*, zu einer um die Hälfte reduzierten Membranpermeabilität (Sugawara & Nikaido, 1992). Die Ausbildung von großen Poren wurde anhand der Diffusion von Raffinose (MG 505 kDa) durch OprF, die durch klassische Porine nicht möglich ist, bewiesen (Bellido *et al.*, 1992).

Das Paradoxon einer großen Pore mit niedriger Durchflussrate erklärt sich dadurch, dass sich „langsame“ Porine zu über 90 % in einem geschlossen-Zustand befinden („Majority“-Konformer) und nur zu einem geringen Prozentsatz als offene Pore vorliegen („Minority“-Konformer) (**Abbildung 1**). Der zugrunde liegende Öffnungsmechanismus beruht auf Konformationsänderungen, bei denen aus einem Zwei-Domänen-Protein mit geringer Porenaktivität eine großlumige Pore gebildet wird. Im Zustand des „Majority“-Konformers ist die Amino- (N-) terminale Membrandomäne als 8-strängiges Beta-Faltblatt-Fass in der äußeren Membran lokalisiert, während sich der Carboxyl- (C-) Terminus nicht an der Porenbildung beteiligt, sondern über ein Peptido-

glykan-bindendes Motiv eine Art Verankerung mit der Peptidoglykanschicht bewirkt. Die offenen „Minority“-Konformere bilden dagegen 16-strängige Beta-Faltblatt-Fässer und assoziieren zu losen Oligomeren. Jedes Porinmolekül bildet eine weitleumige Pore, die die Permeation auch größerer Substrate erlaubt (Arora *et al.*, 2000; Brinkman *et al.*, 2000; El Hamel *et al.*, 2000; Saint *et al.*, 1996).

Das „langsame“ Porin **OmpA** kommt in mehreren Isoformen vor und ist mit etwa 10^5 Molekülen pro Zelle eines der am stärksten exprimierten Porine von *Salmonella enterica* und *E. coli* (Koebnik *et al.*, 2000; Nikaido, 1996). Es konnte für das „Majority“-Konformer in 1 M KCl eine Leitfähigkeit von 50-80 pS und für das „Minority“-Konformer eine Leitfähigkeit von 260-320 pS ermittelt werden (Arora *et al.*, 2000). Die im „Minority“-Konformer gebildete Pore hat mit ca. 1 nm einen mit klassischen Porinen verbleichbaren Durchmesser (Sugawara & Nikaido, 1992). OmpA erfüllt Funktionen der Zellintegrität, bei der Konjugation, als Bakteriophagenrezeptor und beim Zellwachstum (Jeannin *et al.*, 2002). OmpA ist bei den Enterobacteriaceae weit verbreitet und induziert eine spezifische humorale und zytotoxische Immunantwort (Kurupati *et al.*, 2006). OmpA-defiziente *E. coli*-Stämme weisen eine abgeschwächte Virulenz, eine reduzierte Invasivität und eine verminderte Serumresistenz auf (Weiser & Gotschlich, 1991). Neben OmpA konnten anhand der bekannten Gensequenzen von Salmonellen vier weitere Proteine identifiziert werden, die OmpA-ähnliche Motive besitzen und daher mit OmpA als OmpA-Familie zusammengefasst werden. Dazu zählen das Peptidoglykan-assoziierte Adhäsionsprotein Pal, das Flagellen- und Motorprotein MotB und die mutmaßlichen OMPs SciP und YiaD mit unbekannter Funktion.

Das Porin **OmpG** wird wie OmpN, OmpS1 und OmpS2 auf sehr niedrigem Niveau exprimiert und ist möglicherweise ein stilles Porin. OmpG besitzt gewisse Merkmale von „langsamen“ Porinen, denn bisher konnte nur eine monomere Form nachgewiesen werden, die sehr große Poren bildet (Behlau *et al.*, 2001; Conlan *et al.*, 2000; Conlan & Bayley, 2003; Subbarao & van den Berg, 2006; Yildiz *et al.*, 2006). Das Gen *ompG* ist in einem Operon zusammen mit zehn weiteren Genen organisiert, deren Translationsprodukte eine Rolle beim Transport und der Verstoffwechslung von größeren Oligosacchariden spielen. Daher wird eine Aufnahme dieser Oligosaccharide durch OmpG angenommen (Fajardo *et al.*, 1998; Misra & Benson, 1989). Ob es sich tatsächlich um ein substratspezifisches Porin handelt, ist nicht untersucht. OmpG unterscheidet sich in Struktur und Eigenschaften jedoch deutlich von den bisher bekannten Porinen mit Substratspezifität (Nikaido, 2003).

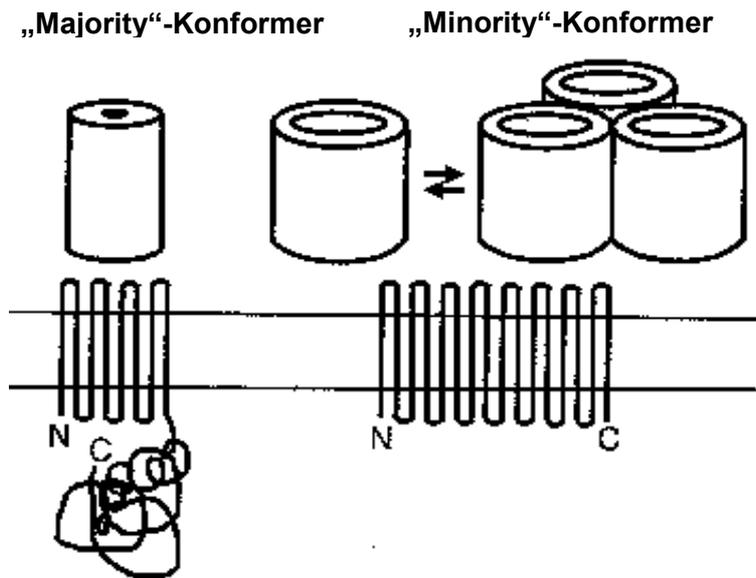


Abbildung 1: Zwei-Konformer Modell der „langsamen“ Porine aus der OmpA-OprF-Familie (Nikaido, 2001).

Das „langsame“ Porin liegt überwiegend im geschlossenen Zustand vor und bildet ein Zwei-Domänen-Protein, das mit der Peptidoglykanschicht interagiert und die äußere Membran stabilisiert („Majority“-Konformer). Im „Minority“-Konformer werden großlumige unspezifische Poren gebildet, die lose miteinander assoziieren und bei Pseudomonaden die klassischen Porine ersetzen.

Substratspezifische Diffusionsporen, Porine im weiteren Sinne

Nikaido (2003) schlägt vor, im Sinne der ursprünglichen Porindefinition nur Diffusionsporen ohne Substratspezifität als Porine zu bezeichnen. Dennoch werden Poren mit Substratspezifität von zahlreichen Autoren ebenfalls als Porine angesehen (Koebnik *et al.*, 2000; Saier, 2000a). Die Substratspezifität beruht auf der Anwesenheit von Liganden-Bindungsstellen oder auf morphologischen Eigenschaften wie Durchmesser, Form oder Ladung des Lumens. Der Transport erfolgt mittels Diffusion (Koebnik *et al.*, 2000). Salmonellen besitzen die substratspezifischen Porine LamB, ScrY, FadL und Tsx.

LamB ist der Prototyp eines substratspezifischen Porins und besteht aus 18 anti-parallelen Beta-Faltblatt-Strängen (Koebnik *et al.*, 2000). LamB und ScrY weisen eine etwa 25 %-ige Homologie in ihrer Aminosäurezusammensetzung auf und dienen beide der Aufnahme von Mono- und Oligosacchariden. LamB liegt funktionell als Trimer vor, wobei die Untereinheiten unabhängig voneinander eine Diffusion von Maltose und höhermolekularen Oligosacchariden erlauben (Death *et al.*, 1993; Kullman *et al.*, 2002; Luckey & Nikaido, 1980). Die Substratspezifität beruht auf sechs helikal angeordneten aromatischen Aminosäureresten ("fettige Rutsche"), welche die Substrat-Moleküle über Van-der-Waals'sche Kräfte binden und die Passage des Lumens ermöglichen (Dutzler *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997).

Die Substratspezifität und der Aufnahmemechanismus von **ScrY** ist dem von LamB ähnlich (Dumas *et al.*, 2000; Forst *et al.*, 1998; Jap & Walian, 1998; Nikaido, 2003). ScrY ermöglicht neben der Aufnahme von Sukrose auch die Aufnahme anderer Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose, Arabinose, Maltose, Laktose, Raffinose und Maltodextrinen (Andersen *et al.*, 1998; Hardesty *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1991; Schulein *et al.*, 1991). ScrY wird nicht von allen Salmonellen- und *E. coli*-Stämmen exprimiert, denn das Gen ist auf dem Plasmid pUR400 lokalisiert (Hardesty *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1988).

Bei dem Porin **FadL** handelt es sich um ein monomeres Porin mit 14 Beta-Faltblatt-Strängen (van den Berg *et al.*, 2004). Es besitzt eine Carboxylgruppen-vermittelte Substratspezifität für langkettige Fettsäuren, die als Kohlenstoffquelle verstoffwechselt werden können (Black *et al.*, 1987; Black, 1991). Möglicherweise können aber auch andere organische Verbindungen wie z. B. organische Säuren die Pore von FadL passieren (van den Berg *et al.*, 2004; van den Berg, 2005).

Tsx ist ein relativ kleines Porin (31,4 kDa). Es besteht aus 12 Beta-Faltblatt-Strängen und bildet einen schmalen Kanal, der die niedrigsten Leitfähigkeit (10 ± 4 pS) aller bekannten Porine aufweist (Benz & Bauer, 1988; Benz *et al.*, 1988; Hong *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 1988; Ye & van den Berg, 2004). Tsx wird in Anwesenheit von Nukleosiden hochreguliert, wobei die Repressor-Proteine DeoR und CytR an diesem Mechanismus beteiligt sind (Bremer *et al.*, 1990). Die aufgenommenen Nukleoside dienen der Synthese von Nukleinsäuren sowie als Kohlenhydrat- und Stickstoffquelle (Acimovic & Coe, 2002; Hantke, 1976; McKeown *et al.*, 1976). Es besteht eine Ko-Transkription mit dem auf der Zytoplasmamembran lokalisierten ImpX, das zusammen mit Tsx für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Nukleosidspiegels sorgt (Bucarey *et al.*, 2006). Das genetische Ausschalten von *tsx* führt zu Auxotrophie von *S. Typhi* für Adenosin und Thymidin (Bucarey *et al.*, 2005; Bucarey *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigt die *S. Typhi* Δ *tsx*-Mutante eine verminderte Überlebensfähigkeit in U937-Makrophagen-ähnlichen Zellen (Bucarey *et al.*, 2005). Das Expressionsverhältnis von Tsx zu dem nicht näher charakterisierten Protein PyrD hat Einfluss auf die Membranstabilität von *S. Typhi* (Bucarey *et al.*, 2005).

2.3 Das putative Porin OmpW

2.3.1 Lokalisation und Organisation von *ompW* im Genom

Das *ompW*-Gen von *Salmonella* (*S.*) spp. ist chromosomal kodiert und zwischen den Genen *tonB* und *trpA* lokalisiert (Centisom 38,2 des Chromosoms von *S. Tm.* LT2) (McClelland *et al.*, 2001). Bisherige bekannte Gensequenzen des *tonB-trpA* Genlokus von *S. Choleraesuis* (#NC_006905), *S. Paratyphi A* (#NC_006511), *S. Typhi* (#NC_003198) und *S. Tm.* (#NC_003197) weisen auf eine einheitliche Organisation innerhalb der Spezies *S. enterica* hin. In diesem Genlokus befinden sich zehn weitere Leserahmen, deren Translationsprodukte funktionell noch nicht vollständig charakterisiert wurden (**Tabelle 2**). Die das *ompW* unmittelbar flankierenden Leserahmen *katN* und *stm1733* scheinen nur bei Salmonellen vorzukommen, bei *E. coli* fehlen diese beiden Leserahmen (**Abbildung 2**). Für den stromabwärts von *ompW* gelegenen Leserahmen *katN* wurde eine polycistronische Transkription im Operon *yciGFEkatN* nachgewiesen. Terminationsstops liegen zwischen *yciG* und *yciF* und zwischen *katN* und *ompW*, so dass *ompW* unabhängig vom *yciGFEkatN*-Operon transkribiert wird (Robbe-Saule *et al.*, 2001). Auch Bauerfeind (1999) identifizierte 24 Nukleotide hinter dem Stopkodon von OmpW einen Faktor-unabhängigen Transkriptionsstop in Form einer palindromischen Sequenz, flankiert von je sechs Adenosin-Resten.

Das Translationsprodukt von *katN* ist eine Mangan-abhängige Katalase (Non-Haem-Katalase) mit geringer Aktivität (Robbe-Saule *et al.*, 2001), deren Expression offensichtlich durch Gallensäure induziert wird (Prouty *et al.*, 2004). Homologe, also in der Aminosäure-Sequenz und damit in ihrer Struktur ähnliche Katalasen (Enzyme mit Fähigkeit zur Degeneration reaktiver Sauerstoffverbindungen wie z. B. Wasserstoffperoxid) sind für andere Enterobacteriaceae wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* und *Serratia marcescens* beschrieben, ihre biologische Relevanz ist jedoch unklar (Robbe-Saule *et al.*, 2001). Eine homologe Katalase kommt innerhalb der Spezies *E. coli* nur bei den EHEC-Stämmen Sakai und EDL933 vor und fehlt bei K12- und anderen *E. coli*-Stämmen. Über die Organisation von *stm1733* und der anderen Gene oberhalb von *ompW* ist derzeit nichts bekannt, ein Promotor bzw. Terminationsstop ist für *stm1733* nicht beschrieben (**Tabelle 2**). Das Translationsprodukt von *stm1733* besitzt 84 %-ige Homologie zu dem 109 Aminosäuren großen Ferredoxin YkgJ von *E. coli* (**Tabelle 2**), welches ein mutmaßliches Elektronentransport-Protein darstellt und möglicherweise eine Rolle bei der Energietransduktion spielt (NCBI-Datenbank #AAC73391). Aufgrund der gegenläufigen Orientierung von *stm1733* und *ompW* erscheint eine gleichsinnige Regulation der Gene *yciABCstm1733* mit *ompW* unwahrscheinlich (**Abbildung 2**).

Tabelle 2: Leserahmen in der *tonB-trpA*-Region von *S. Tm* LT2 (NCBI-Datenbank #AE008777) und ihre mutmaßlichen Translationsprodukte

Gen		Translationsprodukt	
Name	Regulation	Homologie zu <i>E. coli</i> ¹⁾	Funktion
<i>tonB</i>	Promotor bekannt, Fur ²⁾ -Bindungsstelle	90 %	TonB-Protein, OMP-abhängige Eisen- und Vitamin B ₁₂ -Aufnahme-Systeme, Energie-Transducer, Phagen- und Colicin-Rezeptor
<i>yciA</i>	k. A.	96 %	Mutmaßliche Acetyl-CoA-Thioesterhydrolase
<i>yciB</i>	k. A.	97 %	Mutmaßliches intrazelluläres Septierungsprotein
<i>yciC</i>	k. A.	95 %	Mutmaßliches Protein der Zytoplasmamembran
<i>stm1733</i>	k. A.	84 %	Mutmaßliches Ferredoxin
<i>ompW</i>	BaeSR (evtl. Fur, RpoS, RpoE, ToxR, Dam) ³⁾	92 %	OMP, Colicin S4-Rezeptor, mutmaßliches Porin
<i>katN</i>	Operon <i>yciGFEkatN</i> ⁴⁾	k. A.	Non-Haem-Katalase, Galle induziert
<i>yciE</i>	Operon <i>yciGFEkatN</i>	94 %	Mutmaßliches zytoplasmatisches Protein, Hitzeschockprotein, Homolog zu <i>yciF</i> , NaCl-induziert ⁵⁾
<i>yciF</i>	Operon <i>yciGFEkatN</i>	94 %	Mutmaßliches zytoplasmatisches Protein, Hitzeschockprotein, Homolog zu <i>yciE</i> , NaCl-induziert ⁵⁾
<i>yciG</i>	Operon <i>yciGFEkatN</i> , RpoS ⁴⁾ , Fur ⁶⁾	98 %	Mutmaßliches zytoplasmatisches Stressprotein, pH-induziert
<i>trpA</i>	Operon <i>trpABCD</i>	94 %	Alpha-Kette der Tryptophansynthase

Erläuterungen:

- 1) ähnliche und identische Aminosäuren zu *E. coli* K12 (NCBI-Blast vom 17.11.2006);
- 2) Fur = ferric uptake regulator, 144 Aminosäuren;
- 3) Regulation bei OmpW-Homologen (siehe Text);
- 4) mRNS für *yciG*, *yciGF* und *yciGFEkatN* (Robbe-Saule *et al.*, 2001);
- 5) Induktion unter osmotischem Stress bei aereoben und anaeroben Bedingungen (Weber *et al.*, 2006);
- 6) negative, Fur-abhängige Regulation (Bjarnason *et al.*, 2003).

k. A.: keine Angaben zu homologem Protein bei *E. coli* K12

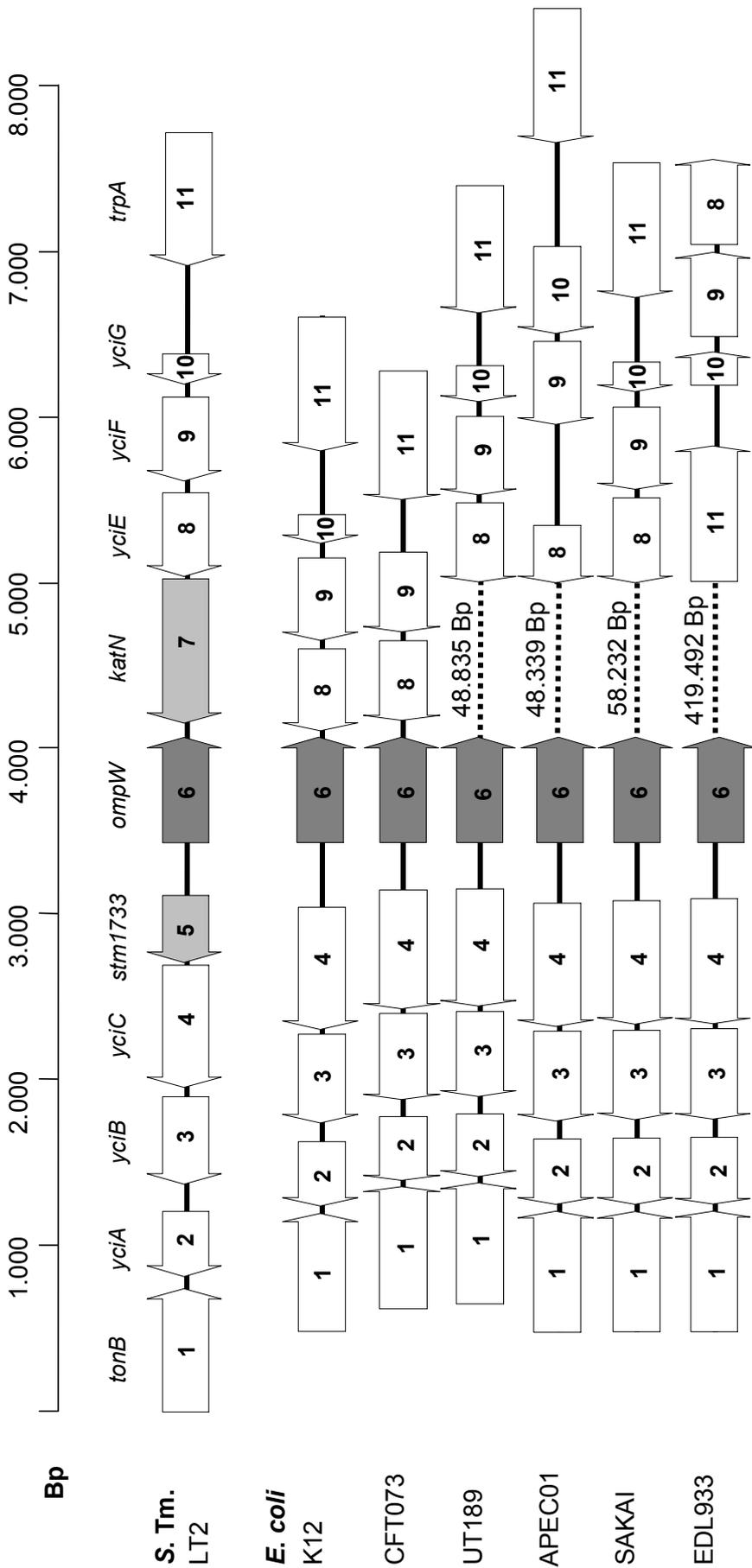


Abbildung 2: Genetische Karten der *tonB-trpA*-Regionen von *S. Tm. LT2* und *E. coli*-Stämmen in der Gegenüberstellung Sequenzen aus NCBI-Datenbank: #NC_000913 (K12), #AE014075 (CFT073), #NC_007946 (UT189), #CP000468 (APEC01), #NC_002695 (SAKAI), #NC_002655 (EDL933).

Bp, Basenpaare;
 Homologe Leserahmen sind durch identische Zahlen gekennzeichnet.

Im Gegensatz zum Genlokus von *S. enterica* weist die *tonB-trpA*-Region von *E. coli* eine große Heterogenität auf (**Abbildung 2**). Ursache hierfür ist eine Integrationsstelle für Bakteriophagen unmittelbar stromabwärts von *yciD* (*ompW*-Homolog) im intergenischen Bereich zwischen *yciD* und *yciE*. Die *E. coli* O157:H7-Stämme EDL933 und Sakai weisen inkomplette Sequenzen aus den Bakteriophagen Lambda CP-9330 (bei EDL933) und Sp9 (bei Sakai) auf (Batisson *et al.*, 2003). Im Falle des Sakai-Stammes ist ein DNS-Abschnitt mit einer Größe von 58,2 kBp und bei dem Stamm EDL933 ist ein Abschnitt mit 103,1 kBp Bestandteil dieser mutmaßlich defekten Prophagen (Ohnishi *et al.*, 2001). Auf den inserierten Inseln ist unter anderem der Virulenzfaktor Paa kodiert, der sich bei diesen EHEC-Stämmen in den frühen Stadien der Adhärenz an Darmepithelzellen sowie, zusammen mit dem LEE-Lokus (Locus of Enterocyte Effacement), an der Ausbildung von A/E-Läsionen (Attaching and Effacement) des Darmepithels beteiligt. Eine Integration im intergenischen Bereich *yciD-yciE* konnte bei *paa*-positiven-Stämmen bei 9/14 (64 %) der EPEC (enteropathogene E. coli) von Schweinen, 2/7 (29 %) der REPEC (Rabbit EPEC) und 3/4 (75 %) der EHEC (enterohämorrhagische E. coli) humanen Ursprungs nachgewiesen werden (Batisson *et al.*, 2003). Neben Paa konnten zwei weitere EPEC-Virulenzfaktoren auf den inserierten Prophagen identifiziert werden, nämlich das EPEC-spezifische Chaperon TrcA, das im Zuge der Darmkolonisation an der Formation von Mikrokolonien beteiligt ist, und das OMP Lom, welches die Überlebensfähigkeit in Makrophagen vermittelt (Barondess & Beckwith, 1990; Tobe *et al.*, 1999). Dies sind Indizien dafür, dass bei *E. coli*-Stämmen möglicherweise in direkter Nachbarschaft zum *OmpW*-Gen eine neuartige Pathogenitätsinsel entsteht (Batisson *et al.*, 2003).

Bei *Vibrio (V.) cholerae* liegt das *ompW*-Gen auf dem kleineren der zwei Chromosomen (Chromosom II), welches hauptsächlich Gene für metabolische Stoffwechselprozesse und regulatorische Elemente kodiert (Heidelberg *et al.*, 2000; Schoolnik & Yildiz, 2000). Die Gene auf dem Chromosom II dienen vor allem der Adaptation an nährstoff- und milieubedingten Stress sowohl innerhalb als auch außerhalb des Wirtes (Schoolnik & Yildiz, 2000; Xu *et al.*, 2003). Zahlreiche offene Leserahmen stromauf- und stromabwärts von *ompW* kodieren für Translationsprodukte mit mutmaßlicher Beteiligung an der Aufnahme und Verstoffwechslung nutritiver Substanzen (Nandi *et al.*, 2005). Für *ompW* bei *V. cholerae* konnte sowohl eine Shine-Dalgarno-Sequenz als auch ein Terminationsstop nachgewiesen werden. Mutmaßliche Promotorsequenzen wurden ebenfalls identifiziert. Die -35-Region des Promotors weicht stark von der Promotor-Konsensussequenz aus *E. coli* ab (Abweichung in 3 von 6 Nukleotiden) und die -10-Region zeigt zwei von der Optimalsequenz (4 Nukleotide) abweichende Nukleotide, was beides auf einen eher schwachen Promotor hindeutet (Jalajakumari & Manning, 1990). Eine korrespondierende Sequenz für die -35-Region des Promotors findet sich für *ompW* bei *Salmonella* nicht, wohingegen sich eine mögliche -10-Region des Promotors (5'-TATAAC-3') neun Nukleotide vor der Ribosomen-Bindungsstelle befindet und sich nur in einem Nukleotid von der Konsensus-Sequenz aus *E. coli* unterscheidet.

Das 612 bp große *omp21*-Gen von *Comamonas (C.) acidovorans* kodiert für ein OmpW-homologes Protein mit einer 50 %-igen Ähnlichkeit zu OmpW von *S. Tm.* Stamm LT2. Das *omp21*-Gen besitzt, wie *ompW* von *Salmonella* sp., eine Shine-Dalgarno-Sequenz. Die Transkription resultiert in einem Transkript von 857 Nukleotiden, so dass für *omp21* eine monozistronische mRNA angenommen werden muss. Eine stark palindromische Nukleotid-Sequenz mit typischen Merkmalen eines Faktor-unabhängigen Transkriptionsstops wurde zwischen Position 915 und 966 identifiziert. Aufgrund der Größe der mRNA liegt der Promotor innerhalb des *NcoI*-Restriktionsfragmentes, konnte aber anhand von Homologie-Studien an *E. coli*-Promotoren noch nicht identifiziert werden (Baldermann *et al.*, 1998; Baldermann & Engelhardt, 2000).

Bei den Pseudomonaden gibt es die *ompW*-homologen Gene *oprG*, *alkL*, *doxH* und *nahE*. Das 699 bp große *oprG* von *Pseudomonas (Ps.)* spp. ist chromosomal kodiert, über die Organisation im Genort ist jedoch nichts bekannt (van Beilen *et al.*, 1992). Das Translationsprodukt OprG besitzt eine Homologie von etwa 60 % zu OmpW von *S. Tm.* LT2. Die Translationsprodukte der *ompW*-homologen Gene *alkL*, *doxH* und *nahE* besitzen lediglich eine 43-44 %-ige Homologie zu OmpW und sind beteiligt an der Verstoffwechslung niedermolekularer organischer Verbindungen. Die Gene *doxH* und *nahE* kodieren für Varianten desselben Proteins und sind Bestandteile von Stoffwechselwegen für die aromatischen Verbindungen Naphthalin (*nah*-Gene) und Dibenzothiophen (*dox*-Gene) (Denome *et al.*, 1993; Eaton, 1994; Ferrero *et al.*, 2002; Selifonov *et al.*, 1991; Takizawa *et al.*, 1999; Yen & Gunsalus, 1985; Yen & Serdar, 1988). Das *nahE*-Gen ist plasmidkodiert (NAH7-Plasmid) und in dem Operon *nahABCDEF* organisiert (Yen & Gunsalus, 1985). Das Gen *doxH* hingegen ist chromosomal kodiert und scheint nicht zusammen mit dem Operon *doxABCDEFG* transkribiert zu werden, möglicherweise aber mit den stromabwärts gelegenen Genen *doxI* und/oder *doxJ* (Denome *et al.*, 1993). Das Gen des OmpW-Homologs AlkL ist auf dem OCT-Plasmid von *Ps. oleovorans* in dem 4.592 bp umfassenden Operon *alkBFGHJKL* kodiert, welches Gene beherbergt, deren Translationsprodukte eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Alkanen spielen (van Beilen *et al.*, 1992). Das gleichzeitige Vorhandensein von mehreren homologen Genen und deren Lokalisation auf Plasmiden spricht für den horizontalen Transfer dieser Gene unter den Pseudomonaden (Ferrero *et al.*, 2002).

2.3.2 Struktur und Aufbau des Proteins OmpW

Detaillierte Strukturanalysen liegen derzeit zu Omp21 von *C. acidovorans* und OmpW bei *E. coli* vor und bestätigen für OmpW typische Strukturmerkmale von äußeren-Membran-Proteinen bzw. Porinen (Albrecht *et al.*, 2006; Baldermann *et al.*, 1998; Baldermann & Engelhardt, 2000; Hong *et al.*, 2006).

Omp21 von *Comamonas acidovorans*. Erste computergestützte Strukturanalysen erfolgten bei Omp21 von *C. acidovorans* (50 % ähnliche Aminosäuren zu OmpW von *S. Tm.* LT2). Omp21 wurde als Mitglied einer neuen Familie von OMPs identifiziert,

deren Charakteristikum acht gegenläufige transmembranäre Beta-Faltblatt-Stränge darstellen. Sie bilden die für Porine typischen Beta-Faltblatt-Fässer (Baldermann *et al.*, 1998). Die Beta-Faltblatt-Stränge werden bei OmpW von *Comamonas* sp. und OmpW-homologen Proteinen anderer Bakterien durch aromatische Aminosäuren flankiert und enden mit Phenylalanin-Resten. Es ist bekannt, dass Phenylalanin-Reste im C-terminalen Bereich des PhoE-Porins essentiell für die korrekte Faltung sind (de Cock *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 2000). Daher haben die konservierten Phenylalanin-Reste möglicherweise auch Einfluss auf die Faltung von Omp21 von *C. acidovorans* (Baldermann *et al.*, 1998). Sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus von Omp21 sind im Periplasma lokalisiert. Die Aminosäure-Sequenzen der Beta-Faltblatt-Strukturen besitzen an ihren hydrophilen Positionen einen auffällig hohen Anteil an Glycin-Resten, was möglicherweise von funktioneller Bedeutung ist. Die nach extrazellulär gerichteten Peptidschleifen („long loops“) sind zwar bei den OmpW-homologen Proteinen sehr verschieden, allerdings scheinen die Länge der Peptidschleife zwischen Beta-Faltblatt-Strang 6 und 7 und der Tyrosin-Rest im Beta-Faltblatt-Strang 6 konserviert zu sein, so dass Baldermann *et al.* (1998) eine funktionelle Bedeutung dieser Bereiche vermuten. Omp21 besitzt als Monomer eine Länge von etwa 5,3 nm, was etwa 1 nm größer ist als die Dicke der Lipidmembran inklusive ihrer Kopfdomänen. Das Länge-zu-Breite Verhältnis des Moleküls beträgt auf der extrazellulären Seite etwa 3:2 und auf der periplasmatischen Seite ca. 1:1 in der monomeren Form. Omp21 besitzt eine intrinsische Aktivität zur Ausbildung von Dimeren oder Oligomeren mit einer hohen Stabilität. Die Dimerbildung beruht weder auf Wasserstoffbrückenbindungen noch auf Disulfidbrücken, sondern auf einer echten Protein-Protein-Interaktion, was auch auf eine mögliche Dimerisation von Omp21 *in vivo* hinweisen könnte (Baldermann & Engelhardt, 2000). Für Omp21 konnte kein durchgängiges Lumen im Sinne einer Pore nachgewiesen werden. Das Protein besitzt auf der extrazellulären Seite eine anfärbbare Vertiefung mit etwa 1,7 nm Durchmesser und einer Tiefe von ca. 1,5 nm. Sie wird begrenzt von den dicht miteinander assoziierten Peptidschleifen L1-L3 einerseits und der weit hervorragenden, isoliert lokalisierten Peptidschleife L4 andererseits. Auf der periplasmatischen Seite von Omp21 befindet sich eine Rinne, die zwischen den „short turns“ im 90 °-Winkel zur Achse der Vertiefung verläuft, so dass der zentrale, nicht durchgängige Bereich eine Stärke von etwa 1,3 nm besitzt (Baldermann & Engelhardt, 2000). Kanalaktivitäten für Omp21 konnten nicht gemessen werden (Baldermann *et al.*, 1998; Baldermann & Engelhardt, 2000). Besitzt Omp21 von *C. acidovorans* dennoch ein durchgängiges Lumen, so ist es möglicherweise deutlich schmaler als 1 nm und im Ruhezustand überwiegend geschlossen (Baldermann & Engelhardt, 2000).

OmpW von *Escherichia coli*. Neueste kristallografische Analysen bestätigten im wesentlichen die Struktur, wie sie bereits für Omp21 von *C. acidovorans* ermittelt wurde (Albrecht *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2006). Die Strukturanalyse zeigte außerdem, dass sich OmpW, die Membrandomäne von OmpA (*E. coli*) und das Protein NspA (*Neisseria* sp.) in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur sowie der Massenverteilung ähnlich sind (Hong *et al.*, 2006). Es konnten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander

ein durchgängiges Lumen bei OmpW nachweisen, welches an der schmalsten Stelle, in der Mitte des Moleküles, durch lediglich einen einzigen Tryptophan-Rest (W155) verschlossen wird (Albrecht *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2006). Ein möglicher Pforten-Mechanismus mit dem Leucin-Rest (L56) wird vermutet (**Abbildung 3**). Erstmals konnte für OmpW über Einzelkanal-Ableitungen auch eine geringe Kanalaktivität bestätigt werden, die sich durch verschiedene Substanzen wie z. B. Arabinose oder das Detergenz LDAO (N-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid) zumindest teilweise blocken ließ (Hong *et al.*, 2006). Eine weitere Besonderheit ist, dass 40 von den insgesamt 62 ins Lumen gerichteten Aminosäureresten hydrophob sind, so dass das Lumen insgesamt eine hydrophobe Auskleidung besitzt. Hydrophobizität ist für Porine sehr untypisch und bislang nur für die Adhäsionsproteine NspA und PagP von *Neisseria* spp. beschrieben worden (Kapitel 2.3.6.2 und 2.3.6.3). Insgesamt ist der von der mutmaßlichen Pforte nach extrazellulär gerichtete Teil des Lumens deutlich hydrophober als der auf der periplasmatischen Seite und besitzt eine hoch affine Bindungstasche für das Detergenz LDAO. Diese Hydrophobizität der Bindungstasche wird durch acht Aminosäurereste definiert und ist bei allen OmpW-Homologa sowie der AlkL-Familie von Pseudomonaden anzutreffen, so dass eine funktionelle Bedeutung vermutet werden kann (Hong *et al.*, 2006). Des Weiteren befindet sich unmittelbar an der mutmaßlichen Tryptophan-Pforte eine laterale Öffnung in der Fass-Struktur von OmpW in Form einer Diskontinuität der Beta-Faltblatt-Stränge 3 und 4, welche durch drei Prolin-Reste (P60, P80, P81) stabilisiert wird. Auf der periplasmatischen Seite der vermuteten Pforte ist das Lumen hydrophiler ausgeprägt und es wurde eine potentielle Bindungstasche für Glycerol identifiziert. Physiologische Liganden sind wahrscheinlich Arabinose und/oder andere Pentosen. Die Aminosäurereste dieses polaren periplasmatischen Vorhofs sind bei den OmpW-Homologa von anderen Bakterien allerdings wenig konserviert (Hong *et al.*, 2006).

OmpW von *Salmonella enterica*. OmpW von *S. enterica* hat auf Aminosäureebene eine etwa 90 %-ige Ähnlichkeit mit OmpW bei *E. coli* (**Tabelle 3**). Die Kristallisation von OmpW bei *E. coli* bestätigte im wesentlichen die computergestützte Strukturvorhersage für OmpW bei *S. enterica* (Bauerfeind, 1999). Die für *E. coli* vorhergesagten Strukturelemente sind auch innerhalb der bisher bekannten OmpW-Aminosäure-Sequenzen von Salmonellen zu finden und scheinen hoch konserviert zu sein.

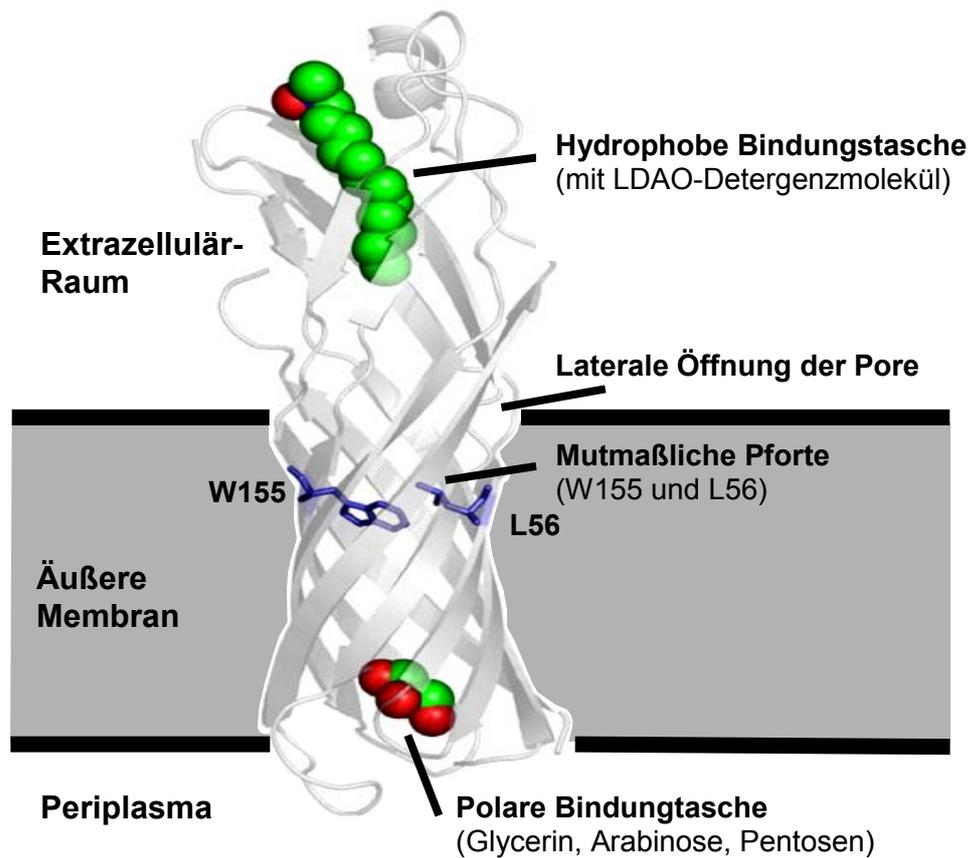


Abbildung 3: Mutmaßliche Struktur von OmpW bei *E. coli* und seine Topographie in der äußeren Membran (nach Hong et al., 2006)

L56: Leucin an Position 56; **W155:** Tryptophan an Position 155.

2.3.3 OmpW-Homologa bei Salmonellen und anderen Bakterien

In der Familie der durch acht-strängige Beta-Faltblatt-Fässer gekennzeichneten Proteine finden sich neben OmpW auch Virulenz-assoziierte Proteine wie OmpX und Tia von *E. coli* (Fleckenstein et al., 1996; Mammarappallil & Elsinghorst, 2000; Meccas et al., 1995; Vogt & Schulz, 1999), die Opazitätsproteine (Opa, OpaA, OpaC, Opa1) und die Adhäsionsproteine NspA und PagP von *Neisseria* spp. (Ahn et al., 2004; Hwang et al., 2002; Hwang et al., 2004; Vandeputte-Rutten et al., 2003), Rck, PagC und PagP von *S. Tm.* (Ahn et al., 2004; Cirillo et al., 1996; Heffernan et al., 1992; Hwang et al., 2002; Hwang et al., 2004; Pulkkinen & Miller, 1991), Ail von *Yersina enterocolitica* (Miller & Falkow, 1988; Miller et al., 1989; Miller et al., 1990; Miller et al., 2001) sowie die Hauptmembranproteine OmpA von *Salmonella* spp. bzw. *E. coli* sowie OprF von *Ps. aeruginosa* (Kapitel 2.2). OmpA und OprF gehören zu den „langsamen“ Porinen und sind bislang die einzigen der acht-strängigen Beta-Faltblatt-Fass-Proteine, für die neben der Vermittlung von Adhärenz- und Invasionseigenschaften auch eine Porinfunktion nachgewiesen ist.

Mittlerweile ist eine größere Anzahl von Proteinen bei Bakterien bekannt, die in ähnlicher Weise wie OmpW eine acht-strängige Beta-Faltblatt-Fass-Struktur besitzen. OmpW-homologe Sequenzen sind derzeit für 130 Spezies aus 69 Genera der Gram-negativen Bakterien beschrieben (Stand: 10.11.2006). Die Genera mit enger phylogenetischer Verwandtschaft weisen dabei eine große Homologie in der Aminosäure-Sequenz zu OmpW von *S. Tm.* LT2 auf. Eine Übersicht von Bakteriengenera und -spezies mit über 50 %-iger Ähnlichkeit in der OmpW-Aminosäure-Sequenz gibt **Tabelle 3**.

Tabelle 3: Übersicht über OmpW-Homologa mit hoher Ähnlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung zu OmpW von *S. Tm.* LT2¹⁾
(NCBI-Datenbankrecherche, Stand: 30.11.2006)

Bakterien mit OmpW-Homologie		Protein		
Genus	Anzahl Spezies [n]	Name	Homologie ¹⁾ [%]	Datenbank-Einträge [n]
<i>Salmonella</i> sp.	1	OmpW	99-98	3
<i>Escherichia</i> sp.	1	OmpW, YciD	92-89	21
<i>Shigella</i> spp.	2	OmpW	92-89	10
<i>Yersinia</i> spp.	6	OmpW	76-73	13
<i>Erwinia</i> sp.	1	OmpW	73	1
<i>Serratia</i> sp.	1	OmpW	70	1
<i>Photorhabdus</i> sp.	1	OmpW	68	1
<i>Photobacterium</i> sp.	2	OmpW	68-64	2
<i>Vibrio</i> spp.	4	OmpW	67-62	13
<i>Shewanella</i> spp.	6	OmpW	67-61	13
<i>Aeromonas</i> sp.	1	OmpW	62	1
<i>Mannheimia</i> spp.	2	OmpW	61	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	5	OprG	62-53	10
<i>Actinobacillus</i> spp.	2	OmpW	61-56	2
<i>Haemophilus</i> spp.	2	OmpW	60-58	2
<i>Marinomonas</i> sp.	1	OmpW	60	1
<i>Alteromonas</i> sp.	1	OmpW	60	1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1	OmpW	60-57	2
<i>Bordetella</i> spp.	4	Omp	60-58	4
<i>Oceanobacter</i> sp.	1	OprG	54	1
<i>Rhizobium</i> sp.	1	Y4mB	51	1
<i>Comamonas</i> sp.	1	Omp21	50	1
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	AlkL	44	1
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	DoxH	44-43	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	NahE, PaQ	44-43	2

Erläuterungen: 1) mehr als 50 % identische und ähnliche Aminosäuren zu *S. Tm.* LT2 (#AE008777); Omp21, AlkL, DoxH, NahE und PaQ wurden ergänzend gelistet, aufgrund ihrer Bedeutung in der Literatur.

2.3.4 Regulation der Expression von OmpW

Bei verschiedenen Bakteriengenera wurde eine komplexe Regulation von OmpW-homologen Proteinen nachgewiesen. OmpW von *E. coli* unterliegt einer negativen Regulation durch die alternativen Sigmafaktoren RpoS und RpoE (Guillier & Gottesman, 2006; Lacour & Landini, 2004; Patten *et al.*, 2004) und möglicherweise einer Regulation durch die Desoxyadenosin-Methyltransferase (Dam) (Oshima *et al.*, 2002). Bei *S. enterica* konnte eine Regulation von *ompW* durch BaeR gezeigt werden (Hu *et al.*, 2005), bei *ompW* von *Vibrio* spp. durch ToxR (Bina *et al.*, 2003). Bei beiden Membranproteinen handelt es sich um Regulatorproteine komplexer Regulons zur Adaptation an veränderte Milieubedingungen. Des Weiteren ist bei verschiedenen Bakteriengenera eine Abhängigkeit der OmpW Expression von dem Regulatorprotein Fur gezeigt worden, also von der Eisenionen-Verfügbarkeit (Kapitel 2.3.6).

RpoS. Die RpoS-Einheit der DNS-abhängigen RNS-Polymerase kontrolliert die Transkription von Genen in der stationären Wachstumsphase von Bakterien, in Nährstoffmangelsituationen und bei zellulärem Stress. Positiv reguliert werden durch RpoS bei *E. coli* K12 ca. 50 Gene, die vornehmlich für Virulenzproteine, Aufnahmesysteme für nutritive Substanzen oder für Enzyme in metabolischen Stoffwechselwegen kodieren (Fang *et al.*, 1992; Patten *et al.*, 2004). Etwa die gleiche Anzahl von Genen unterliegt negativer Regulation. Es handelt sich hierbei um Gene der Flagellensynthese, des Zitratzyklus und um Prophagen-kodierte Gene. Genomweite Mikroarray-Analysen bei in der stationären Wachstumsphase befindlichen *E. coli* K-12 zeigten eine hochgradige Abregulation von OmpW durch RpoS. Von allen negativ regulierten Genen, war *ompW* mit einer um mehr als den Faktor 50 reduzierten Transkription am stärksten RpoS-abhängig (Patten *et al.*, 2004). Eine RpoS-abhängige Regulation konnte bei *Salmonella* spp. darüber hinaus für das stromabwärts gelegene Gen *katN* (Kapitel 2.3.1) bewiesen werden, das für die Non-Haem-Katalase KatN kodiert (Robbe-Saule *et al.*, 2001). Die Hochregulation der Transkription von *katN* erfolgt unter Stressbedingungen (oxidativer Stress, Gallensäure) und ist Wachstumsphasen-abhängig (Prouty *et al.*, 2004; Robbe-Saule *et al.*, 2001). Das Gen *katN* wird also unter ähnlichen Bedingungen stärker transkribiert wie *ompW*.

RpoE. Die Regulation von Hitzeschockgenen erfolgt hauptsächlich über die zwei Regulons der alternativen Sigmafaktoren RpoH und RpoE. Dabei ist die Stressantwort im zytoplasmatischen Kompartiment über RpoH reguliert, während RpoE die Zellwand-assoziierte Stressantwort steuert. Die Aktivierung von RpoE unter Stressbedingungen kann unter anderem durch die Akkumulation unvollständig synthetisierter oder gefalteter Membranproteine in der Bakterienzelle erfolgen und zieht unter anderem die Herunterregulation der weiteren OMP-Synthese nach sich (Rhodius *et al.*, 2006). Ein wichtiges Signal für die RpoE-Aktivierung ist die periplasmatische Akkumulation an ungefalteten C-Termini von nicht Membran-integrierten OMPs im Zuge der Stressantwort (Johansen *et al.*, 2006). Eine Beeinflussung der OmpW-Expression im Sinne einer Hochregulation ist für zahlreiche physikalische Parameter beschrieben, so dass

eine Beteiligung von OmpW an der Umstrukturierung der äußeren Membran im Zuge der bakteriellen Stressantwort angenommen wird. Eine gesteigerte Expression kann in erhöhter Umgebungstemperatur bei Omp21 von *Comamonas* sp. (Baldermann *et al.*, 1998), bei OmpW von *V. cholerae* (Nandi *et al.*, 2005) sowie OprG von *Ps. aeruginosa* (Hancock *et al.*, 1990) beobachtet werden. Ein saures Umgebungsmilieu führt zu gesteigerter OmpW-Expression von *E. coli* (Sainz *et al.*, 2005) und *V. cholerae* (Nandi *et al.*, 2005). Auch ein alkalischer pH nach Supplementierung mit Natriumhydroxid und eine Behandlung mit Tri-Natriumphosphat (zerstörende Wirkung auf die äußere Membran) stimulieren die OmpW-Expression in *S. Enteritidis* (Sampathkumar *et al.*, 2004). Ist weniger Sauerstoff verfügbar, dann bilden *Comamonas* sp. (Baldermann *et al.*, 1998) und *E. coli* (Jordi *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2002) mehr OmpW. Diese Reaktion wird aber wahrscheinlich nicht von RpoE sondern von Dam reguliert (siehe unten). Eine moderate Hochregulation (bis Faktor 1,8) von OmpW konnte bei dem ExPEC-Stamm CP9 nach acht- bzw. 20-stündigem Wachstum in einem entzündlichen Milieu, das heisst in Wundflüssigkeit mit Infiltraten von Lymphozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie Monozyten, festgestellt werden (Motley *et al.*, 2004). Neben der Antwort auf äußere Noxen ist auch die Steuerung von Umbauprozessen der äußeren Membran beim Eintritt des Bakteriums in die stationäre Phase ist RpoE gesteuert. Das RpoE-Regulon ist somit maßgeblich für die Zellwandintegrität verantwortlich (Guillier & Gottesman, 2006; Johansen *et al.*, 2006). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die zwei kurzkettigen Ribonukleinsäuren („small RNA“, sRNS) MicA und RybB unter Kontrolle von RpoE stehen und gemeinsam mit dem RNS-Chaperon Hfq die äußeren-Membran-Proteine OmpA, OmpC und OmpW auf mRNA-Ebene herunterregulieren. OmpW und OmpC werden über die transiente Induktion von RybB negativ reguliert (Johansen *et al.*, 2006). Dabei fungiert RybB offensichtlich als antisense-RNS (80 Nukleotide) und bindet, getriggert durch das Hfq-Chaperon, an das 5'-Ende der *ompW*-mRNA. Die Herunterregulation erfolgt also zeitlich nach der Transkription, indem es die Ribosomenbindungsstelle auf der mRNA maskiert. RybB bezeichnet man deshalb auch als „Riboregulator“. Die Regulation von OMPs durch sRNS wurde erstmals für MicF bei OmpF beschrieben (Mizuno *et al.*, 1984). Mittlerweile sind aber zahlreiche sRNS bekannt, die regulatorisch auf die OMP-Expression einwirken (Guillier & Gottesman, 2006). Das genetische Ausschalten des *rybB*-Gens bei *E. coli* führt zu einer erhöhten Expression von OmpW und OmpC (Johansen *et al.*, 2006). RybB ist hoch konserviert und wurde bereits außer bei *E. coli* auch bei *Salmonella* spp., *Erwinia* spp., *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Serratia marcescens* und bei *Yersinia pestis* nachgewiesen (Guillier & Gottesman, 2006). Darüber hinaus vermutet man, dass es einen weiteren Regulationsmechanismus der *ompW*-Translation gibt, denn die OmpW-Expression wird unabhängig von RybB und Hfq herunterreguliert, wenn die Bakterienkultur in die stationäre Phase der Keimvermehrung eintritt (Johansen *et al.*, 2006). RybB reguliert im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus auch die Aktivität des Sigmafaktors RpoE herunter. Unklar ist, ob es sich um einen direkten Effekt von RybB oder einen indirekten Effekt, z. B. über das herunterregulierte OmpW bzw. OmpC, handelt (Guillier & Gottesman, 2006).

BaeR. BaeR von *S. Tm.* ist Bestandteil des Zwei-Komponentensystems BaeSR (Nagasawa *et al.*, 1993). BaeS fungiert als Sensor-Kinase der Zytoplasmamembran von *Salmonella*, wobei ihre periplasmatische Domäne Stresssignale der äußeren Membran detektiert. Eine Aktivierung von BaeS erfolgt durch verschiedene Signale wie z. B. missgefaltete Membranproteine, hohe Temperaturen, hohe pH-Werte, Ethanol oder toxische Verbindungen (Button *et al.*, 2006). BaeS fungiert als Histidin-Kinase und aktiviert nach Autophosphorylierung den zytoplasmatischen Antwort-Regulator BaeR. BaeR besitzt membranbindende Domänen und dient als Transkriptionsaktivator (Raffa & Raivio, 2002). Die Überexpression von BaeR aktiviert auf diesem Weg unter anderem auch Multidrug- (MDR)- Transportergene wie zum Beispiel *mdtABCD* und *acrD*, was phänotypisch mit erhöhter Widerstandskraft gegen Beta-Laktam-Antibiotika und Novobiocin sowie gegen Detergentien wie Gallensalze, SDS und Desoxycholat einher geht (Baranova & Nikaido, 2002; Hirakawa *et al.*, 2003a; Hirakawa *et al.*, 2003b; Hirakawa *et al.*, 2005; Nishino *et al.*, 2005). Darüber hinaus reguliert BaeR unter anderem Gene, deren Translationsprodukte an Funktionen des Maltosetransportes, der Chemotaxis, der Flagellensynthese und der Signaltransduktion beteiligt sind (Nishino *et al.*, 2005; Raffa & Raivio, 2002). Auch die Expression von OmpW und des putativen OMPs Stm3031 (Ail/OmpX-Homolog) unterliegen der transkriptionellen Regulation durch BaeR, wobei der Mechanismus im Detail noch unklar ist (Hu *et al.*, 2005). Das genetische Ausschalten des *baeR*-Genes bei *S. Tm.* führt zu einer Hochregulation der OmpW-Expression bei gleichzeitiger Herunterregulation der Stm3031-Expression und verändert das Resistenzverhalten gegenüber einigen Antibiotika. Eine erhöhte Sensibilität zeigte die *baeR*-Knockout-Mutante gegenüber Erythromycin, Novobiocin und Nalixidinsäure. Der Phänotyp des Wildtypstammes war über ein Plasmid rekonstituierbar. Resistenter wurde die Knockout-Mutante nur gegen das Cephalosporin Ceftriaxon (MHK = 51 µg/ml). Der Wildtypstamm und der komplementierte Stamm, welche in der 2D-Gelelektrophorese kaum detektierbare OmpW-Expressionslevel zeigten, waren dagegen hochgradig sensibel gegen Ceftriaxon (MHK ≥ 205 µg/ml) (Hu *et al.*, 2005).

ToxR. Bei *V. cholerae* werden zahlreiche Stoffwechselwege, Stressantworten auf veränderte Milieubedingungen und Virulenzfaktoren wie z. B. Cholera-toxin (CT) und Toxin-koregulierten Pilus (TCP) durch die Transkriptionsregulatorgene *toxRS*, *toxT* und *tcpPH* reguliert (Faruque *et al.*, 1998). Das Ausschalten der *toxRS*- und *tcpPH*-Regulatorgene verursacht ähnliche Alterationen in den Transkriptomen, so dass eine Ko-Regulation von ToxRS, TcpPH und ToxT angenommen wird (Bina *et al.*, 2003). Das genetische Ausschalten der *tcpPH*-Regulatorgene resultiert in einer modulierten Expression von 58 Genen und das Ausschalten des *toxR*-Regulators moduliert die Expression von 154 Genen, darunter *ompW*. Das alleinige Ausschalten von *tcpPH* hat die Herunterregulation von den drei Porinen VC0972, OmpT und OmpW sowie von sechs Enzymen im Glycerin-Metabolismus zur Folge. Bei der *V. cholerae*Δ*toxR*-Mutante sind OmpT und OmpW etwa um den Faktor 20 herunterreguliert, während OmpU entsprechend hochreguliert ist (Bina *et al.*, 2003). Das innere-Membran-Protein ToxR reguliert die Transkription der von ihm abhängigen Gene indem der zytoplasma-

tische Anteil des Proteins an deren Promotoren bindet. Eine derartige Wirkung von ToxR konnte für die Gene des Cholera-toxins (*ctx*), die Gene von OmpT und OmpU sowie das Gen des Transkriptionsregulators ToxT gezeigt werden (Higgins, 1992). Das Ausschalten des *toxR*-Gens in *V. cholerae* hemmte die Glukose-abhängige Herunterregulation der OmpW-Expression. Dies könnte darauf hindeuten, dass ToxR die Expression von OmpW in Abhängigkeit von der Glukoseverfügbarkeit steuert (Nandi *et al.*, 2005).

Fur. Bei dem Gram-negativen Bakterium *Shewanella oneidensis* erfolgt die Regulation von *ompW* über den Regulator Fur in Abhängigkeit von der Eisenionenverfügbarkeit (Thompson *et al.*, 2002). Die hergestellte *fur*-Knockout-Mutante wies im Gegensatz zum Wildtyp eine mehr als dreifach erhöhte Expression von 14 Genen auf. Acht dieser Gene kodieren für Proteine mit Funktionen in der Aufnahme und Verstoffwechslung von Eisenverbindungen. Mikroarraydaten zeigten, dass die relative Expression von *ompW* in der *fur*-Knockout-Mutante um das Sechsfache erhöht war und dass drei weitere äußere-Membran-Proteine, welche Bestandteile von Eisenaufnahmesystemen darstellen, *fur*-abhängig hochreguliert wurden. Eine genetische Inaktivierung von *fur* führte zu einer konstitutiven Expression von OmpW. Eine 19 bp umfassende *fur*-Bindungsstelle (*fur*-Box) wurde 103 bp vor dem Translationsstart von *ompW* identifiziert, die zu 47 % der *fur*-Box von *E. coli* ähnelt (Thompson *et al.*, 2002). Das Gen *tonB* ist der nächstgelegene Leserahmen mit derselben Orientierung und unterliegt ebenfalls einer *fur*-abhängigen Transkription. Das TonB-Protein bildet mit den sogenannten „TonB-abhängigen OMPs“ ButB, FecA, FepA, FhuA, FhuE, Fiu und Cir membrandurchspannende Eisen- und Vitamin B12-Aufnahmesysteme (del Rio *et al.*, 2005; Koebnik, 2005; Nikaido, 2003; Wiener, 2005). Eine direkte TonB-Abhängigkeit von OmpW wurde bislang nicht beschrieben, wenngleich eine Eisenabhängigkeit der OmpW-Expression aufgrund einer Fur-Regulation bei zahlreichen Bakterienspezies vermutet wird (Kapitel 2.3.6).

Dam. Die Desoxyadenosin-Methyltransferase (Dam) methyliert Adenosin-Reste in 5'-CATC-3'-Motiven und ist wichtig für die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse (Lobner-Olesen *et al.*, 2005; Marinus, 2000). Nach genetischem Ausschalten von *dam* bei *E. coli* werden Gene für Proteine der Atmungskette, Stressproteine sowie Proteine für den Metabolismus von Aminosäuren und Nukleotiden hochreguliert, wobei Gene mit Einfluss auf die anaerobe Atmung, die Chemotaxis, die Flagellen-Synthese und die Motilität herunterreguliert werden (Oshima *et al.*, 2002). Möglicherweise beruht die Regulation durch Dam auf einer Methylierung der Promotorsequenzen für die universellen Regulatorproteine Fnr (Fumaratnitrat-Reduktor) und CRP (katabolisches Aktivator-Protein). Der Regulation durch Dam unterliegen bei *E. coli* Gene von insgesamt 19 Zellwandproteinen, darunter neben den Flagellar- und Chemotaxisproteinen auch OmpA, OmpW und OmpX. Oberhalb von *ompW* wurden im intergenischen Bereich (500 bp) drei putative 5'-CATC-3'-Methylierungsmotive identifiziert (Oshima *et al.*, 2002).

2.3.5 Lokalisation von OmpW in der Bakterienzelle

Das OmpW von *Vibrio* sp. wurde bereits bei seiner Erstbeschreibung aufgrund seiner Signalsequenz und mehrerer Transmembrandomänen als mögliches OMP identifiziert. Darüber hinaus ist die Bildung OmpW-spezifischer Antikörper nach Infektionen mit *V. cholerae* (Jalajakumari & Manning, 1990), *K. pneumoniae* (Kurupati *et al.*, 2006), *S. Tm.* und *S. Gallinarum* nachgewiesen (Bauerfeind, 1999), was auf eine *in vivo*-Exposition von OmpW gegenüber dem Immunsystem hindeutet. OmpW von *E. coli* fungiert darüber hinaus als Colicin-S4-Rezeptor, ein weiteres Indiz für die Oberflächenlokalisation (Jordi *et al.*, 2001; Pilsel *et al.*, 1999). In Präparationen der äußeren Membran von Salmonellen kann OmpW mittels SDS-PAGE sichtbar gemacht und über N-terminale Ansequenzierung bzw. MALDI-TOF-Analysen identifiziert werden. Nachweise von OmpW in OMP-Präparationen liegen für *S. Tm.* SL1344 (O'Connor *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1996), ATCC19585 (Bauerfeind, 1999) und R200 (Hu *et al.*, 2005) vor. Bei verschiedenen *E. coli*-Stämmen wurde OmpW ebenfalls in OMP-Präparationen nachgewiesen (Lai *et al.*, 2004; Molloy *et al.*, 1998; Pilsel *et al.*, 1999; Sainz *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Zur präzisen Lokalisation von OmpW wurden elektrophoretische und massenspektrometrische Analysen von OMPs aus kleinen sphärischen Kugelzell- („mini cells“) und langen stabförmigen Zell-Varianten („rod cells“) von zellteilungsdefizienten *E. coli* X-1488-Klonen durchgeführt (Lai *et al.*, 2004; Meagher *et al.*, 1977). Hierbei dienten die OMPs der Minizellvarianten als Modell für polar lokalisierte OMPs und die Stabzellvarianten als Modell für die lateralen Bereiche der äußeren Membran. Es konnte eine erhöhte OmpW-Expression (etwa Faktor 1,5) in den Minizellvarianten nachgewiesen werden, also eine vermehrte polare Expression. Zur Überprüfung wurde Carboxy-terminal Haemagglutinin- (HA-) fusioniertes rekombinantes OmpW in *E. coli* DH5 α überexprimiert und dann zur Überprüfung der Lokalisation mittels Immunfluoreszenz (anti-HA-IgG) sichtbar gemacht. Den Ergebnissen zu Folge stellt OmpW von *E. coli* ein primär polar lokalisiertes Protein dar (Lai *et al.*, 2004). Inwieweit dieses Modell die Wirklichkeit widerspiegelt, bleibt jedoch fraglich, denn bei korrekter Faltung von OmpW ist der C-Terminus nach dem derzeitigen Kenntnisstand eigentlich periplasmatisch lokalisiert und dürfte für die immunologische Detektion nicht zugänglich sein (Hong *et al.*, 2006).

OmpW stellt aber nicht nur einen integralen Bestandteil der äußeren Membran dar, denn bei *E. coli* (Gophna *et al.*, 2004; Horstman *et al.*, 2004; Soderblom *et al.*, 2005; Wai *et al.*, 2003) und *Xanthomonas campestris* (50 % ähnliche Aminosäuren) ist auch ein nicht Zellwand-assoziiertes Vorkommen von OmpW festgestellt worden (Watt *et al.*, 2005; Watt *et al.*, 2006). OMPs als integrale Bestandteile der äußeren Membran werden von Bakterien über Vesikel (Outer Membrane Vesicle; OMV) ins extrazelluläre Kompartiment abgegeben. Das Vorkommen in gelöster, nicht Membran-assoziiierter Form, wie man es für OmpA nachgewiesen hat, rührt wahrscheinlich von degradierten OMVs her (Gophna *et al.*, 2004). Für *E. coli* K12 konnte die Vesikel-assoziierte Exkretion der Porine OmpA, OmpF und OmpW sowie bei einigen Stämmen die Vesikelexkretion des enterobakteriellen Cytotoxins ClyA nachgewiesen werden (Wai *et*

al., 2003). Bei dem ExPEC- (Extraintestinal pathogenen E. coli-) Stamm 789 gehörten die drei OMPs OmpA, OmpC und OmpW zu den am stärksten sezernierten Proteinen. Dabei war die Sekretion von OmpW deutlich Wachstumsphasen-abhängig und bei Kulturen in der stationären Wachstumsphase deutlich stärker als in der exponentiellen Wachstumsphase (Gophna *et al.*, 2004). Auch bei dem Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* konnte OmpW aus dem zellfreien Überstand von Flüssigkulturen gewonnen werden und gehörte neben dem OMP MopB und der zytosolischen Superoxiddismutase SodM zu den am stärksten vertretenen Proteinen des extrazellulären Proteoms (Watt *et al.*, 2005).

Der Nachweis der Membranlokalisation von OmpW bei Vertretern der Gattung *Vibrio* spp. ist für *V. alginolyticus* (Xu *et al.*, 2005), *V. cholerae* (Das *et al.*, 1998; Nandi *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 1998) und *V. parahaemolyticus* (Xu *et al.*, 2004) durch Sichtbarmachung in der SDS-PAGE erbracht. Interessanterweise existiert bei non-O1/nonO-139-Stämmen von *V. cholerae* eine autoagglutinierende Fimbrie, die sich sowohl morphologisch als auch antigenetisch vom Toxin-koregulierten Pilus (TCP) und anderen Fimbrien unterscheidet (Sengupta *et al.*, 1998). Diese Fimbrie setzt sich aus identischen 20 kDa großen Untereinheiten zusammen, welche nach dem Ergebnis der aminoterminalen Sequenzierung zu 100 % mit der Aminosäure-Sequenz von OmpW von *V. cholerae* (22 kDa) übereinstimmte. Möglicherweise stellt OmpW nicht bei allen *V. cholerae*-O-Gruppen einen integralen Bestandteil der äußeren Membran dar, sondern ist Strukturelement dieser Fimbrien (Sengupta *et al.*, 1998). Omp21 von *C. acidovorans* (Baldermann *et al.*, 1998), das Haupt-OMP OprG von *Pseudomonas aeruginosa* (Gensberg *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2005), OmpW von *Aeromonas hydrophila* (Jeanteur *et al.*, 1992), *Klebsiella pneumoniae* (Kurupati *et al.*, 2006), *Pasteurella multocida* (Boyce *et al.*, 2006) und *Photobacterium damsela* (Wu *et al.*, 2006) wurden über SDS-PAGE mit angeschlossenen MALDI-TOF- und Aminosäure-Sequenz-Analysen ebenfalls in OMP-angereicherten Präparationen nachgewiesen. Für alle weiteren OmpW-homologen Proteine ist eine Membranlokalisation noch nicht näher untersucht.

2.3.6 Milieuabhängige Expression und mögliche Funktionen von OmpW und seinen Strukturhomologa

2.3.6.1 Eigenschaften als Pore oder Bestandteil eines Transportsystems

Liposomenschwelungstests bzw. Einzelkanalableitungen lieferten bisher keine Hinweise auf eine Porenaktivität von Omp21 in *C. acidovorans* und OmpW von *V. cholerae* (Baldermann *et al.*, 1998; Nandi *et al.*, 2005). Dies erinnerte sehr an die zunächst vergeblichen Versuche bei den „langsamen“ Porinen OmpA und OprF Kanaleigenschaften nachzuweisen, weshalb zunächst gemutmaßt wurde, dass OmpW ausschließlich die Funktion der Membranstabilisierung erfüllt (Bond *et al.*, 2002; Nestorovich *et al.*, 2006; Pautsch & Schulz, 1998; Sugawara *et al.*, 1996; 2006). Erstmals gelang es dann Hong *et al.* (2006), für das OmpW von *E. coli* eine geringe Leit-

fähigkeit anhand von rekonstituiertem OmpW in planaren Lipidmembranen und in C₈E₄-Micellen nachzuweisen. Die Leitfähigkeit betrug in 1 M KCl-Lösung und bei einer angelegten Spannung von 140 mV etwa 19 ± 8 pS. Unter gleichen Bedingungen zeigte OmpA eine Leitfähigkeit von etwa 60-70 pS und der Nukleosidtransporter Tsx etwa 10 ± 4 pS (Hong *et al.*, 2006). Mit der messbaren Aktivität von OmpW als Pore stellte sich nun die Frage nach physiologischen Liganden bzw. Substraten. Für OmpW bei *E. coli* hatte die Zugabe von Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 135 mM ($\approx 1,2$ %) keinen Effekt auf die Kanalaktivität, jedoch führte die Zugabe von 20 μ M Arabinose zu einer Hemmung, da die „Offenwahrscheinlichkeit“ von ca. 33 % auf 9 % abnahm. Die Zugabe des Detergenz LDAO (5 μ M) hemmte die Kanalaktivität von OmpW sehr effektiv, was an einer auf 0,4 % verminderten „Offenwahrscheinlichkeit“ abzulesen ist (Hong *et al.*, 2006). Aus den bislang erfolgten Studien zur milieubedingten Expression von OmpW lassen sich somit Hinweise auf physiologische Liganden und Substrate erhalten. Als potentielle Kandidaten kommen hauptsächlich anorganische Salze sowie kleinere hydrophobe organische Verbindungen in Frage (Hong *et al.*, 2006).

Anorganische Salze. Für OmpW bei *S. Tm.* konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass bei steigendem Gehalt an Eisen-II- oder Eisen-III-Ionen im Medium die Menge an OmpW in der äußeren Membran zunahm (Bauerfeind, 1999). Auch bei OmpW von *E. coli* (McHugh *et al.*, 2003) und *Pasteurella (P.) multocida* (Boyce *et al.*, 2006; Paustian *et al.*, 2001; 2002a) sowie OprG von *Pseudomonas* spp. (Hancock *et al.*, 1990) kam es zu einer gesteigerten Expression bei hoher Eisenverfügbarkeit. Bei OmpW von *P. multocida* war die gesteigerte Expression unabhängig davon, ob es sich um eine anorganische oder organische Eisenquelle (Hämoglobin, Transferrin, Ferritin, Eisenzitat) handelte (Paustian *et al.*, 2002a). Im Gegensatz zu OmpW von *E. coli* und *P. multocida* führte eine gute Eisenverfügbarkeit bei *Shewanella oneidensis* zu einer Herunterregulation der OmpW-Expression (Thompson *et al.*, 2002).

In Medien mit erhöhten Konzentrationen von NaCl konnte für *V. cholerae* eine Reduktion der Expression von OmpW beobachtet werden (Nandi *et al.*, 2005). Interessanterweise exprimierten *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus*, zwei Spezies mit Anpassung an marine Lebensbedingungen, OmpW stärker bei hohen NaCl-Konzentrationen im Umgebungsmilieu (Xu *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005). Ebenfalls eine erhöhte OmpW-Expression bei erhöhter Salinität zeigt das mit *Vibrio* eng verwandte Fisch-Pathogen *Photobacterium damsela* (Wu *et al.*, 2006). Bei diesen drei an marine Milieubedingungen adaptierten Bakterienspezies konnte für OmpW und OmpV eine reziproke Expression in Abhängigkeit vom osmotischen Stress beobachtet werden, so dass OmpW und OmpV ein analoges System zu OmpC und OmpF in *E. coli* darstellen könnten (Wu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005).

Nutritive organische Verbindungen. In *E. coli* wurde eine Induktion der OmpW-Expression durch Darm-Mucus auf die eingeschränkte Verfügbarkeit nutritiver Substanzen zurückgeführt (Chang *et al.*, 2004). Thorne und Corwin (1975) identifizierten bei *E. coli* im Genlokus *trp-tonB* ein Gen, dessen Translationsprodukt

maßgeblich an der Aufnahme der aromatischen Aminosäure Tryptophan beteiligt ist. Die Vermutung, dass es sich hierbei um OmpW handelt, hat sich nicht bestätigt (PilsI *et al.*, 1999). Bei *C. acidovorans* hatte die Supplementierung mit Aminosäuren und verschiedenen Kohlenstoffverbindungen keinen Einfluss auf die Omp21-Expression (Baldermann *et al.*, 1998). Bei *C. testosteroni* ist ein OmpW-Homolog (ca. 50 % ähnliche Aminosäuren zu *S. Tm. LT2*) an der Aufnahme und Verstoffwechslung von aromatischen Kohlenhydraten wie Alkylbenzen und Biphenyl beteiligt (Kim, 2004). Für OprG weist Hancock (1990) auf eine gesteigerte Expression von OprG unter dem Einfluss bestimmter Kohlenstoffverbindungen hin, ohne diese näher zu bezeichnen. Für verschiedene nutritive organische Verbindungen konnte eine Beeinflussung der OmpW-Expression von *V. cholerae* gezeigt werden (Nandi *et al.*, 2005). Supplementierte Saccharide wie Glukose, Mannose, Fruktose und Maltose inhibierten die Expression von OmpW, wogegen die Zugabe von Arabinose und Galaktose keinen Einfluss auf die OmpW-Expression hatte (Nandi *et al.*, 2005). Wurde Glutamat für *V. cholerae* als alleinige verfügbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung gestellt, reagierte das Bakterium mit einer verstärkten OmpW-Expression, die sich durch Zusatz von Glukose inhibieren ließ (Nandi *et al.*, 2005). Die vermutete Aufnahme von nutritiven organischen Verbindungen durch eine von OmpW gebildete Pore konnte allerdings bislang nicht bewiesen werden (Nandi *et al.*, 2005). Drei verschiedene *V. cholerae*-Wildtyp-Stämme und deren isogene *ompW*-Knockout-Mutanten unterschieden sich beim paarweisen Vergleich hinsichtlich ihrer Vermehrungskinetiken *in vitro* nicht voneinander (Nandi *et al.*, 2005).

Die Strukturähnlichkeit von OmpW mit AlkL bzw. NahE/DoxH von *Pseudomonas* spp. (44 % ähnliche Aminosäuren zu *S. Tm. LT2*) ließ vermuten, dass OmpW ein Transporter für kleinere organische Moleküle ist wie z. B. die zyklische Verbindung Dibenzothiophen oder die Substanzgruppe der Alkane (Eaton, 1994; van Beilen *et al.*, 1992). Obwohl AlkL von *Pseudomonas* spp. offensichtlich bei der Aufnahme von Alkanen wie Oktan beteiligt ist, sind eine Vielzahl von Gram-negativen Bakterien jedoch nicht in der Lage, Alkane metabolisch zu degradieren, weshalb OmpW kein allgemeiner Transporter für Alkane sein kann (Hong *et al.*, 2006; van Beilen *et al.*, 1992). Darüber hinaus zeigten *alkL*-Knockout-Mutanten bei ihrem Wachstum mit Oktan als einziger Kohlenstoffquelle keinen Unterschied zum *Pseudomonas*-Wildtypstamm (Hong *et al.*, 2006; van Beilen *et al.*, 1992). Weitere funktionelle Studien zu den Proteinen der AlkL-Familie liegen nicht vor.

Toxische organische Verbindungen. Die Möglichkeit von Porinen, als Pore für die Aufnahme von nutritiven Substanzen zu fungieren, schließt eine mögliche Beteiligung als Membrankomponente eines energieabhängigen Efflux-Systems zur Beseitigung von toxischen organischen Verbindungen und Stoffwechselmetaboliten aus der Bakterienzelle ein (Nikaido, 2003; Zgurskaya & Nikaido, 2000). Für das Hauptporin OmpD von *Salmonella* ist eine funktionelle Assoziation mit dem innere Membran-Transporter YddG bei der Elimination von Methylviologen bewiesen (Santiviago *et al.*, 2002). Methylviologen ist eine quaternäre Ammoniumverbindung, die zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite in der Bakterienzelle und somit zu oxidativem Stress

führt. Methylviologen-Sensitivitätstests wurden daher auch eingesetzt, um in bakteriologischen Kulturmedien das oxidative Milieu innerhalb von Makrophagen zu simulieren (Buchmeier *et al.*, 1997). Die Elimination des toxischen Methylviologen aus der Bakterienzelle erfolgt durch mehrere aktive Efflux-Mechanismen (Baranova & Nikaido, 2002; Hirakawa *et al.*, 2005; Nagakubo *et al.*, 2002; Santiviago *et al.*, 2001; Santiviago *et al.*, 2002; Santiviago *et al.*, 2003). Dabei unterliegt die Expression des MdtABCD-Efflux-Systems der Regulation durch das Zwei-Komponentensystem BaeSR (Baranova & Nikaido, 2002; Nagakubo *et al.*, 2002). Es wurde die nicht näher untersuchte Hypothese geäußert, das OmpW von *S. Tm.* zusammen mit dem Major-Porin OmpD für den effektiven Efflux von Methylviologen und Benzylviologen notwendig sein könnte (Saier, 2006; Santiviago *et al.*, 2003). Die Identifikation von möglichen Komponenten eines OmpW-basierten Effluxsystems war bislang nicht erfolgreich. Die Beteiligung von OmpW an dem Efflux-Mechanismus für Beta-Laktam-Antibiotika durch den Multidrug-Resistance (MDR)-Transporter QacC, für den bislang keine OMP-Komponente identifiziert werden konnte, besteht offensichtlich nicht (Fuentes *et al.*, 2005).

Chemotherapeutika. Bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien geht eine veränderte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika mit einer veränderten OmpW-Expression einher (Hu *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass OmpW und die OmpW-Strukturhomologa direkt oder indirekt mit dem Transport dieser Substanzen zu tun haben. An einer *baeR*-Knockout-Mutante von *S. Tm.* konnte eine Veränderung der Chemosensibilität im Vergleich zu ihrem Wildtypstamm beobachtet werden (Kapitel 2.3.4). Der *baeR*-Knockout-Stamm exprimiert OmpW stärker und das OMP Stm3031 (Ail-/OmpX-Homolog) schwächer, was sich phänotypisch in einer vierfach erhöhten Sensibilität gegen das Cephalosporin Ceftriaxon bei gleichzeitig gesteigerter Unempfindlichkeit gegen Tetrazyklin, Erythromycin, Novobiocin und Nalixidinsäure äußerte (Hu *et al.*, 2005). Zwei weitere getestete Cephalosporine hatten keine verminderte Wirksamkeit gegenüber der *baeR*-Knockout-Mutante, so dass offensichtlich kein genereller OmpW-vermittelter Resistenzmechanismus gegenüber allen Cephalosporinen vorliegt (Hu *et al.*, 2005). In einer anderen Studie exprimierten *E. coli*-Stämme mit erhöhter Widerstandsfähigkeit gegen Tetrazyklin bzw. Ampicillin im Vergleich zum sensiblen Ursprungsstamm vermehrt OmpW (Faktor 4 bzw. 2,57) (Xu *et al.*, 2006). Eine vergleichbare Untersuchung wurde über das OmpW-homologe OprG von *Ps. aeruginosa* durchgeführt (**Tabelle 3**). Bei *Ps. aeruginosa* war die erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Ampicillin nicht mit einer veränderten OprG-Expression verbunden, während die Resistenz gegen Tetrazyklin von einer reduzierten OprG-Expression begleitet war. Eine stärkere OprG-Expression lag dagegen bei Kanamycin-resistenten Stämmen vor. Neben OprG/OmpW wiesen auch andere OMPs (u. a. TolC, MexA, YhiU) von *Ps. aeruginosa* im Vergleich zu homologen Proteinen von *E. coli* Unterschiede in ihrer Expression unter Einfluss von Chemotherapeutika auf. Dies könnte auf die unterschiedliche Adaptation von *E. coli* und *Ps. aeruginosa* an Chemotherapeutika-bedingten Stress bzw. auf eine möglicherweise unterschiedliche Funktion von OprG bzw. OmpW in diesen Bakterien hindeuten (Peng *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte

an einem klinischen *Ps. aeruginosa*-Isolat beobachtet werden, dass aufgrund einer herabgesetzten Membranpermeabilität eine Resistenz gegenüber Quinolonen, Chloramphenicol, Tetracyklinen und Beta-Laktamen bestand. Ursächlich hierfür war der Verlust eines 40 kDa OMPs und die drastische Herunterregulation von OprG (Chamberland *et al.*, 1989).

2.3.6.2 Bedeutung von OmpW für die Stabilisierung der äußeren Membran

Bereits auf struktureller und regulatorischer Ebene gibt es Hinweise für eine Beteiligung von OmpW an der Stabilisierung der äußeren Membran (Kapitel 2.3.2 und 2.3.4). Das OMP PagP (Lipid A-Palmitoyltransferase) von *Neisseria* spp. besitzt wie OmpW neben der für Porine untypischen hydrophoben Bindungstasche eine laterale Diskontinuität im Beta-Faltblatt-Fass, die mutmaßlich eine Öffnung zur äußeren Schicht der äußeren Membran für den Austausch von Fettsäuren darstellt (Hwang *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2004; Vandeputte-Rutten *et al.*, 2003). PagP ermöglicht damit den Fettsäuretransport bei der Lipopolysaccharidsynthese der äußeren Membran und spielt eine Rolle bei Umstrukturierungsprozessen der äußeren Membran (Hong *et al.*, 2006). Eine ähnliche Funktion ist aufgrund struktureller Verwandtschaft auch für OmpW denkbar. Darüber hinaus konnte bei der Präparation von Omp21 aus *C. acidovorans* eine innige Verbindung mit dem Lipopolysaccharid (LPS) festgestellt werden, so dass hier eine Interaktion von Omp21 mit dem LPS zu vermuten ist, die zur physiologischen Membranstabilisierung dienen könnte (Baldermann *et al.*, 1998).

OmpW und zahlreiche seiner Homologa zeigen das Phänomen der Hitze-Modifizierbarkeit, wie man es auch von OmpA kennt. Das heißt, in Abhängigkeit von der Erhitzung der Protein-Probe vor der Analyse wandert es bei der SDS-PAGE unterschiedlich weit und täuscht deshalb unterschiedliche Molekülgrößen vor (Baldermann *et al.*, 1998; Baldermann & Engelhardt, 2000; Hancock & Carey, 1979; Nandi *et al.*, 2005; Pilsel *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1996). Dieses Phänomen beruht auf der unvollständigen Denaturierung dieser Proteine, da sie innig mit Peptidoglykan- oder LPS-Bestandteilen verbunden sind (Cloekaert *et al.*, 1996; Vizcaino *et al.*, 1996). Es gibt einige Anhaltspunkte, dass die Hitze-Modifizierbarkeit von OmpW auf einer Interaktion mit LPS und nicht mit Peptidoglykan beruht. So konnte, wenngleich OmpW eine große strukturelle Ähnlichkeit mit der Membrandomäne von OmpA aufweist, bislang keine Peptidoglykan-Bindungsdomäne identifiziert werden (Baldermann *et al.*, 1998; Bond *et al.*, 2002; Bond *et al.*, 2006; Pautsch & Schulz, 1998; Pautsch *et al.*, 1999; Pautsch & Schulz, 2000). Die Hitze-Modifizierbarkeit von Omp21 (*C. acidovorans*) scheint dagegen auf einer engen Interaktion mit LPS zu beruhen, denn spektroskopische FTIR-Analysen (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie) bestätigten, dass trotz der Aufreinigung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie ein hoher LPS-Gehalt in Omp21-Präparationen vorhanden ist (Baldermann *et al.*, 1998). Bei OmpW von *Vibrio* spp. ist eine feste Assoziation von OmpW mit der Peptidoglykanschicht aufgrund der guten Detergenzlöslichkeit, der Sensibilität im Trypsin-Verdau und der geringen Größenverschiebung um nur 2-3 kDa unwahrscheinlich (Nandi *et al.*, 2005). Auch für das OmpW-homologe OprG konnte keine Bindung mit Peptidoglykan nachgewiesen werden. Allerdings

faltete sich Hitze-modifiziertes OprG nach Zugabe von LPS in den Ursprungszustand zurück (Hancock & Carey, 1979; Hancock *et al.*, 1981a). Alterationen in der LPS-Zusammensetzung führen in *Ps. aeruginosa* darüber hinaus zu einer erhöhten OprG-Expression, so dass eine Beteiligung an der Stabilisierung der Membran angenommen wird (Hancock *et al.*, 1990). Ein weiteres Indiz für die OmpW-vermittelte Stabilisierung der äußeren Membran ist auch dessen verstärkte Expression unter Milieubedingungen, die die Integrität der äußeren Membran belasten. So wird die Transkription von *ompW* in *E. coli* aufreguliert, wenn ungünstige physikalische oder chemische Einflüsse auf die Zellen einwirken, wie z. B. Hitze- oder Kälteschock, extreme pH-Werte, Einfluss von reaktiven Sauerstoffmetaboliten oder von Toxinen (Kapitel 2.3.4).

Die zytotoxisch wirkenden Substanzen Chromat und Trinitrotoluen wirken sich maßgeblich auf die Membranzustände von Bakterien aus und führen zur gesteigerten Expression von OmpW-homologen Proteinen (Ackerley *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2004). Bei *Stenotrophomonas* sp. führt der Einfluss von Trinitrotoluen zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung der äußeren Membran und zu einer faltigen, uneinheitlichen Stäbchenform der Bakterienzellen. Als Reaktion auf den Trinitrotoluen-induzierten Stress kam es zu einer verstärkten Synthese von OmpW (Ho *et al.*, 2004). Auch bei *E. coli* veränderte sich die Bakterienzellmorphologie unter dem Einfluss von Chromat stark, denn die Bakterien nahmen eine längliche, fast schlangenähnliche Form an. Die morphologischen Veränderungen der Bakterienform gingen auch hier mit einer erhöhten OmpW-Expression einher. Das alleinige Fehlen von OmpW in einer isogenen *ompW*-Knockout-Mutante von *E. coli* K12 hatte jedoch nur eine Steigerung der minimalen Hemmkonzentration MIC₅₀ um etwa 10 % (450 µM Chromat) zur Folge (Ackerley *et al.*, 2006). Vor dem Hintergrund dieser Studie bleibt die Bedeutung von OmpW für die Membranzustände unklar.

2.3.6.3 OmpW-vermittelte Virulenzeigenschaften

Neben OmpW sind die einzigen bisher bekannten Beta-Faltblatt-Proteine mit hydrophoben Bindungstaschen die Zelladhäsionsproteine NspA und PagP. Die hydrophoben Bindungstaschen dieser beiden Moleküle dienen offensichtlich der Bindung von Rezeptoren, das heißt von Lipiden auf der Wirtsepithelzelle (Hong *et al.*, 2006). In Analogie dazu könnte die Hauptfunktion des Beta-Faltblatt-Fasses von OmpW in der Verankerung des Proteins in der äußeren Membran liegen, so dass die funktionelle Einheit die langen extrazellulären Peptidschleifen und die hydrophobe Bindungstasche sind, die als Bindungspartner für bislang unbekannte Rezeptoren fungieren (Baldermann & Engelhardt, 2000; Nikaido, 2003). Zahlreiche bisher bekannte 8-strängige Beta-Faltblatt-Fass-Proteine sind an der Adhärenz von pathogenen Bakterien an Epithelzellen maßgeblich beteiligt (Kapitel 2.3.3.). Bei OmpW von *V. cholerae* kann ein Einfluss auf die Adhärenz an Darmepithelzellen festgestellt werden, jedoch in starker Abhängigkeit von der O-Gruppe. Der *V. cholerae* O1-Stamm O395 des klassischen Biotyps und der O1-Stamm Co366 vom El Tor-Biotyp waren bei kompetitiven Infektionsversuchen im Babymaus-Infektionsmodell nur kaum besser (Faktor 1,2 bzw. 1,8) zur Kolonisation befähigt als ihre isogenen *ompW*-Knockout-Mutanten (Nandi *et al.*,

2005). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass OmpW von *V. cholerae* O1-Stämmen nur sehr schwach exprimiert wird (Manning *et al.*, 1985; Sengupta *et al.*, 1998). Der *V. cholerae* O139-Stamm SG25 kolonisierte den Mäusedarm zehnmal besser als seine isogene *ompW*-Knockout-Mutante (Nandi *et al.*, 2005). Eine Beteiligung von OmpW an der Adhärenz wird auch für den *V. cholerae* nicht-O1/nicht-O139-Stamm 10325 (Serovar 34) unter Ausbildung von autoagglutinierenden Fimbrien vermutet (Sengupta *et al.*, 1998). Eine Adhäsion von mittels präparativer SDS-PAGE denaturierend aufgereinigtem OmpW aus *E. coli* an humanen HCT8-Ileocaecal-Epithelzellen konnte nicht nachgewiesen werden (Mammarappallil & Elsinghorst, 2000). Das OmpW-homologe Tia-Protein war unter gleichen Versuchsbedingungen adhäsiv. Dieses Phänomen war sogar auf bestimmte Epithelzelllinien beschränkt, so dass eine Rezeptorspezifische Bindung angenommen wurde (Mammarappallil & Elsinghorst, 2000).

Hinweise auf eine Vermittlung von Virulenzeigenschaften liefern auch Untersuchungen zur Expression von OmpW unter *in vivo*-Bedingungen. Eine Hochregulation der OmpW-Expression erfolgt bei *E. coli* unter dem Einfluss von Mukus der murinen Darmschleimhaut (Chang *et al.*, 2004). Eine veränderte Expression von OmpW konnte darüber hinaus bei im Blutstrom von Hühnern befindlichen Pasteurellen festgestellt werden. In Gegensatz zu *in vitro* auf BHI- (Brain-Heart-Infusion-) Nährboden wachsenden Bakterien regulierten die im Blut befindlichen Pasteurellen die OmpW-Expression herunter (Boyce *et al.*, 2006).

OMVs von Gram-negativen Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Virulenzeigenschaften (Kuehn & Kesty, 2005). Bei pathogenen Bakterien wurde eine aktive Sekretion von Virulenzfaktoren wie zum Beispiel von hitzelabilem Enterotoxin (LT), Shigatoxin (Stx), Cytotoxin (ClyA) und Leukotoxin durch OMVs beobachtet (Gophna *et al.*, 2004; Horstman & Kuehn, 2000, 2002; Horstman *et al.*, 2004; Kesty & Kuehn, 2004; Kesty *et al.*, 2004; Kuehn & Kesty, 2005). OMVs von *E. coli* enthalten in ihrer Membran vermehrt monomere OMPs wie z. B. OmpA, OmpX und OmpW, aber nur geringe Mengen an den klassischen trimeren Porinen OmpC und OmpF (Gophna *et al.*, 2004; Horstman & Kuehn, 2000; Wai *et al.*, 2003). Die Bedeutung dieser andersartigen Membranzusammensetzung ist weitestgehend ungeklärt, es ist jedoch davon auszugehen, dass sie Auswirkungen auf die Virulenz hat. So dient eine OMV-vermittelte Sekretion von großen Mengen an OmpA bei septikämischen *E. coli* als bakterieller Schutz gegen das Immunsystem des Wirtes (Gophna *et al.*, 2004). Heterolog in *E. coli* exprimiertes Ail-Adhäsionsprotein von *Y. enterocolitica* wurde in den *E. coli*-OMVs angereichert und führte, im Gegensatz zu Vesikeln ohne Ail, zu einer Vesikel-Internalisation in humane Darmepithelzellen (Kesty & Kuehn, 2004). Deshalb vermuteten Horstman und Kuehn (2000) bei enterotoxischen *E. coli* (ETEC), dass OmpW und OmpX die Adhärenz und Internalisation von mit Virulenzfaktoren beladenen OMVs in die Wirtsepithelzellen vermitteln.

2.3.7 Immunogene Eigenschaften von OmpW

Porine als integrale Bestandteile der äußeren Membran oder von sekretierten OMVs sind wichtige Angriffspunkte der zellulären und humoralen Immunreaktion des Wirtsorganismus. Die immunogenen Eigenschaften von Porinen beruhen dementsprechend sowohl auf einer TH1- als auch auf einer TH2- vermittelten Antwort des Immunsystems. (Alurkar & Kamat, 1997; Galdiero *et al.*, 1998b; Galdiero *et al.*, 2001). Für Porine von Salmonellen ist bekannt, dass sie eine lang anhaltende protektive Immunität induzieren können (Meenakshi *et al.*, 1999; Secundino *et al.*, 2006; Udhayakumar & Muthukkaruppan, 1989).

Über die Immunogenität von OmpW gibt es bislang aber nur sehr wenige Daten. Es scheint, dass die Bildung OmpW-spezifischer Antikörper gegen OmpW von *Salmonella enterica* stark von der Wirtstierart abhängig ist (Bauerfeind, 1999). Nach der Immunisierung von Hühnern mit attenuierten Impfstämmen der Serovare S. Tm. (Zoosaloral H[®]) und S. Gallinarum (SG Vaccine Nobilis[®]) zeigten alle zehn Tiere spezifische Antikörper gegen OmpW, ungeimpfte Tiere dagegen keine Antikörper. Nur vier von zwölf auf natürlichem Weg mit S. Tm. infizierten Rindern hatten OmpW-spezifische Antikörper. Im Vergleich zu den Serumproben von Hühnern und Rindern wiesen die Serumproben von Pferden deutlich stärkere Signale für OmpW im Immuno-Blot auf. Allerdings hatten 43 von 46 Pferden OmpW-spezifische Antikörper, unabhängig von ihrem Infektionsstatus. Möglicherweise handelte es sich um kreuzreagierende Antikörper gegen OmpW-homologe Proteine anderer Enterobacteriaceae (Bauerfeind, 1999). In wieweit die gebildeten Antikörper auch eine protektive Wirkung gegenüber Salmonellen haben, ist bislang ungeklärt.

Bei *V. cholerae* wurde OmpW als ein Hauptantigen identifiziert (Manning *et al.*, 1985). Ein Antiserum gegen das OmpW-homologe Fimbrien-Protein von *V. cholerae* vermittelte passive Immunität, indem es die Kolonisation im Darm inhibierte (Sengupta *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde bei Babymäusen durch passive Immunisierung mit einem heterologen Antiserum ein moderater Schutz (33-66 %) gegen die orale *V. cholerae*-Belastung erzielt. Die protektive Wirkung war abhängig von der verabreichten Serum-Menge und der O-Gruppe des verwendeten Challenge-Stammes, wobei eine höhere Protektivität gegen einen nicht-O1/nicht-O139-Stamm zu beobachten war als gegen die O1-Stämme (Nandi *et al.*, 2005). In einer anderen Untersuchung waren Antikörper gegen OmpW bei *Klebsiella pneumoniae* in acht von zehn Seren infizierter Menschen detektierbar, weshalb OmpW als mögliche Komponente eines auf OMPs beruhenden Impfstoffes angesehen wird (Kurupati *et al.*, 2006). OmpW-angereicherte OMVs von *E. coli* induzieren einen pro-inflammatorischen Effekt in A498-Epithelzellkulturen (Soderblom *et al.*, 2005). Während der LPS-Anteil der OMVs eine TLR4-(Toll-like Receptor 4)-abhängige Immunreaktion stimuliert, ist der durch OmpW induzierte proinflammatorische Effekt TLR4-unabhängig. Der genaue Mechanismus ist unbekannt (Soderblom *et al.*, 2005).

3 MATERIAL UND METHODEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Lösungen und Puffer sind im Anhang aufgelistet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden die Substanzen von der Firma Merck AG, Darmstadt, bezogen.

3.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstämme. Die in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen auf das Vorhandensein des *ompW*-Gens bzw. die Expression des entsprechenden Proteins verwendeten *Salmonella* (S.)-Stämme sind überwiegend Stämme der SARB- und SARC-Stammsammlungen (Salmonella Reference Collection B bzw. C, „*Salmonella* Genetic Stock Centre“, Dr. Kenneth E. Sanderson, University of Calgary, Alberta, Kanada). Die SARB-Sammlung repräsentiert 72 Stämme aus 37 Serovaren der Subspezies I von *S. enterica*, die SARC-Sammlung je zwei Stämme pro Subspezies von *S. enterica* sowie zwei Stämme der Spezies *S. bongori* (**Tabelle 4**). Außerdem wurden acht Feldstämme von *S. bongori* und vier Feldstämme Subspezies *houtenae* Serovar 48:g,z₅₁:- (ehemals *S. Marina*) in die Tests einbezogenen (**Tabelle 5**).

Neben den aufgeführten Salmonellen-Stämmen wurden auch 59 Nicht-Salmonellen-Stämme verwendet, die ebenfalls zum Großteil in internationalen Stammsammlungen archiviert sind (**Tabelle 6**). Hierbei wurde die Auswahl so getroffen, dass insbesondere die mit den Salmonellen enger verwandten Enterobakterien, aber auch andere in der Veterinärmedizin relevante Genera Berücksichtigung fanden. Alle Stämme wurden in Luria-Bertani-Medium (LBM) mit 30 % (v/v) Glycerin bei -70 °C gelagert bzw. nach Plattenabschwemmung mit Serumbouillon (mit 10 % [w/v] Glucose) lyophilisiert und bei 4 °C gelagert.

Zelllinien. Die verwendeten humanen LoVo-Kolonkarzinom-Epithelzellen und die murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 entstammten der Zellbank des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin und wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Tedin in LoVo-Epithelzellmedium bzw. Makrophagenzell-Medium kultiviert.

Tabelle 4: Überblick über verwendete Salmonellen-Stämme der Sammlungen SARB und SARC

Stamm	Genus	Spezies	Subspezies	O-Gruppe	Serovar
SARB01	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Agona
SARB02	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	E 1	Anatum
SARB03	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Brandenburg
SARB04	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Choleraesuis
SARB05	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Choleraesuis
SARB06	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Choleraesuis
SARB07	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Choleraesuis
SARB08	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Decatur
SARB09	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Derby
SARB10	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Derby
SARB11	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Derby
SARB12	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Dublin
SARB13	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Dublin
SARB14	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Dublin
SARB15	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Duisburg
SARB16	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Enteritidis
SARB17	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Enteritidis
SARB18	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Enteritidis
SARB19	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Enteritidis
SARB20	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Emek
SARB21	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Gallinarum
SARB22	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Haifa
SARB23	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Heidelberg
SARB24	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Heidelberg
SARB25	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Indiana
SARB26	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Infantis
SARB27	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Infantis
SARB28	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Miami
SARB29	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Miami
SARB30	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Montevideo
SARB31	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Montevideo
SARB32	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Muenchen
SARB33	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Muenchen
SARB34	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Muenchen
SARB35	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Muenchen
SARB36	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Newport

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Stamm	Genus	Spezies	Subspezies	O-Gruppe	Serovar
SARB37	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Newport
SARB38	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 2-3	Newport
SARB39	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Panama
SARB40	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Panama
SARB41	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Panama
SARB42	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	A	Paratyphi A
SARB43	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Paratyphi B
SARB44	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Paratyphi B
SARB45	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Paratyphi B
SARB46	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Paratyphi B
SARB47	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Paratyphi B
SARB48	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Paratyphi C
SARB49	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Paratyphi C
SARB50	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Paratyphi C
SARB51	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Pullorum
SARB52	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Pullorum
SARB53	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Reading
SARB54	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	F	Rubislaw
SARB55	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Saintpaul
SARB56	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Saintpaul
SARB58	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Sendai
SARB57	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Schwarzengrund
SARB59	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	E 4	Senftenberg
SARB60	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Stanley
SARB61	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Stanleyville
SARB62	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Thompson
SARB63	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Typhi
SARB64	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	Typhi
SARB65	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium
SARB66	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium
SARB67	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium
SARB68	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium
SARB69	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	C 1	Typhisuis
SARB70	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium
SARB71	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Wien
SARB72	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Wien
SARC01	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Tm. var. Cop.

Fortsetzung der **Tabelle 4** auf der nächsten Seite

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Stamm	Genus	Spezies	Subspezies	O-Gruppe	Serovar
SARC02	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	D 1	9,12,[Vi]:d:[z ₆₆]
SARC03	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	58	58:d:z ₆
SARC04	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	T	42:f,g,t:-
SARC05	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>	62	62:z ₄ ,z ₂₃ :-
SARC06	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>	62	62:z ₃₆ :-
SARC07	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	Z	50:k:z
SARC08	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	P	38:(k):z ₃₅ :-
SARC09	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	Y	Marina
SARC10	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	I	16:z ₄ ,z ₃₂ :-
SARC11	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	66	66:z ₄₁ :-
SARC12	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	Y	48:z ₄₁ :-
SARC13	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>indica</i>	W	45:a:e,n,x
SARC14	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>indica</i>	F	11:b:e,n,x
SARC15	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>VII</i>	R	1,40:g,z ₅₁ :-
SARC16	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>VII</i>	R	40:z ₄ ,z ₂₄ :[z ₃₉]

Erläuterungen: Tm. var. Cop., *Typhimurium variatio* Copenhagen

Tabelle 5: Überblick über verwendete Salmonellen-Stämme ohne Zugehörigkeit zu den Stammsammlungen SARB/SARC

Stamm	Genus	Spezies	Subspezies	O-Gruppe	Serovar	Herkunft
240	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	Y	48:z ₃₅ :-	BfR
241	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	60	60:z ₄₁ :-	BfR
242K	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	66	66:z ₄₁ :-	BfR
243	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	66	66:z ₃₅ :-	BfR
244	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	66	66:z ₆₅ :-	BfR
245	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	60	60:z ₄₁ :-	BfR
246	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	66	66:z ₆₅ :-	BfR
247	<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>	-	Y	48:z ₃₅ :-	BfR
P6638/01	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	Y	Marina	IHIT
P1056/96	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	Y	Marina	IHIT
0319/02	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	Y	Marina	IHIT
3019/01	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	Y	Marina	IHIT
SL1344	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium	IMT
ATCC19585	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	B	Typhimurium	ATCC

Erläuterungen: **ATCC**, American Type Culture Collection; **BfR**, Bundesinstitut für Risikobewertung; **IHIT**, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen; **IMT**, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin.

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Bakterienstämme anderer Genera als *Salmonella*

Stamm	Genus	Spezies	Herkunft/ Referenz
DSM30006	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumannii</i>	DSMZ
DSM30007	<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	DSMZ
DSM2403	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	DSMZ
K4288/95	<i>Actinomyces</i>	<i>pyogenes</i>	IHIT
K4479/95	<i>Actinomyces</i>	<i>pyogenes</i>	IHIT
IMT1034	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	IMT
B74	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	IHIT
9483	<i>Bordetella</i>	<i>bronchiseptica</i>	IHIT
8462	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	IHIT
SG2702/91	<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	IHIT
62994	<i>Clostridium</i>	<i>sordellii</i>	IHIT
NCTC532	<i>Clostridium</i>	<i>sporogenes</i>	NCTC
DSM2485	<i>Clostridium</i>	<i>tertium</i>	DSMZ
P5240	<i>Dermatophilus</i>	<i>congolensis</i>	IHIT
ATCC29212	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	ATCC
ATCC10541	<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	ATCC
C600	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (K12)	Karch
2324	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O157:H7)	IHIT
2430	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O116:H21))	IHIT
987P	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O9:K103:H-)	Wray
H10407	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O78:K80:H11)	Evans, 1973
B41	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O101:K-:H-)	Wray
570/89	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O111:H-)	IHIT
HUS 2	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O111:H-)	Karch
F107/86	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> (O139:K12:H1)	Bertschinger, 1990
13337	<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	IHIT
Z1412	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	IHIT
119	<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	IHIT
DSM5283	<i>Mannheimia</i>	<i>haemolytica</i>	DSMZ
ATCC43137	<i>Mannheimia</i>	<i>multocida</i>	ATCC
NCTC10322	<i>Mannheimia</i>	<i>multocida gallicida</i>	IMT
Nc00235	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	Giammanco
DSM30187	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	DSMZ
DSM30117	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	DSMZ
NCTC11624	<i>Pasteurella</i>	<i>stomatis</i>	IMT
Nc11938	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	Giammanco
Nc04175	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	Giammanco

Fortsetzung der **Tabelle 6** auf der nächsten Seite

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Stamm	Genus	Spezies	Herkunft/ Referenz
Nc12737	<i>Proteus</i>	<i>penneri</i>	Giammanco
NcIMB13273	<i>Proteus</i>	<i>myxofaciens</i>	Giammanco
ATCC29905	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>	Giammanco
ATCC14153	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC
DSM788	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	DSMZ
ATCC14153	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	ATCC
3585	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	IHIT
Nc10286	<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i>	Giammanco
Nc11800	<i>Providencia</i>	<i>stuartii</i>	Giammanco
Nc11801	<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i>	Giammanco
Nc11802	<i>Providencia</i>	<i>rustigianii</i>	Giammanco
NCTC12003	<i>Providencia</i>	<i>heimbachae</i>	Giammanco
ATCC15442	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC
ATCC27853	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC
5198/95	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	IHIT
P4757/95	<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	IHIT
K4116/95	<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>	IHIT
DSM1636	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	DSMZ
27/0570	<i>Shigella</i>	<i>sonnei</i>	IHIT
ATCC29213	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	ATCC
P7856/95	<i>Vibrio</i>	sp.	IHIT
NCTC10938	<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i>	IMT
P5535/00	<i>Yersinia</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	IHIT

Erläuterungen: **ATCC**, American Type Culture Collection; **DSMZ**, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; **Giammanco**, Dr. Giammanco, Catania, Italien; **IHIT**, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Gießen; **IMT**, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin; **Karch**, Dr. H. Karch, Universität Würzburg; **NCTC**, National Collection of Type Cultures, Salisbury, England; **Wray**, Dr. C. Wray, Central Veterinary Laboratory, Addlestone, England.

3.2 Gentechnisch veränderte Mikroorganismen

Bei den verwendeten gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) handelte es sich um Abkömmlinge von *E. coli* K12- und B-Stämmen. Es sind die Stämme BLR(DE3), BL21(DE3) und TOP10 verwendet worden (**Tabelle 7**). Des Weiteren wurden auch genetisch veränderte Derivate des *S. Tm.*-Stammes SL1344 erzeugt.

Alle Stämme sind mit ihren relevanten Eigenschaften in **Tabelle 8** aufgelistet. Die GMOs wurden in LBM mit 30 % (v/v) Glycerin-Zusatz bei -70 °C gelagert.

Tabelle 7: Übersicht der für Transformationen verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
BLR(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB⁻mB⁻) gal dcm Δ(srl-recA) 306::Tn10(DE3)</i>	Novagen
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB⁻mB⁻) gal dcm (DE3)</i>	Novagen
TOP10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Erläuterungen: **Novagen**, Fa. Novagen durch Fa. Roche GmbH, Mannheim;
Invitrogen, Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

3.3 Plasmide

In dieser Arbeit wurden GMOs mit fünf gentechnisch hergestellten Plasmiden verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung von PCR-Amplifikaten haben die kommerziell erhältlichen Plasmide pET-24b(+), pCR[®]8/GW/TOPO[®] und pBR322 gedient. Alle hergestellten Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften sind in der **Tabelle 9** aufgeführt. Die Genkarten zu den rekombinanten Plasmiden sind in **Abbildung 4** bis **Abbildung 8** dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten gentechnisch veränderten Mikroorganismen

GVO-Bezeichnung	Spender-Organismus	Empfänger-Stamm	Antibiotikum ¹⁾ (µg/ml)	Induktor ²⁾ (Endkonzentration)
BLR[DE3, pET-24b(+)]	-	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Kan (30)	IPTG (1 mM)
BLR(DE3, pHIT-IV-28)	S. Tm. ATCC19585	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Kan (30)	IPTG (1 mM)
BLR(DE3, pHIT-IV-29)	S. Tm. ATCC19585	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Kan (30)	IPTG (62,5 µM)
TOP10 (pHIT-IV-30)	S. Tm. ATCC19585	<i>E. coli</i> TOP10	Kan (30)	IPTG (1 mM)
BLR(DE3, pHIT-IV-31)	S. Tm. ATCC19585	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Kan (30)	IPTG (1 mM)
BLR(DE3, pBR322)	-	<i>E. coli</i> BLR(DE3)	Amp (100), Tc (12,5)	-
BL21(DE3, pHIT-VI-46)	S. Tm. SL1344	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Tc (12,5)	-
JM109(pKD4)	-	<i>E. coli</i> JM109	Amp (100)	-
SL1344(pKD46)	-	S. Tm. SL1344	Amp (100)	Ara (1 mM)
SL1344ΔompW	<i>E. coli</i> JM109(pKD4)	S. Tm. SL1344	Kan (50)	-
SL1344ΔompW-C	<i>E. coli</i> BL21(DE3, pHIT-VI-46)	S. Tm. SL1344 ΔompW	Kan (50), Tc (12,5)	-

Erläuterungen: 1) Antibiotikum-Zusatz im LBM zur selektiven Anzucht des GVOs; 2) Verwendete Substanz zur Induktion des Promotors im rekombinanten Plasmid für die Expression des Zielproteins;

Amp, Ampicillin bzw. Carbenicillin; **Ara**, Arabinose; **IPTG**, Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid; **Kan**, Kanamycin; **Tc**, Tetrazyklin.

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft
pET-24b(+)	5309 bp, pBR322 origin, f1 origin, <i>lacI</i> , <i>kan</i> , T7 Promotor, T7 Transkriptionsstart, T7 Terminator, His-Tag Kodierungssequenz	NEB
pBR322	4.361 bp, <i>bla</i> , <i>tet</i> , pMB1 origin (low copy), <i>rop</i>	NEB
pCR [®] 8/GW/TOPO	2817 bp, <i>spn</i> , pUC origin, TOPO [®] recognition sites, <i>attL</i> sites	Invitrogen
pKD4	„Template-Plasmid“ (Datsenko u. Wanner, 2000; Genbank-eintrag #AY048743), <i>kan</i> -Kassette für homologe Rekombination, <i>bla</i> , <i>FRT</i> sites für die Entfernung der Resistenzkassette	Dr. K. Tedin, FU Berlin
pKD46	„Rekombinase-Plasmid“, (Datsenko u. Wanner, 2000; Genbankeintrag #AY048746), Red-Rekombinase-System (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>60a</i>), <i>bla</i>	Dr. K. Tedin, FU Berlin
pHIT-IV-28	pET-24b(+):: <i>stm1733</i> , 5.651 bp, <i>kan</i> , Schnittstellen: <i>NdeI</i> , <i>HindIII</i> , Insert: 404 bp	diese Arbeit
pHIT-IV-29	pET-24b(+):: <i>ompW</i> , 5.885 bp, <i>kan</i> , Schnittstellen: <i>NdeI</i> , <i>HindIII</i> , Insert: 638 bp	diese Arbeit
pHIT-IV-30	pCR [®] 8/GW/TOPO [®] :: <i>katN</i> , 3.734 bp, <i>spn</i> ; TOPO [®] recognition sites, Insert: 917 bp	diese Arbeit
pHIT-IV-31	pET-24b(+):: <i>katN</i> , 6.125 bp, <i>kan</i> ; Schnittstellen: <i>NdeI</i> , <i>HindIII</i> , Insert: 878 bp	diese Arbeit
pHIT-VI-46	pBR322:: <i>ompW</i> mit intergenischem Bereich upstream, 5.343 bp, <i>tet</i> ; Schnittstelle: <i>Scal</i> , Insert: 982 bp	diese Arbeit

Erläuterungen: *bla*, Ampicillinresistenz-Gen; *kan*, Kanamycinresistenz-Gen, *spn*, Spectinomycinresistenz-Gen; *tet*, Tetrazyklinresistenz-Gen; **NEB**, New England Biolabs GmbH, Frankfurt; **Invitrogen**, Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe.

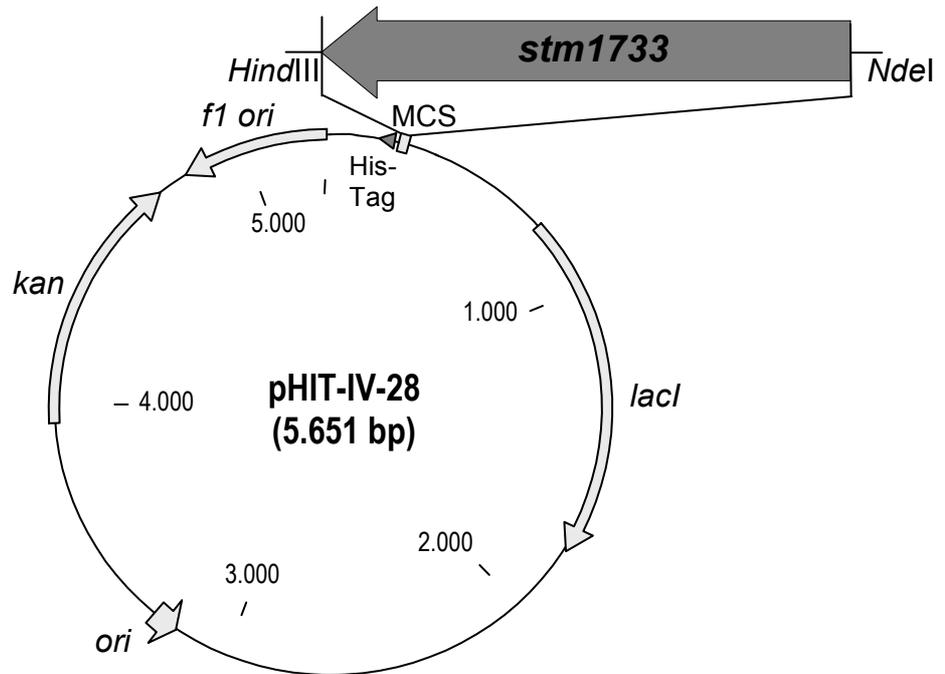


Abbildung 4: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-IV-28 [pET-24b(+)::stm1733]

kan, Kanamycinresistenz-Gen; **ori**, f1-Replikationsursprung; **lacI**, lac-Repressor-Gen; **stm1733**, Leserahmen, der im Chromosom von *S. Tm.* stromaufwärts von *ompW* liegt; **His-Tag**, Sequenz für Histidin-Marker.

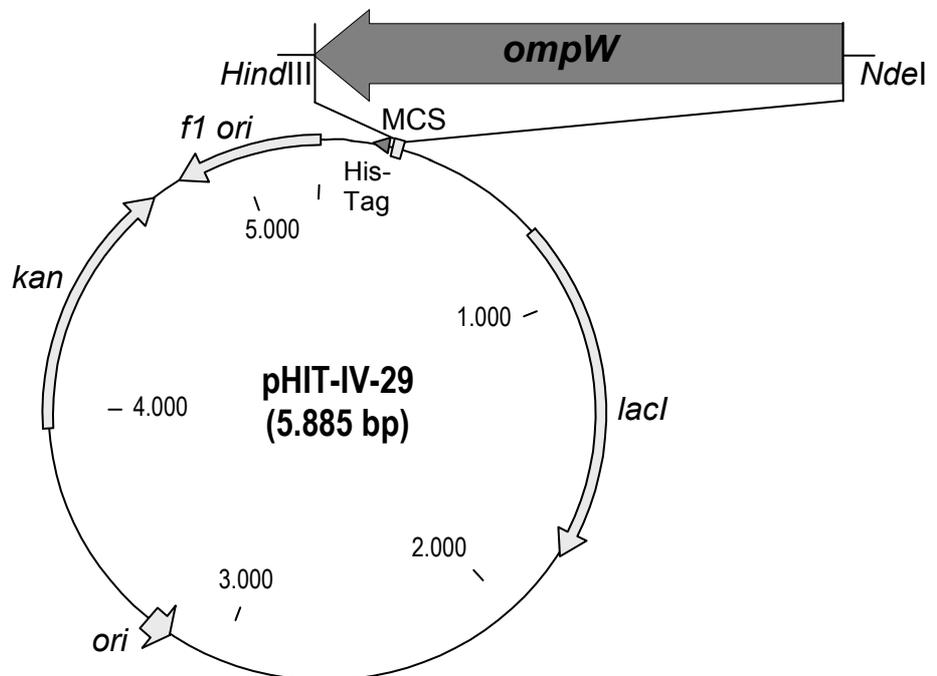


Abbildung 5: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-IV-29 [pET-24b(+)::ompW]

Kan, Kanamycinresistenz-Gen; **ori**, f1-Replikationsursprung; **lacI**, lac-Repressor-Gen; **ompW**, OmpW kodierende Sequenz mit eigener Leadersequenz; **His-Tag**, Sequenz für Histidin-Marker.

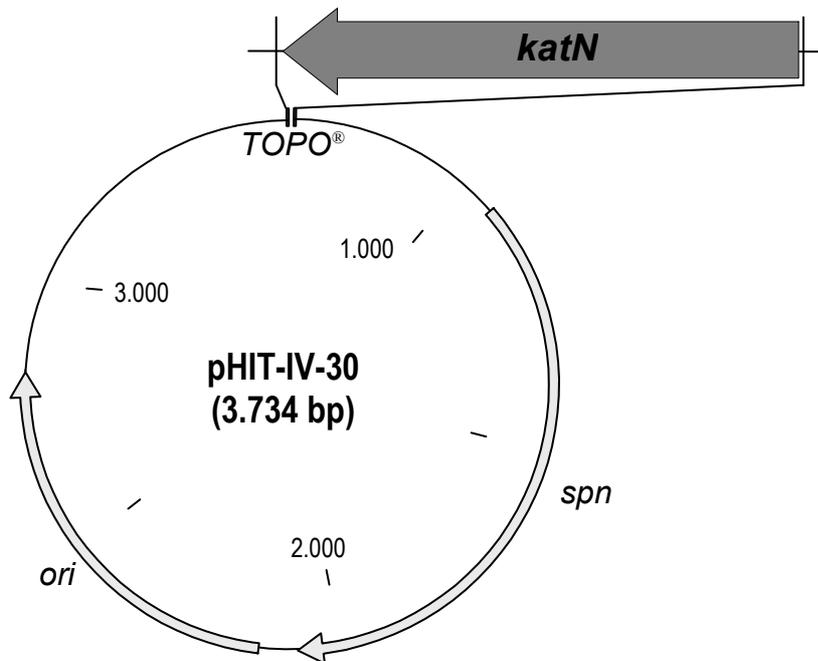


Abbildung 6: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-IV-30 (pCR8/GW/Topo::*katN*)

spn, Spectinomycinresistenz-Gen; *ori*, pUC-Replikationsursprung; *katN*, Leserahmen, der im Chromosom von *S. Tm.* stromabwärts von *ompW* liegt; *TOPO*[®], Topoisomerase Erkennungssequenzen.

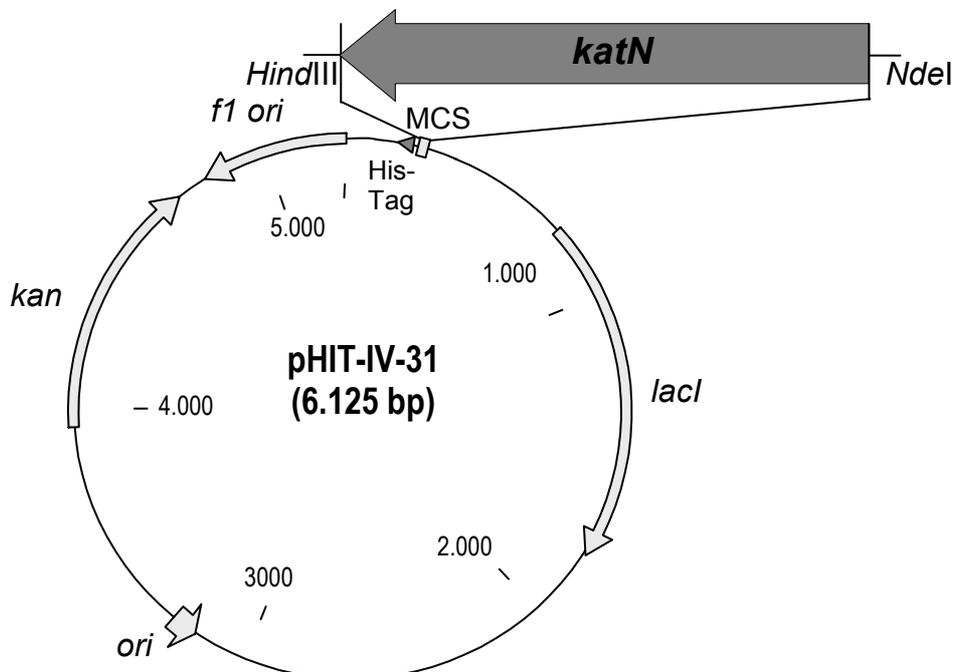


Abbildung 7: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-IV-31 [pET-24b(+>::*katN*)

kan, Kanamycinresistenz-Gen; *ori*, f1-Replikationsursprung; *lacI*, *lac*-Repressor-Gen; *katN*, Leserahmen, der im Chromosom von *S. Tm.* stromabwärts von *ompW* liegt; His-Tag, Sequenz für Histidin-Marker.

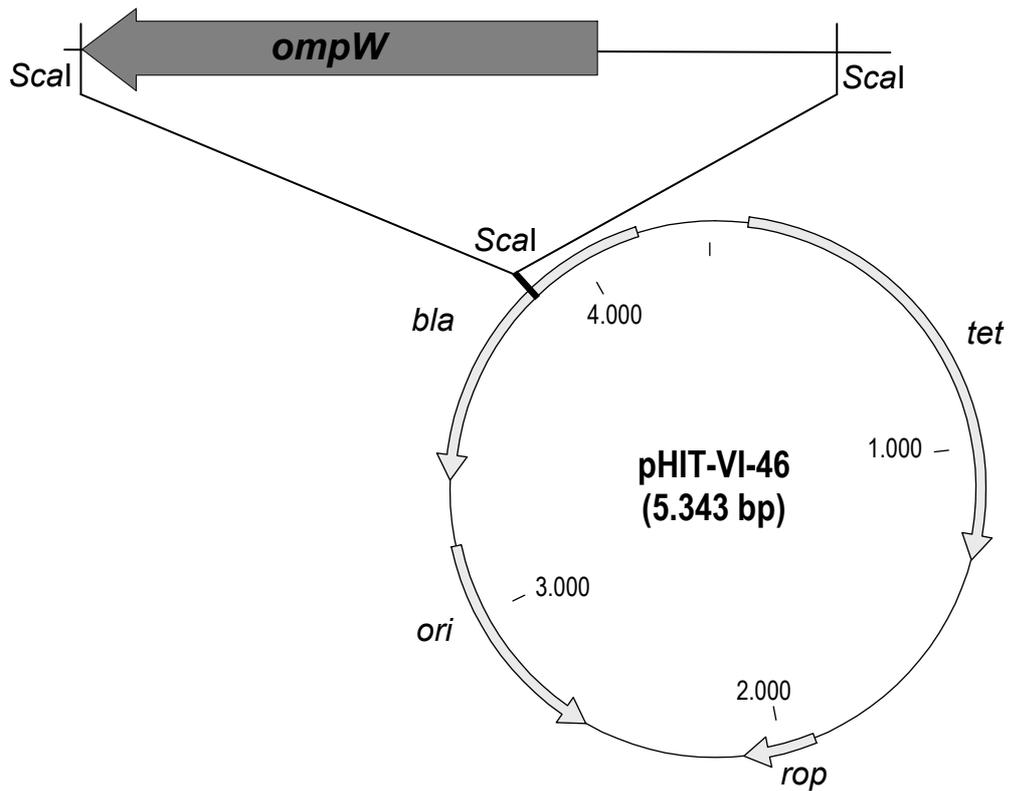


Abbildung 8: Genkarte des rekombinanten Plasmids pHIT-VI-46 (pBR322::*ompW*)

bla, Ampicillinresistenz-Gen; *tet*, Tetrazyklinresistenz-Gen; *ori*, „low copy“-Replikationsursprung; *rop*, *rop*-Genprodukt zur Regulation der Replikation.

3.4 Impfstoffe

Säulenchromatographisch aufgereinigtes rSTM1733-His, rOmpW-His und rKatN-His wurde zweimal für 24 h unter den im Kapitel 3.8.4 beschriebenen Bedingungen dialysiert und bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Applikation wurden die Lösungen jeweils mit denselben Volumina an inkompletem Freundschens Adjuvans (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) homogen vermischt. Jede Impfdosis enthielt 100 µg des entsprechenden rekombinanten Impfantigens in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Impfstoffe

Impfchargen- Bezeichnung	Impfantigen	Impfantigenmenge (je Tier und Impfung)	Adjuvans 1:1 (v:v)
Orf-4/A4/05	affinitätschromatographisch aufgereinigtes rSTM1733-His, dialysiert	100 µg	iFA
Omp-21/A5/05	affinitätschromatographisch aufgereinigtes rOmpW-His, dialysiert	100 µg	iFA
Orf-6/A9/05	affinitätschromatographisch aufgereinigtes rKatN-His, dialysiert	100 µg	iFA

Erläuterungen: iFA = inkomplettes Freundsches Adjuvans

3.5 Tiere

Kaninchen. Zur Herstellung der Hyperimmunseren gegen die rekombinanten Fusionsproteine rOmpW-His, rSTM1733-His und rKatN-His wurde je ein weibliches, sechs Wochen altes Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln) immunisiert. Die Kaninchen wurden während des Versuchszeitraumes in Einzelboxen (60 cm breit, 63 cm hoch und 85 cm tief) gehalten, mit Heu und einem pelletierten Alleinfuttermittel („all-mash A“, Fa. Deutsche Krafffutter GmbH, Bramsche) ad libitum gefüttert und über Flaschentränken mit Wasser versorgt.

3.6 Bakteriologische Methoden

3.6.1 Anzucht von Bakterien

Standardanzucht. Die Anzucht der Bakterien erfolgte ausgehend von Einzelkolonien auf einem geeigneten Nährboden üblicherweise mittels Schüttelkultur in LBM unter aeroben Bedingungen für 14-16 h (37 °C, 180 rpm). Bei der Anzucht von rekombinanten Bakterien wurde zunächst dem Luria-Bertani-Agar (LBA) und dann dem LBM das jeweilige für die Selektion notwendige Antibiotikum in der entsprechenden Endkonzentration zugesetzt (siehe **Tabelle 8**).

Vorkultur. Zur Beimpfung von Testmedien wurden Vorkulturen verwendet. Zur Herstellung der Vorkulturen wurde frisches LBM im Verhältnis 1:50 bzw. 1:100 (v/v) mit Bakteriensuspension aus der Standardanzucht inokuliert und bei 37 °C mit 180 rpm

solange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,3 bis 0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) erreicht war.

Induktion transformierter Bakterienkulturen. Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden im Standardverfahren angezüchtet. Die Bakteriensuspension wurde 1:100 (v:v) in frischem LBM mit dem entsprechenden Antibiotikum verdünnt und bis zum Erreichen der gewünschten OD_{600} von 0,6 weiter inkubiert (37 °C, 180 rpm). Anschließend wurde zur Induktion der Proteinexpression der entsprechende Induktor (IPTG bzw. Arabinose; Konzentration siehe **Tabelle 8**) der Kultur hinzugefügt.

E. coli-Stämme, die mit den rekombinanten Plasmiden pHIT-IV-28 und pHIT-IV-31 transformiert worden waren, wurden nach IPTG-Zugabe (Endkonzentration 1 mM) für vier Stunden inkubiert (37 °C, 180 rpm). Der mit dem Plasmid pHIT-IV-29 transformierte Stamm wurde mit 62,5 μ M IPTG bei 30 °C für vier Stunden induziert. Zur Induktion von SL1344(pKD46) mit 1 mM Arabinose wurde der Stamm für zwei Stunden inkubiert (37 °C, 180 rpm).

Anzucht auf Schafblutagar. Zum Animpfen der Standardkulturen in LBM und zum Nachweis der Hämolyse wurden die Bakterien auf Schafblutagar angezüchtet. Nach Inkubation bei 37 °C für 16-18 h erfolgte die Beurteilung der Kolonien anhand morphologischer Merkmale und des gebildeten Hämolysehofes um die Kolonien.

Anzucht unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen. Die Stämme der Genera *Acinetobacter*, *Listeria* und *Rhodococcus* wurden unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Kerzentopf (GasPak[®]-Topf, Fa. Becton Dickinson, Braunschweig) angezüchtet. Dazu wurden die angeimpften Nährböden in den Kerzentopf gestellt, es wurde ein entzündetes Teelicht auf die Nährböden gestellt und der Kerzentopf luftdicht verschlossen. Es wurde das Erlöschen des Teelichts abgewartet und der Kerzentopf anschließend in den Brutschrank gestellt. Die *Rhodococcus*-Stämme sind auf Kochblutagarplatten angezüchtet und für 48 h bei 37 °C inkubiert worden. Die *Acinetobacter*- und *Listeria*-Stämme sind auf Schafblutagarplatten für 14-16 h (37 °C) inkubiert worden. Für die Herstellung von Bouillonkulturen dieser Bakterien wurde LBM verwendet und nach Beimpfung ebenfalls im Kerzentopf inkubiert (37 °C, 180 rpm). Die verwendeten Clostridienstämme wurden unter anaeroben Bedingungen auf Zeissler-Nährböden bzw. in einer Serumbouillon vermehrt. Die Inkubation (37 °C, 14-16 h) erfolgte in einem Anaerobiertopf, d. h. einem luftdicht verschließbaren GasPak[®]-Topf, dem chemisch mit dem Anaerocult A[®]-System (Fa. Merck, Darmstadt) der Luftsauerstoff entzogen wurde.

3.6.2 Keimzahlbestimmung

Photometrische Bestimmung. Die optische Dichte von Keimsuspensionen wurde in einem Photometer („DU-640“; Fa. Beckman Instruments Inc., Fallerton, USA) bei 600 nm bestimmt. Zur Messung wurden mindestens 500 µl der zu bestimmenden Keimsuspension eingesetzt. Die Keimdichte [in koloniebildenden Einheiten (KbE) je ml Suspension] wurde dann mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = \text{OD}_{600} \times 10^9.$$

3.6.3 Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation mit DNS

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen. Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte modifiziert nach Hahnahan (1983). Die Keime wurden für 16 h bei 37 °C angezüchtet. Diese Kultur wurde dann 1:100 (v/v) mit frischem LBM verdünnt, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 weiter inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4.000 x g, 5 min, 4 °C) und in eiskaltem TFB I-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen abermals abzentrifugiert, in TFB II-Puffer resuspendiert und in Aliquots à 100 µl bei -70 °C gelagert.

Elektrokompetente Bakterien-Zellen. Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde als Ausgangskultur der Empfängerstamm im Standardanzuchtverfahren vermehrt. Mit dieser Kultur wurden 500 ml frisches LB-Carbenicillin-Selektivmedium im Verhältnis 1:100 (v/v) beimpft und inkubiert (28 °C, 180 rpm, 5 h). Nach Zugabe von Arabinose (1 mM Endkonzentration) und Inkubation (30 °C, 180 rpm, 2 h) wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (8.000 x g, 15 min, 4 °C) aus dem Flüssigmedium gewonnen und über fünf Waschstufen mit einer 10 % (v/v)-igen Glycerin-Wasser-Lösung (4 °C) entsalzt. Die Pellets wurden dazu jeweils durch Zentrifugationsschritte abnehmender Drehzahl (2 x 8.000 x g, 15 min; 2 x 3.750 x g, 15 min; 1.650 x g, 15 min; jeweils bei 4 °C) zurückgewonnen. Die elektrokompetenten, induzierten Empfängerzellen wurden bei -70 °C eingefroren.

3.6.4 Phänotypische Charakterisierung von *Salmonella enterica*-Stämmen

Biochemische Eigenschaften. Die Charakterisierung von biochemischen Eigenschaften der Salmonellen-Stämme erfolgte nach dem Prinzip der „bunten Reihe“ mit dem kommerziellen api 20 E[®]-Test nach Herstellerangaben (Fa. BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen).

Motilität. Die Überprüfung der Beweglichkeit erfolgte durch zentrale Stichbeimpfung von Schwärmplatten mit 1×10^7 KbE mittels Pipettenspitze. Nach Inkubation (10 h, 37 °C) wurden die Wachstumszonen-Durchmesser (in mm) bestimmt. Der *E. coli*-Stamm C600 wurde als Negativkontrolle und der *S. Tm.*-Stamm ATCC19585 als Positivkontrolle mitgeführt.

NaCl-Empfindlichkeit. Zur Überprüfung der Verträglichkeit verschiedener NaCl-Konzentrationen wurden die Wachstumseigenschaften der Teststämme bei NaCl-Endkonzentrationen von 0,5 %, 2,5 %, 5 % oder 7,5 % (w/v) über die Bestimmung der OD_{600} erfasst. Es wurden dabei 10 ml Testmedium mit 100 µl Vorkultur (1:100, v/v) inokuliert und in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) bei 37 °C und 180 rpm bebrütet. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von 35 h durchgeführt.

Detergenz-Empfindlichkeit. Zur Überprüfung der Detergenzempfindlichkeit wurden Vorkulturen bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 inkubiert (180 rpm, 37 °C) und damit LBM inokuliert, dem entweder das Detergenz Triton X-100 oder SDS (beides Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in den Endkonzentrationen 0 %, 0,5 %, 1 %, 2 % oder 5 % zugesetzt worden war. Inokulation, Inkubation und Messung der OD_{600} erfolgten wie bei der Bestimmung der NaCl-Empfindlichkeit. Zur Auswertung wurde die OD_{600} ins Verhältnis zu dem Ansatz gesetzt, der ohne Detergenzzusatz bebrütet worden war. Als sensitiv wurden Kulturen bewertet, bei denen eine Wachstumsreduktion um mehr als 50 % festzustellen war (Sha et al., 2004).

Säure-Empfindlichkeit. Die Säure-Empfindlichkeit wurde getestet in LBM (pH 7,0), dessen pH-Wert mit 1 N HCl (Fa. Merck AG, Darmstadt) auf Werte von pH 5, pH 4,5, pH 4 und pH 3,5 eingestellt worden war. Inokulation, Inkubation und Messung der OD_{600} erfolgten wie bei der Bestimmung der NaCl-Empfindlichkeit.

Methylviologen-Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit gegen Methylviologen (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde anhand des Wachstums in LBM mit Zusatz von 500 µM, 100 µM und 50 µM sowie ohne Zusatz von Methylviologen getestet. Inokulation, Inkubation und Messung der OD_{600} erfolgten wie bei der Bestimmung der NaCl-Empfindlichkeit.

Eisen-Verwertung. Die Untersuchung des Wachstums bei unterschiedlichen Eisenionen- (Fe^{2+} -) Konzentrationen wurde in Casaminsäure-supplementiertem M9-Minimalmedium mit 0,2 % Glukose-Zusatz (M9-Glu), in M9-Glu-Mangelmedium mit Zusatz von 100 µM $FeCl_2$ (Fa. Merck AG, Darmstadt) oder mit Zusatz von 100 µM 2,2-Dipyridyl (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), einem Eisenchelat-Bildner, durchgeführt. Die Medien wurden im Verhältnis 1:1.000 (v/v) mit der Vorkultur inokuliert. Inkubation und Messung der OD_{600} wurden wie bei der Bestimmung der NaCl-Empfindlichkeit durchgeführt.

Kohlenstoff-Verwertung. Das Screening des Einflusses unterschiedlicher Kohlenstoffquellen auf das Wachstumsverhalten erfolgte in Casaminsäure-supplementiertem

M9-Mangelmedium ohne Glukose (M9-Ca). Die Zuckerverbindungen (Glukose, Fruktose, Arabinose, Mannose, Ribose, Saccharose, Galaktose) bzw. das Glycerin und der Harnstoff wurden dem Medium mit einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) zugesetzt, die organischen Säuren bzw. deren Salze (Na-Azetat, Di-Na-Tatrat, Di-Na-Succinat, Zitronensäure) mit einer Endkonzentration von 0,6 % (w/v), mit Ausnahme von Essigsäure, die 0,2 %-ig (v/v) eingesetzt wurde. Die Substanz Naphthalin wurde als 5 %-ige Stocklösung in Ethanol gelöst, so dass die Endkonzentration im Testmedium 0,1 % Naphthalin und 2 % Ethanol betrug. Ethanol wurde außerdem als alleiniger Zusatz in einer Konzentration von 2 % verwendet. Die Inokulation der Medien erfolgte im Verhältnis 1:1.000 (v/v) mit der Vorkultur. Inkubation und Messung der OD₆₀₀ erfolgten nach acht und 24 Stunden. Die Substanzen Essigsäure und Natriumazetat wurden in den Essigsäurekonzentrationen 0,1 % (pH 6,8), 0,2 % (pH 6,5), 0,4 % (pH 5,7) bzw. in den Natriumazetatkonzentrationen 0,5 %, 1 % und 2 % (jeweils pH 7,2) nachgetestet. Die Messung der OD₆₀₀ erfolgte nach acht, 16, 24, 36 und 48 Stunden.

Antibiotika-Empfindlichkeit. Die Durchführung der Antibiotika-Resistenztests erfolgte zum einen im Agardiffusionstest-Verfahren nach Vorgaben der DIN 58940, zum anderen im Mikrobouillondilutionstest „NCCLS M31-A2“ nach Anweisungen der DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenzen“ (vom 12.03.2003).

Agardiffusionstest: Die Testkeime wurden mittels 1 x PBS auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt und 100 µl dieser Bakteriensuspension auf eine Müller-Hinton-(MH)-Agar ausgeplattiert. Es wurden mit Antibiotika bestückte Filterpapierplättchen (Fa. Oxoid, Basingstoke, England; Fa. BD Biosciences, Heidelberg; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf die beimpften MH-Agarplatten aufgebracht und bei 37 °C für 14-16 h bebrütet. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Durchmesser der Hemmhöfe vermessen und in mm angegeben. Die Auswertung erfolgte anhand der von den Herstellerfirmen angegebenen Breakpoints.

Mikrobouillondilutionstest: Die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK in µg/ml) erfolgte im Mikrobouillondilutionstest nach der Vorschrift des NCCLS (Dokument M31-A2, Vol. 22, No. 6, 2002). Die Chemotherapeutika wurden in Stocklösungen von 5,12 mg/ml in den vom Hersteller (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) angegebenen Lösungsmitteln angesetzt und seriell in log₂-Stufen mittels MHB-Medium verdünnt. Die Auswertung wurde nach einer 18–24-stündigen Inkubation bei 36 °C in einer feuchten Kammer vorgenommen. Als minimale Hemmkonzentration wurde die höchste Verdünnungsstufe des Chemotherapeutikums gewertet, bei der keine Trübung mehr festgestellt werden konnte. Die Auswertung erfolgte anhand der durch den Hersteller angegebenen Breakpoints.

Invasion und intrazelluläres Überleben. Die Invasionsfähigkeit und das intrazelluläre Überleben von *S. Tm.* SL1344 und seiner isogenen *ompW*-Knockout-Mutante wurden in Gentamicin-Protektionsassays bestimmt. Die Gentamicin-Protektionsassays zur Ermittlung der Invasionsfähigkeit wurden mit humanen LoVo-Kolonkarzinom-Epithelzellen (ATCC CCL229), die Assays zur Ermittlung des intrazellulären Über-

lebens mit der murinen Makrophagen-Zelllinie J774A.1 durch die Arbeitsgruppe von Dr. K. Tedin (IMT, FU Berlin) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit *S. Tm.* SL1344 oder seiner isogenen *ompW*-Knockout-Mutante infiziert. Für die Infektion wurden Bakterienkulturen aus der post-exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Kulturen wurden dafür unter Standardbedingungen (37 °C, 180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 inkubiert und anschließend mit dem jeweiligen Zellkulturmedium auf die entsprechende Keimdichte eingestellt. Die Infektion wurde an Zellmonolayern durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation (5 % CO₂, 37 °C) wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch Zellkulturmedium mit Gentamicin-Zusatz (Endkonzentration 50 µg/ml) ersetzt. Intrazellulär lokalisierte Bakterien wurden nach Lyse der infizierten Zellmonolayer (0,1 % Triton X-100, 10 min, RT) nach 1 h, nach 4 h und nach 24 h aus den infizierten Zellen freigesetzt und quantifiziert. Dazu wurden log₁₀-Verdünnungen der Zelllysate auf LB-Nährböden (Wildtyp-Stamm) oder LB-Nährböden mit 50 µg/ml Kanamycin-Zusatz (*ompW*-Knockout-Mutante) ausplattiert und nach 14–16 h Inkubation bei 37 °C die gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt.

3.7 Molekulargenetische Methoden

3.7.1 Präparation von DNS

Plasmid-DNS. Die Präparation von Plasmid-DNS wurde gemäß den Anweisungen der Fa. Qiagen, Hilden, mit dem „Plasmid Midi Kit“ durchgeführt. Hierzu wurde der benötigte Bakterienstamm in 25 ml LBM („high copy“-Plasmide, pET-24b[+]- und pCR8/GW/Topo-Derivate) bzw. 100 ml LBM („low copy“-Plasmide, pBR322 und pHIT-VI-46) mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums (**Tabelle 8**) nach dem Standardverfahren angezüchtet. Nach erfolgter Präparation wurde die Plasmid-DNS in TE-Puffer aufgenommen.

Genomische DNS für DNS-DNS-Hybridisierung. Gram-negative Keime: 1,5 ml LBM-Kultur aus der Standardanzucht wurden zentrifugiert (6.000 x g, 5 min, RT), und das Pellet in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Es folgten die Zugabe von 30 µl SDS (10 %) und 3 µl Proteinase K-Lösung (Endkonzentration 100 µg/ml). Nach einstündiger Inkubation (37 °C) wurden 100 µl NaCl-Lösung (5 M) und 80 µl erwärmte CTAB/NaCl-Lösung zugegeben und weiter inkubiert (65 °C, 10 min). Zur Proteinfällung wurde der Ansatz mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) durch wiederholtes Stürzen des Reaktionsgefäßes (Fa. Eppendorf, Hamburg) gemischt und schließlich zentrifugiert (16.000 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt, mit 5 U RNase (Fa. Qiagen, Hilden) versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Das ganze Gemisch wurde zur weiteren Aufreinigung anschließend einer erneuten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung unterzogen.

Gram-positive Keime: Aus 5 ml Serumbouillon-Übernachtskultur (37 °C, 180 rpm, 14-16 h) wurden die Bakterien abzentrifugiert (10.000 x g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Bakterien-Pellet wurde mit 1 ml *A. dest.* resuspendiert und erneut zentrifugiert (10.000 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 15 min, RT) wurde der Überstand mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung aufgereinigt.

Genomische DNS für PCR. Zum Einsatz von genomischer DNS in PCR-Ansätzen wurden 50 µl einer Bakterienkultur aus der Standardanzucht mit 100 µl *A. dest.* versetzt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

3.7.2 Aufreinigung von DNS

Ethanol-fällung. Die fragliche DNS-Lösung wurde mit 3 Vol absolutem Ethanol (-20 °C) sowie 1/10 Vol Na-Azetat (3 M) versetzt. Das Gemisch wurde dann für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 Vol Ethanol (70 %) überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (16.000 x g, 5 min, RT) wurde der Ethanol abgezogen, und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl *A. dest.* gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung. Es wurde der fraglichen DNS-Lösung 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) zugesetzt, durch Stürzen gemischt und zentrifugiert (16.000 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde für eine weitere Fällung mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, erneut durch Stürzen gemischt und anschließend zentrifugiert (16.000 x g, 5 min, RT). Aus dem Überstand wurde die DNS mit Ethanol gefällt und anschließend in *A. dest.* gelöst.

Aufreinigung für die homologe Rekombination. Die DNS-Lösung wurde einer Phenol-Chloroform-Fällung unterzogen. Dazu wurden 300 µl eines Reaktionsansatzes aus der Template-PCR mit 500 µl Phenol durch Vortexen gemischt. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 3 min, RT) wurde die Phenolphase verworfen und der verbliebene Reaktionsansatz mit 600 µl Chloroform vermischt und zentrifugiert (16.000 x g, 3 min, RT). Danach wurde die Chloroformphase verworfen. Die Chloroformzugabe mit anschließender Zentrifugation wurde einmal wiederholt. Danach wurde der Reaktionsansatz einer Ethanol-fällung unterzogen, und das DNS-Pellet wurde schließlich in 50 µl *A. dest.* gelöst.

3.7.3 Bestimmung von DNS-Konzentrationen

Photometrische Bestimmung. Die Bestimmung von DNS-Konzentrationen in wässrigen Lösungen erfolgte in einem Beckman Photometer des Typs DU-640 (Fa. Beckman Instruments, Inc. Fullerton, USA) wobei die Konzentration der DNS nach der Formel:

$$\text{ssDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320} - \text{OD}_{260}) \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ \text{bzw.}$$

$$\text{dsDNS-Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{320} - \text{OD}_{260}) \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

errechnet wurde.

Abschätzung im Agarosegel. Bei der Abschätzung von DNS-Mengen durch Agarosegelelektrophorese wurden als Marker der „100 bp Ladder“ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) oder „ λ -HindIII/EcoRI“ (Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth) in definierter Menge auf dem Agarosegel mitgeführt. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der einzelnen Markerbanden mit der Probenbande konnte dann die DNS-Konzentration des fraglichen DNS-Fragments unter Berücksichtigung der eingesetzten Mengen an Marker und Probe abgeschätzt werden.

3.7.4 Restriktion von DNS

Genomische DNS. Für den Nachweis von *ompW* mittels DNS-DNS-Hybridisierung wurde, wie im Kapitel 3.7.1 beschrieben, genomische DNS gewonnen. In einem 20 μl Restriktionsansatz wurden anschließend 2-5 μg der genomischen DNS mit *Asel* bzw. *NaeI* inkubiert (14-16 h, 37 °C). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Restriktionsansätze bei 4 °C gelagert.

Für den Einsatz in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wurde in Agarosegelblöckchen eingebettete DNS mit *XbaI* verdaut (Kapitel 3.7.7). Dazu wurden die Blöckchen zunächst in 250 μl Restriktionspuffer (1 x BSA in NEB2-Puffer) äquilibriert (1 h, RT), bevor die eingebettete DNS in 250 μl frischem Restriktionspuffer verdaut wurde (14-16 h, 37 °C).

Plasmid-DNS und PCR-Amplifikate. Die Restriktion von DNS wurde stets mit nur einem Enzym pro Ansatz durchgeführt. Präparierte Plasmid-DNS bzw. Ethanol-gefällte PCR-Amplifikate (siehe Kapitel 3.7.2) wurden für die Ligation mit den in **Tabelle 11** aufgeführten Restriktionsenzymen verdaut.

Für die gerichtete Klonierung in den Vektor pET-24b(+) erfolgte die Restriktion mit *HindIII* und *NdeI* zur Generierung von „sticky ends“. Es wurden 5-10 μg Vektor-DNS mit 10-50 U *NdeI* in Puffer „R+“ bzw. *HindIII* in Puffer „R“ für 14-16 h inkubiert. Restriktionsschnittstellen für diese beiden Enzyme waren im pET-24b(+)-Vektor jeweils

nur einmal im Bereich der Multiple Cloning Site (MCS), jedoch nicht im Bereich der kodierenden Sequenzen der zu klonierenden Gene zu finden. Die gewünschten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *NdeI* wurden über die PCR-Primer in das zu klonierende PCR-Amplifikat eingeführt.

Zur Klonierung in pBR322 wurden von Vektor und *ompW*-Insert (XL-PCR Amplifikat: STU-38/STD-39) 5 µg DNS mit 20 U *Scal* im Puffer NEB3 für 14-16 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktion mit dem Enzym *Scal* erzeugt keine Überhänge, so dass die Ligation ungerichtet erfolgt („blunt end“-Ligation). Die *Scal*-Schnittstelle im Vektor lag im Ampicillin-Resistenzgen *bla*. Um eine Religation der Vektorenden zu unterdrücken, wurden die 5'-Vektorenden dephosphoryliert (Kapitel 3.7.9). Die Restriktionsschnittstellen des Inserts wurden über modifizierte Primer im Zuge der PCR-Amplifikation eingeführt (**Tabelle 12**).

Tabelle 11: Verwendete DNS-Restriktionsenzyme

Enzym	Verwendungszweck	Units/ Ansatz	Puffer	Bezugs- quelle
<i>AseI</i>	Genomische DNS für DNS-DNS-Hybridisierung: Nachweis von <i>ompW</i> in Stammsammlungen, Verifizierung <i>ompW</i> -Knockout-Mutante	10-30	NEB3	NEB
<i>HindIII</i>	„sticky-end“-Ligation in pET-24b(+)	10-50	R	MBI
<i>NaeI</i>	Genomische DNS für DNS-DNS-Hybridisierung: Verifizierung <i>ompW</i> -Knockout-Mutante	30	A	Roche
<i>NdeI</i>	„sticky-end“-Ligation in pET-24b(+)	10-50	R+	MBI
<i>Scal</i>	„blunt-end“-Ligation in pBR322	20	NEB3	NEB
<i>XbaI</i>	Genomische DNS für Pulsfeld- Gelelektrophorese	100	NEB2, BSA	NEB

Erläuterung: **NEB**, Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt; **MBI**, Fa. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth; **Roche**, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

3.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Oligodesoxyribonukleotide. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (**Tabelle 12**) wurden von der Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen. Alle Primer wurden in *A. dest.* gelöst, auf eine Endkonzentration von 20 μM eingestellt und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Standard-PCR. Soweit in dieser Arbeit nicht explizit erwähnt, wurde die folgende Standard-PCR durchgeführt: Ein 30 μl Reaktionsansatz enthielt 133 μM dNTP je Nukleotid (Fa. Hybaid, Heidelberg), 0,5 μM je Primer, 2 mM MgCl_2 , 1x NH_4 -Puffer, 0,03 U/ μl Panscript-Polymerase (alle Reagenzien Fa. PAN Systems GmbH, Aidenbach), sowie 3 μl genomische DNS-Lösung.

Das PCR-Programm umfasste einen Denaturierungsschritt bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min, danach 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierungsphase ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$), 60 s Anlagerungsphase ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$) und einer Extensionsphase ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$), die der errechneten Länge des Amplikons angepasst wurde (60 s/1.000 bp). Abschließend folgte eine Extensionsphase von 5 min ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Markierungs-PCR. Markierte Gensonden wurden mittels PCR hergestellt. Ein Reaktionsansatz (50 μl) enthielt: 0,5 U *Tfl*-Polymerase, 1 x *Tfl*-PCR-Puffer (beides Fa. Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf), Primer in einer Enkonzentration von je 1 μM , die Nukleotide dATP, dCTP und dGTP von je 200 μM , dTTP in einer Konzentration von 160 μM (Fa. AGS, Heidelberg), 33 μM Dig-11-UTP (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 10 μl DNS-Lösung. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 5 min Denaturierung ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$), dann 30 Zyklen mit je 30 s Denaturierung ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$), 30 s Anlagerungsphase ($55\text{ }^{\circ}\text{C}$) und 2 min 30 s Extension ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Abschließend folgte noch ein Zyklus von 5 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die DIG-Markierung von PCR-Amplifikaten wurde anhand ihrer gegenüber unmarkierten Amplifikaten verminderten elektrophoretischen Mobilität im Agarosegel überprüft. Nach Durchführung der PCR wurden die Reaktionsansätze bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Hybridisierung wurden 6 μl dieser Ansätze in 10 ml Hybridisierungslösung aufgenommen.

XL-PCR. Zur Herstellung von Klonierungsinserts und Sequenzierungsmatrizen aus der *stm1733-ompW-katN*-Region von *Salmonella*-Stämmen wurde eine Polymerase mit „proof-reading“-Aktivität gewählt (*rTth* XL Polymerase, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Reaktionsgemische hatten ein Volumen von insgesamt 50 μl , wobei 1 μl DNS-Lösung in die Reaktion eingesetzt wurde. Des Weiteren enthielt jeder Ansatz 1,6 U XL-Polymerase, 1,1 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0,32 μM von jedem Primer und 320 μM je Desoxyribonukleotid (Fa. PAN Systems GmbH, Aidenbach). Das Thermocycler-Programm setzte sich zusammen aus einer anfänglichen Denaturierungsphase ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$) von 1 min, gefolgt von 32 Zyklen mit je 15 s Denaturierung ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$) und 5 min Anlagerungs- und Extensionsphase ($57\text{ }^{\circ}\text{C}$), wobei sich diese Zeit ab dem

16. Zyklus um jeweils 15 s/Zyklus verlängerte. Die abschließende Verlängerungsphase dauerte 10 min (72 °C).

Template-PCR für die homologe Rekombination. Ausgehend von dem sogenannten Template-Plasmid pKD4 wurde in dieser PCR eine Kanamycin-Resistenzkassette amplifiziert, die später im Zuge des Rekombinationsereignisses das Zielgen im *Salmonella*-Chromosom substituieren sollte. Verwendet wurden zur Amplifikation Primer, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzten. Sie bestanden zum einen aus den Primersequenzen P1 bzw. P2 nach Wanner und Datsenko (Datsenko & Wanner, 2000), die entsprechend stromauf- bzw. stromabwärts der Resistenzkassette im Template-Plasmid banden, und zum anderen aus den 40 bp großen sogenannten „homologen Extensionen“ H1 bzw. H2, die jeweils am 5'-Ende von P1 bzw. P2 angehängt wurden. Bei den „homologen Extensionen“ handelte es sich um Oligonukleotide, die in ihrer Sequenz den beiden das Zielgen flankierenden DNS-Abschnitten homolog waren. Zielgen war das *ompW* im Chromosom des *S. Tm.* Stammes SL1344. Die homologen Extensionen befanden sich im Chromosom von *S. Tm.* LT2 (Genbank-eintrag #AE008777) an den Positionen 3261 - 3222 (H1) und 2612 - 2651 (H2) (Fuentes *et al.*, 2005).

Die PCR-Ansätze umfassten je 50 µl, wobei 1 µl aufgereinigtes Template-Plasmid pKD4 (10 ng) pro Reaktion eingesetzt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 240 µg je dNTP (Fa. PAN Systems GmbH, Aidenbach), 0,8 µM je Primer, 1,75 mM MgCl₂, 0,02 U/µl Ampli-Taq Polymerase und Reaktion-Buffer II (Fa. Applied Biosystems, über Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler („Whatman[®]“, Fa. Biometra GmbH, Göttingen) nach dem folgenden Profil durchgeführt: 5 min Denaturierung (94 °C), dann 33 Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung (94 °C), 1 min Anlagerung (55 °C) und 3 min Verlängerung (72 °C). Abschließend folgte eine terminale Verlängerung für 5 min bei 72 °C.

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide

Primer-Name	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation der Zielsequenz	Position ¹⁾	Datenbank-Nr./Referenz
k1	kan-spezifische PCR	CAGTCATAGCCGAAATAGCCT	pKD4	510-529	#AY048743
k2	kan-spezifische PCR	CGGTGCCCTGAAATGAACTGC	pKD4	<u>620-639</u>	#AY048743
kt	kan-spezifische PCR	CGGCCACAGTCGATGAATCC	pKD4	<u>1071-1090</u>	#AY048743
M13f	insertumgreifende PCR	GTAAAAACGACGGCCAG	pCR8/GW/Topo [®]	537-552	Invitrogen
M13r	insertumgreifende PCR	GTCATAGCTGTTTCCCTG	pCR8/GW/Topo [®]	<u>836-852</u>	Invitrogen
OmpW_H1_OMP1	ompW-Knockout-Primer	ATGGAGCGGGTATGAAAAAATTTACAGTGG CGGCACATGGCC TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	ompW	<u>3261-3222</u>	#AE008777, Fuentes (2005)
OmpW_H2_OMP2	ompW-Knockout-Primer	TTAGAAAACGATAGCCTGCCGAGAACATAAA TACCCATGGG CAATATGAATATCCTCCTTAG	ompW	2612-2651	#AE008777, Fuentes (2005)
pBR322-fw	insertumgreifende PCR	TCGTTGTCAGAAAGTAAAGTTGG	pBR322	3736-3756	NEB
pBR322-rev	insertumgreifende PCR	TGAGATCCAGTTCGATGTAAC	pBR322	<u>4006-4026</u>	NEB
pET-A	insertumgreifende PCR	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET-24b(+)	64-87	Novagen
pET-B	insertumgreifende PCR	CCCCGAAAATTAATACGACTCAC	pET-24b(+)	<u>314-336</u>	Novagen
pKD46_1	plasmidspezifische PCR	TACTGAAAAC TGAGATCAAGC	pKD46	1255-1274	#AY048746
pKD46_2	plasmidspezifische PCR	TTAACTCAACAGAAAGATGCT	pKD46	<u>3288-3307</u>	#AY048746
SIA-1	Salmonellen-spezifische PCR	GGCATATTCGATCAGTACCA	invA	321-340	#M90846
SIA-2	Salmonellen-spezifische PCR	GTAAAAGCTGGCTTTCCCTTT	invA	<u>614-633</u>	#M90846
STD-14	Sequenzierung	TATACCTCCCTGCTGGCG	yciE	1456-1473	#AE008777
STD-15	Sequenzierung	GCAGGAGGCAATATGTTTCG	katN	1640-1659	#AE008777

Fortsetzung der Tabelle 12 auf der nächsten Seite

Tabelle 12 (Fortsetzung)

Primer-Name	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation der Zielsequenz	Position ¹⁾	Datenbank-Nr./Referenz
STD-16	Sequenzierungstemplate, Sequenzierung	GTGGCATGTTCCCTTCCG	<i>yciE</i>	1381-1399	#AE008777
STD-17	<i>katN</i> -spezifische PCR, Sequenzierungstemplate, Sequenzierung	GGCTCACTGGTAGGAATGC	<i>katN</i>	1868-1886	#AE008777
STD-18	Sequenzierung	AGTCGGCACACCAGCTCTC	<i>katN</i>	2194-221	#AE008777
STD-21	Sequenzierung	CGGCATTTTACCATTATCG	<i>ompW</i>	2824-2843	#AE008777
STD-22	Sequenzierung	CACCCGCCCTTCTGTAG	<i>ompW</i>	3121-3138	#AE008777
STD-23	Sequenzierung	TTCAGATCAATTTTGACATATTC	<i>upstream ompW</i>	3403-3435	#AE008777
STD-33	<i>stm1733</i> -spezifische PCR, Sequenzierung	ATGAGCGTTCTTAACCCCATG	<i>stm1733</i>	3588-3607	#AE008777
STD-34	<i>ompW</i> -spezifische PCR/Sonde, Sequenzierung	TGCCGAGAACATAAAATACCC	<i>ompW</i>	2627-2646	#AE008777
STD-35	Klonierung <i>stm1733</i>	GTTTTTTGCAGGTGACATATGAGCGTTC	<i>stm1733</i>	3570-3597	#AE008777
STD-37	Klonierung <i>katN</i>	AATAATAAGCAGGAGGCCATATGTTTCG	<i>katN</i>	1632-1659	#AE008777
STD-38	Klonierung <i>ompW</i> (pET-24b[+])	CACAAATCACGAAAGCTTGAAAACGATAG	<i>ompW</i>	<u>2597-2624</u>	#AE008777
STD-39	Klonierung <i>ompW</i> (pBR322)	TCGTCAACAACATCAGTACTTTAGAAAACGAT	<i>ompW</i>	<u>2593-2622</u>	#AE008777
STU-16	Sequenzierung	TACAGAAAGGGCGGGTGG	<i>ompW</i>	3120-3137	#AE008777
STU-18	Sequenzierung	TCTAATCGCGTGATGTTGTG	<i>ompW</i>	2597-2616	#AE008777
STU-19	<i>katN</i> -spezifische PCR, Sequenzierung	GCCTTCCGACATGTTGTAG	<i>katN</i>	<u>2293-2311</u>	#AE008777

Fortsetzung der Tabelle 12 auf der nächsten Seite

Tabelle 12 (Fortsetzung)

Primer-Name	Verwendungszweck	Sequenz (5' → 3')	Lokalisation der Zielsequenz	Position ¹⁾	Datenbank-Nr./Referenz
STU-29	<i>ompW</i> -spezifische PCR/Sonde, Sequenzierung	ATGAAAAAAATTACAGTGGCGG	<i>ompW</i>	<u>3229-3250</u>	#AE008777
STU-30	<i>stm1733</i> -spezifische PCR, Sequenzierungstemplate, Sequenzierung	TTAAATTTGCGGGCAATTGTA	<i>stm1733</i>	<u>3973-3992</u>	#AE008777
STU-33	Klonierung <i>ompW</i> (pET-24b[+])	CATAACGATGGAGCGCATATGAAAAAAT	<i>ompW</i>	3241-3268	#AE008777
STU-35	Klonierung <i>stm1733</i>	CTCCTTGAGTTTTTGCAGAAAGCTTATTTG	<i>stm1733</i>	<u>4012-4040</u>	#AE008777
STU-36	Klonierung <i>katN</i>	GATTTTACTTGTGCGGAAGCTTCTTGCT	<i>katN</i>	<u>2548-2576</u>	#AE008777
STU-37	Sequenzierungstemplate	TAGCGTTGCCGATAAGCC	<i>yciC</i>	<u>4290-4307</u>	#AE008777
STU-38	Klonierung <i>ompW</i> (pBR322)	GGTTAAGAAACAGTACTGATTCACCTGCAAA	<i>upstream ompW</i>	3574-3603	#AE008777
STY-3	Salmonellen-spezifische PCR	GTTAATCCTGTTGTCTCGCT	<i>stn</i>	348-367	#L 16014
STY-4	Salmonellen-spezifische PCR	CAGAGAACTGCTTGATGCAA	<i>stn</i>	<u>1035-1054</u>	#L 16014

Erläuterung: 1) Positionsangaben beziehen sich auf die angegebenen Referenzen oder den NCBI-Datenbankeintrag;

fett, P1 bzw. P2-Anteil der Knockout-Primer;

unterstrichen, reverse Primer.

3.7.6 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNS-Gemischen erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 0,5-3 % (w/v) Agarose („Rotigarose“; Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 1 x TAE-Laufpuffer. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von ca. 10 V pro Zentimeter Elektrodenabstand für ein bis 16 Stunden angelegt. Bei der Auftrennung von PCR-Produkten wurden die Gele vor dem Gießen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte nach Mischen der DNS-Probe im Verhältnis von 1:6 (v:v) mit 6 x Loading-Puffer. Zur Bestimmung der molekularen Masse von DNS-Fragmenten wurden die molekularen Massen-Marker „GeneRuler® 100 bp DNS Ladder Plus“ oder „1 kB-Ladder“ (Fa. MBI Fermentas, St.Leon-Rot) mitgeführt. Zur Anfärbung von Plasmid-DNS wurden die Gele ohne Zusatz von Ethidiumbromid gegossen und erst nach der Auftrennung für 10 min in ein Ethidiumbromid-Bad (2 mg/l) eingelegt. Die Visualisierung der Ethidiumbromid-gefärbten DNS erfolgte durch UV-Licht. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Aufnahmen mit einem Bilddokumentationssystem (Modell E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab, Wiesloch) angefertigt und in Form von Papierausdrucken sowie als digitalisierte Bilder im TIFF-Format archiviert.

3.7.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Einbettung der DNS. Ausgangsmaterial für die Pulsfeld-Gelelektrophorese waren 5 ml einer auf eine $OD_{600} = 0,3$ eingestellten Bakterienkultur. Dazu wurde eine Kultur, die im Standardverfahren angezüchtet wurde, im Verhältnis 1:50 (v/v) in LBM inokuliert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (3.300 x g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PET IV-Puffer resuspendiert. Die Zentrifugation wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Pellet in 0,5 ml PET IV-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die so behandelte Kultur wurde in 1,5 %-iger Incert Agarose („DNA-Grade Pulsed Field Certified Agarose“; Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) im Verhältnis 1:1 (v/v) eingebettet. Dazu wurden Incert-Agarose und Bakteriensuspension auf 56 °C angewärmt und dann vorsichtig miteinander gemischt. Dieses Gemisch wurde unverzüglich in einem Ethanol-gereinigten Gießstand (Typ „15-Well Comb, 100 µl“, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zu Agarose-Blöckchen mit je 100 µl Volumen gegossen. Die Blöckchen erstarrten innerhalb von 15 min bei 4 °C. Pro Bakterienstamm wurden drei Blöckchen hergestellt. Die Lyse der eingebetteten Bakterien erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml PFGE-Lysepuffer für je drei Blöckchen und Inkubation für drei Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde die PFGE-Lyselösung verworfen und durch 3 ml ES-Puffer ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 14-16 h bei 56 °C im Wasserbad. Der ES-Puffer wurde verworfen und die Blöckchen mit 3 ml *A. dest.* für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das *A. dest.* verworfen und durch 2 ml TE-PMSF ersetzt und darin schwenkend inkubiert (30 min, RT). Das TE-PMSF wurde verworfen und durch frisches TE-PMSF für eine erneute Inkubation unter selben Bedingungen ersetzt. Die so behandelten Blöckchen wurden nun in 3 ml *A. dest.* (15 min, RT) und anschließend zweimal in 3 ml

TE (10:1) schwenkend (je 30 min, RT) gewaschen und schließlich in 5 ml frischem TE (10:1) inkubiert (16 h, 4 °C). Die Blöckchen mit der eingebetteten bakteriellen DNS wurden dann der Restriktion unterzogen (Kapitel 3.7.4).

Durchführung der PFGE. Die eingebettete DNS wurde in einem 1 %-igen Agarosegel mittels hexagonaler Pulsfeld-Gelelektrophorese in 0,5 x TBE-Puffer aufgetrennt. Dazu wurden die Blöckchen in die Geltaschen platziert und mit temperierter Agarose (50 °C) eingegossen. Es wurde ein Größenstandard mitgeführt („Pulse Marker“ 50-1.000 kB und 225-2.200 kB; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Elektrophorese erfolgte unter den in **Tabelle 13** beschriebenen Bedingungen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (2 mg/l) und anschließend in *A. dest.* inkubiert (1 h, RT). Die DNS-Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Bilddokumentationssystem (Modell E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab, Wiesloch) dokumentiert. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Bandenmuster im Bereich von 50 kB bis etwa 2200 kB miteinander.

Tabelle 13: Bedingungen der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Parameter	Einheit	Lauf I	Lauf II
Spannung	V/cm ²	6	6
Pulszeiten	s	7-12	20-40
Gesamtdauer	h	11	13
Temperatur	°C	14	14

3.7.8 DNS-DNS-Hybridisierung

Dot-Blot. Die positiv geladene Nylonmembran (Typ 1417240; Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde erst mit *A. dest.*, dann mit 2 x SSC befeuchtet und danach auf einem mit *A. dest.* befeuchteten Filterpapier („GB 022 Gel Blotting Paper“, Fa. Schleicher & Schuell, über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf) in den Dot-Blot-Apparat (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingespannt. Die DNS-Proben wurden 10 min gekocht, auf Eis gekühlt und mit Hilfe des Gerätes durch Unterdruck punktförmig auf die Membran aufgebracht. Zur Fixierung der DNS wurde die Membran für 30 min bei 80 °C inkubiert und anschließend mit UV-Licht (Oberseite: 3 J/cm², Unterseite: 1,5 J/cm²) bestrahlt („Stratalinker[®] 1800“, Fa. Stratagene, Heidelberg).

"Downward" Southern-Blot. Der Transfer von DNS aus Agarosegelen auf Membranen erfolgte im Kapillarblotverfahren nach Southern in der „Downward“-Modifikation nach Chomczynski (1992). Hierbei wurde die DNS-Fragmente mittels Elektrophorese

in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Färben der DNS mit Ethidiumbromid und dem Photographieren wurde das Gel in einem „Stratalinker® 1800“ UV-Licht mit einer Energiedichte von 60 mJ/cm² ausgesetzt. Dann wurde die doppelsträngige DNS durch zweimaliges Schwenken in HCl-Lösung für 15 min und anschließendes Schwenken für 30 min in Denaturierungslösung depuriniert. Die Nylonmembran (Typ 1417240, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde für 20 min in *A. dest.* äquilibriert. Der Aufbau des Transfersystems entsprach dem folgenden Prinzip: auf eine ca. 10 cm dicke Schicht aus saugfähigem Papier folgten zwei trockene Filterpapiere, zwei in Transferlösung getränkte Filterpapiere, dann die äquilibrierte Nylonmembran, das Agarosegel, noch einmal vier in Transferlösung getränkte Filterpapiere und schließlich zwei Papierbrücken aus Filterpapier, deren Enden in das Reservoir der Transferlösung eintauchten. Der Transfer wurde über zwei Stunden bei RT durchgeführt. Beim Abbau des Systems wurden die Positionen der Slots auf der Nylonmembran mit einem Stift markiert. Die Gele wurden zur Kontrolle erneut mit Ethidiumbromid gefärbt, um den vollständigen Transfer der DNS auf die Membran zu überprüfen. Die Membran wurde für 10 min in Neutralisationslösung geschwenkt und dann für 15 min bei RT auf einem Filterpapier getrocknet. Zur Fixierung der DNS an die Membran wurde der Blot dann für 30 min bei 120 °C erhitzt.

DNS-DNS-Hybridisierung. Die Hybridisierung von DNS mit Digoxigenin-markierten DNS-Gensonden und die Chemilumineszenz-Detektion der DNS-DNS-Hybride erfolgte mit dem „DIG luminescent detection kit“ (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Hierzu wurde die Membran in verschraubbare Glasröhren platziert und nach Zugabe von 25 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membran für 1 h bei 42 °C in einem Hybridisierungssofen (Typ Maxi Hybridisation Oven, Fa. Hybaid Limited, Teddington, Middlesex, USA) vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurde die in Hybridisierungslösung aufgenommene DNS-Sonde für 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die in der Glasröhre befindliche Hybridisierungslösung wurde verworfen, durch die mit Sonde versetzte Hybridisierungslösung ersetzt und die Röhre für weitere 16 h bei 42 °C inkubiert. Die Membran wurde anschließend entnommen und in einer verschlossenen Plastikschaale bei RT unter ständigem Schwenken zweimal für je 5 min nichtstringent in DNS-Waschlösung 1 gewaschen. Das stringente Waschen der Dot-Blots wurde bei 80 °C, 70 °C bzw. 60 °C und das der Southern-Blots bei 65 °C, 55 °C bzw. 45 °C für zweimal 15 min mit DNS-Waschlösung 2 durchgeführt.

Detektion. Um die Hybride aus Proben- und Gensonden-DNS sichtbar zu machen, wurden die Blots bei RT in verschiedenen Pufferlösungen geschwenkt. Nachdem die Blots zunächst für 5 min mit DNS-Waschpuffer (Detektionspuffer 1 mit 0,3 % Tween 20) gewaschen worden waren, wurden freie Bindungsstellen der Membranmatrix geblockt, indem die Blots für 30 min in Detektionspuffer 2 inkubiert wurden. Zur Immundekoration wurde die Membran für 30 min in Detektionspuffer 2 mit „Anti-DIG-AP-Fragment“ (Verdünnung 1:10.000 [v/v], Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) geschwenkt. Danach folgten zwei Waschdurchgänge mit DNS-Waschpuffer von je 15 min. Als Substrat kam CSPD-Gebrauchslösung (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zur Anwendung, in der der Blot für 5 min inkubiert wurde. Zur Visualisierung des Chemilu-

mineszenssignals wurde der Blot in einen Klarsichtkunststoffbeutel eingeschweißt, 10 min bei 37 °C inkubiert und für 1 Stunde auf einem Röntgenfilm („Cronex® Medical X-Ray Film 4“; Fa. Sterling Diagnostic Imaging Inc., durch Fa. Siemens, Erlangen) exponiert.

3.7.9 Klonierung

3.7.9.1 Klonierung der Gene *stm1733* und *ompW* in den pET-24b(+)-Vektor

Strategie. Zur Herstellung der rekombinanten Fusionsproteine wurde ein PCR-Amplikon von *S. Tm.* ATCC19585 gerichtet, das heißt unter Berücksichtigung der Orientierung sowie unter Erhaltung des Leserahmens in den pET-24b(+)-Expressionsvektor kloniert. Über die modifizierten reversen Primer wurde gleichzeitig das Stop-Kodon des jeweiligen Zielgens zerstört, so dass die entsprechende Histidin-Marker-kodierende Sequenz des Vektors bei der Translation mit abgelesen wurde und in einem rekombinanten mit Histidin markierten Fusionsprotein resultierte.

Vorbereitung der DNS. Zur Herstellung des Inserts wurde zunächst das Gen *stm1733* mit dem PCR-Primerpaar STU-35/STD-35 und das Gen *ompW* mit dem PCR-Primerpaar STU-33/STD-38 an den Enden mit den Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* versehen und in einer XL-PCR vervielfältigt. Das PCR-Amplifikat wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, und die entsprechende DNS-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Das PCR-Amplikon wurde mit einem Gelextraktionskit („QIAEx II Kit“; Fa. QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben aus der Agarose eluiert und in *A. dest.* gelöst. Das so gereinigte PCR-Produkt und der gereinigte pET-24b(+)-Plasmidvektor (Kapitel 3.7.1) wurden in getrennten Ansätzen und nacheinander mit *NdeI* und *HindIII* verdaut (Kapitel 3.7.4) und nach jeder Restriktion über eine Gelextraktion aufgereinigt. Die so vorbereitete DNS wurde für die Ligationen verwendet.

Ligation. Die sticky-end Ligation der restringierten DNS-Fragmente wurde in Doppelansätzen mit 25 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Sie enthielten 0,5 U T4-Ligase in 1 x Ligationspuffer (beides Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 400 ng Vektor-DNS und Insert-DNS in einem molaren Verhältnis von 1:4 und 1:8 (Vektor:Insert). Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 4 °C (Sambrook *et al.*, 1989).

Transformation. Es wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* BLR(DE3) mittels Hitzeschock transformiert, wie in Kapitel 3.7.10 beschrieben.

3.7.9.2 Klonierung des *katN*-Gens in den pET-24b(+)-Vektor

Strategie. Die Strategie zur Klonierung von *katN* in den pET-24b(+)-Plasmidvektor entsprach der Klonierungsstrategie von *ompW* und *stm1733*, allerdings wurde das PCR-Amplikon zunächst in den Vektor pCR®8/GW/TOPO® zwischenkloniert. Für die Zwischenklonierung des PCR-Amplikons wurde das TOPO TA Cloning® Kit verwendet

(Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe), dabei wurde das Produkt aus einer Standard-PCR über die durch die Tag-Polymerase generierten A-Überhänge mittels einer Topoisomerase in den Zwischenvektor integriert. Die Topoisomerase war kovalent an den Vektor gebunden und inserierte das PCR-Produkt zwischen zwei spezifischen Topoisomerase-Erkennungssequenzen (TOPO1, TOPO2). Das resultierende rekombinante Plasmid wurde in dem *E. coli* TOP10 vermehrt und anschließend isoliert (Kapitel 3.7.1). Danach konnte das *katN*-Insert über die eingeführten *NdeI*- und *HindIII*-Schnittstellen aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und für die Ligation mit dem pET-24b(+)-Plasmidvektor verwendet werden.

Vorbereitung der DNS. Zur Herstellung des Inserts wurde *katN* unter Verwendung des Primerpaares STU-36/STD-37 am 5'-Ende mit einer *NdeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende mit einer *HindIII*-Schnittstelle versehen und amplifiziert. Die Integration des Inserts in den Vektor erfolgte durch die Topoisomerase. Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 6 µl und beinhaltete 50 ng augereinigtes PCR-Amplifikat („QIAquick PCR Aufreinigungskit“; Fa. QIAGEN GmbH, Hilden) und 1 µl Vektor pCR[®]8/GW/TOPO[®]. Der Ansatz wurde in dem mitgelieferten Puffer („salt solution“) für 5 min bei 25 °C inkubiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert.

Transformation in *E. coli* TOP10. Die Transformation von 5 µl des Ligationsansatzes erfolgte nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock. Hierfür wurden 50 µl der im Kit enthaltenen chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 verwendet.

Ligation in pET-24b(+). Nach Plasmidpräparation des Zwischenvektors (pHIT-IV-30) und Verifizierung durch PCR und Sequenzierung wurde das Insert mittels *NdeI* und *HindIII* aus dem Zwischenvektor herausgeschnitten und mittels Bandenelution aus einem Agarosegel nach Herstellerangaben („QIAEx II Kit“; Fa. QIAGEN GmbH, Hilden) aufgereinigt. Das aufgereinigte Insert wurde für die Ligation in den pET-24b(+)-Vektor eingesetzt, wie zuvor für die Gene *stm1733* und *ompW* beschrieben.

Transformation in *E. coli* BLR(DE3). Es wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl chemisch kompetenten *E. coli* BLR(DE3) mittels Hitzeschock transformiert, wie in Kapitel 3.7.10 beschrieben.

3.7.9.3 Klonierung von *ompW* in pBR322 zur Komplementierung von SL1344Δ*ompW*

Strategie. Zur Komplementierung der *ompW*-Knockout-Mutante von *S. Tm.* SL1344 sollte das Gen *ompW* über ein Plasmid wieder eingeführt werden. Dazu wurde das *ompW*-Gen mit seinem gesamten stromaufwärts gelegenen intergenischen Bereich in die *Scal*-Schnittstelle des low-copy Plasmids pBR322 kloniert. Die Insertion des Amplikons führte zu der Zerstörung des Ampicillin-Resistenzgens *bla* von pBR322.

Vorbereitung der DNS. Zur Herstellung des Inserts wurde *ompW* in einer XL-PCR mit Hilfe des Primerpaares STU-38/STD-39 an beiden Enden mit einer *ScaI*-Schnittstelle versehen und amplifiziert. Das PCR-Amplifikat wurde in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechende DNS-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Das PCR-Amplikon wurde wie bei den Klonierungen in den pET-24b(+)-Vektor mit einem Gelextraktionskit nach Herstellerangaben aus der Agarose eluiert und in *A. dest.* gelöst. Das so gereinigte PCR-Amplikon und der pBR322-Plasmidvektor wurden mit *ScaI* verdaut, wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben, und nach der Restriktion erneut über eine Geextraktion aufgereinigt. Zur Verhinderung von Selbstligationen des *ScaI*-geschnittenen Vektors erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Vektorenden. Hierzu wurden in einem 50 µl Ansatz 10 µg *ScaI*-geschnittener Vektor pBR322 mit 5 U alkalischer Phosphatase („Calf Intestine Phosphatase“; Fa. New England Biolabs, Frankfurt) im mitgelieferten Puffer („Dephosphorylierungspuffer“) für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zur Inaktivierung des Enzyms mit 5 mM Di-Natrium-EDTA (pH 8,0) versetzt und bei 75 °C für 10 min inkubiert und einer Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Fällung unterzogen. Die so vorbereitete DNS wurde für die Ligationen verwendet.

Ligation. Die Ligation erfolgte in zwei 20 µl Ansätzen mit 130 ng *ScaI* geschnittener, dephosphorylierter Vektor-DNS und Zugabe von Insert im molaren Verhältnis 1:4 bzw. 1:8 (Vektor:Insert). Es wurde 1 U T4-Ligase im mitgelieferten „T4 DNS-Ligase Puffer“ (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) für die Reaktion eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 14 °C.

Transformation. Es wurden 10 µl des Ligationsansatzes und 100 µl chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) mittels Hitzeschock transformiert, wie in Kapitel 3.7.10 beschrieben. Das resultierende Plasmid, pHIT-VI-46, wurde zunächst mittels PCR und Sequenzierung charakterisiert und erst anschließend in die *ompW*-Knockout-Mutante transformiert. Die Transformation erfolgte durch Elektroporation von 1 µl gereinigtem Plasmid in 50 µl der elektrokompetenten *ompW*-Knockout-Mutante *S. Tm.* SL1344Δ*ompW* (Kapitel 3.7.10).

3.7.10 Transformation mit DNS

Transformation durch Hitzeschock. Zur Transformation wurden chemisch-kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzepuls von 90 s bei 42 °C wurde die Zellsuspension erneut für 2 min auf Eis gelagert. Danach wurde sie mit 4 Vol LBM versetzt und für 60 min bei 37 °C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LBA-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation. Für die Elektroporation von DNS in elektrokompetente Zellen wurde am Elektroporator („Biorad Gene-Pulser® II Electroporation System“; Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) der 25 µFD Konden-

sator bei einem Gerätewiderstand von 200 Ω gewählt. Die Elektroporation erfolgte in einer 0,1 cm Küvette („Gene Pulser[®] Cuvettes“; Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer Spannung von 1,8 kV, so dass die erreichte Feldstärke optimaler Weise in einem Bereich von 16-19 kV/cm lag. Die Zeitkonstante, in welcher der Spannungspuls in der Küvette die gewünschte Stärke erreichte, wurde vom Gerät registriert und als Kontrollwert notiert. Sie betrug in der Regel zwischen 3,0 und 4,3 ms. Die Küvetten, der Küvettenschlitten und die verwendeten Lösungen wurden eisgekühlt verwendet. Im Weiteren wurden die Elektroporationsansätze behandelt wie nach der Hitzeschockbehandlung.

3.7.11 Generation einer *ompW*-Deletionsmutante von *S. Tm.* SL1344

Die nachfolgend beschriebene Herstellung einer *ompW*-Deletionsmutante von *S. Tm.*-Stamm SL1344 basierte auf der „one-step-inactivation“-Methode. Diese Methode wurde, für die Herstellung von chromosomalen Knockout-Mutanten in *E. coli* erstmals von Datsenko und Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) beschrieben. Leichte Modifikationen im Protokoll beruhten auf Erfahrungswerten aus der Arbeitsgruppe um Dr. Karsten Tedin (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin), die entsprechenden Bakterienstämme wurden ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Prinzip. Das zugrunde liegende Prinzip beruhte auf einer homologen Rekombination durch eine *lambda*-Bakteriophagen-Rekombinase (**Abbildung 9**). Die Rekombinase wurde über das Plasmid pKD46 in den *S. Tm.*-Stamm SL1344 eingeführt und konnte nach Arabinose-Induktion exprimiert werden. Die so vorbereiteten Zellen wurden mit einem PCR-Produkt elektroporiert, welches für eine Kanamycin-Resistenzkassette kodierte. Die Rekombinase erkannte im *Salmonellen*-Chromosom homologe Bereiche, die im Zuge der Amplifikation terminal über die Primer an die Resistenzkassette angehängt worden waren. Die homologen Bereiche befanden sich im Chromosom des Zielstammes im Bereich von Start- und Stopkodon des auszuschaltenden Gens (Fuentes *et al.*, 2005). Im Zuge des Rekombinationsereignisses wurde das Ziel-Gen zwischen diesen homologen Bereichen eliminiert und durch die Resistenzkassette substituiert. Erfolgreich mutagenisierte Zellen wurden anhand der erworbenen Resistenz gegen Kanamycin selektiert. Aufgrund der hitzesensitiven Replikation des Plasmids pKD46 erfolgte bei Anzucht über 36 °C keine effektive Weitergabe dieses Plasmids an die Tochterzellen. Dies führte zu pKD46-negativen Bakterienzellen, wenn die Kultur bei ≥ 37 °C inkubiert wurde.

Durchführung. Ausgehend von dem sogenannten „Template-Plasmid“ pKD4 (Genbankeintrag #AY048743) wurde in einer „Template-PCR“ (Kapitel 3.7.5) die darin kodierte Kanamycin-Resistenzkassette amplifiziert. Eine Aufreinigung aus dem PCR-Reaktionsgemisch erfolgte über eine Phenol-Chloroform-Fällung.

Der Empfängerstamm *S. Tm.* SL1344(pKD46) trug das „Rekombinase-Plasmid“ pKD46 (Genbankeintrag #AY048746), welches für ein Lambda-Red-Rekombinasesystem (*bet*,

gam, *exo*, *60a*) kodierte. Die Anzucht des Stammes hatte stets bei Temperaturen $\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu erfolgen, da das Plasmid pKD46 wegen seiner hitzesensitiven Replikation ansonsten verloren gegangen wäre.

In vier Parallelansätzen mit je $50\text{ }\mu\text{l}$ kompetenten Empfänger-Zellen und verschiedenen Mengen (100 ng, 400 ng, 800 ng und 1.600 ng) an gefälltem PCR-Produkt wurde die Elektroporation durchgeführt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml LBM aufgenommen und inkubiert ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h). Während dieser Zeit sollte auch die Substitution des Target-Gens *ompW* durch das transformierte Amplikon stattfinden, indem die Red-Rekombinase über homologe Rekombination die Bereiche zwischen den homologen Extensionen miteinander austauscht. So befindet sich bei einigen Bakterienzellen des Ansatzes schlussendlich die Kanamycin-Resistenzkassette am Genlokus von *ompW*. Die Ansätze wurden nach der Inkubation zu je $200\text{ }\mu\text{l}$ auf LBA-Platten mit Kanamycin-Zusatz ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) ausplattiert. Die weitere Inkubation erfolgte bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 48 h. Transformanten, die eine Kanamycin-Resistenz zeigten, wurden isoliert, gelagert und mittels PCR und Southern-Blot-Hybridisierung überprüft.

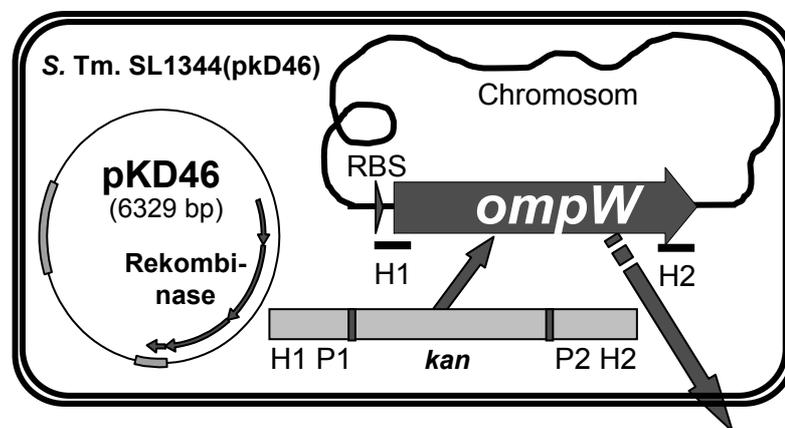


Abbildung 9: Strategie zur Herstellung der *ompW*-Knockout-Mutante von SL1344

H1/H2, homologe Nukleotid-Sequenzabschnitte; **P1/P2**, Primersequenzen aus dem Template-Plasmid pKD4; **pKD46**, Rekombinase Plasmid (#AY048746); ***kan***, Kanamycin-Resistenzkassette aus pKD4; **RBS**, Ribosomen-Bindungsstelle.

3.7.12 Sequenzierung

Als Matrize für die Sequenzierungsreaktion wurden ausschließlich Plasmidpräparationen oder gereinigte XL-PCR-Amplifikate verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels Bandenexzision aus einem Agarosegel nach Herstellerangaben („QIAEx II Kit“; Fa. QIAgen GmbH, Hilden). Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte als kommerzielle Serviceleistung durch Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Abteilung Genomics, der Justus-Liebig Universität Gießen. Ab Juni 2005 übernahm die Firma GENTERprise GmbH, Mainz, die Sequenzieraufträge.

3.8 Proteinanalytische und -präparative Methoden

3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden in wässrigen Lösungen mit dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ nach der „Bicinchoninic-Acid-(BCA)“-Methode zur kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung von Proteinen bestimmt. Die Testdurchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers (Fa. Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn). Die optische Dichte wurde bei 562 nm gemessen.

3.8.2 SDS-PAGE

Analytische SDS-PAGE. Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels vertikaler SDS-PAGE nach Lämmli (1970). Hierzu wurden die Proben im gleichen Volumen Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und in einem Wasserbad erhitzt (100 °C, 5 min). Die Proben wurden in Geltaschen eines 5 %-igen SDS-Sammelgels pipettiert und in einem 1 mm dicken 12,5 %-igem vertikalen SDS-Trenngel über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm bei 12,5 mA / Gel über 1,5 Stunden aufgetrennt. Zur Bestimmung der Molmasse der Proteine wurde der Marker „SeeBlue® pre-stained standard“ (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mitgeführt.

Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte durch Einlegen der SDS-Gele in Coomassie-Färbelösung (1 h, RT) und anschließende Entfärbung mit Coomassie-Entfärbelösung gemäß den Anweisungen des Herstellers (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Zur Haltbarmachung wurden die SDS-Gele zunächst mehrere Tage in *A. dest.* inkubiert und anschließend auf einem Filterpapier unter Vakuum getrocknet (2 h, 80 °C). Die Dokumentation erfolgte wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben.

3.8.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung an einer Ni²⁺-NTA-Matrix

Bakterienzellyse. Die IPTG-induzierten *E. coli*-Bakterien (1 l Kulturvolumen) wurden nach vier Stunden Inkubation für 10 min auf Eis gelagert, anschließend bei 5.000 x g abzentrifugiert und die Pellets bei -20 °C gelagert. Zur Lyse wurden die auf Eis aufgetauten Bakterienpellets in 15 ml (5 ml/g Pellet-Nassgewicht) denaturierendem Lysepuffer B resuspendiert und inkubiert (25 °C, 220 rpm, 2 h). Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand („Keimlysat“) wurde bis zur affinitätschromatographischen Aufreinigung bei 4 °C gelagert.

Affinitätschromatographie. Das Keimlysat wurde mit 4 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (Fa. Qiagen, Hilden) gemischt und unter Rühren inkubiert (1 h, 4 °C). Anschließend wurde das Gemisch zur Säule gepackt (Ø 1,6 cm, Höhe 2 cm) und nach Ablauf der überschüssigen Flüssigkeit mit Waschpuffern bzw. Elutionspuffern zunehmend saurer pH-Werte (pH 6,3, pH 5,9 und pH 4,5) gewaschen. Hierfür wurde zunächst Waschpuffer C (2 x 4 ml), dann Elutionspuffer D (4 x 0,5 ml) und schließlich Elutionspuffer E (10 x 0,5 ml) verwendet und der Durchfluss fraktioniert aufgefangen. Die aufgefangenen Fraktionen wurden in der analytischen SDS-PAGE auf Sauberkeit und mittels BCA-Proteinbestimmung auf den Proteingehalt überprüft und anschließend gepoolt. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

3.8.4 Entsalzung von Proteinfractionen

Dialyse. Pools, die das gewünschte Histidin-markierte Fusionsprotein enthielten, wurden in einem Dialysierschlauch („Visking 27/32“; Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) zweimal gegen je 2 l Dialyse-Lösungen (**Tabelle 14**) für 24 h bei 4 °C dialysiert und zur Verwendung als Impfstoff mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 200 µg/ml eingestellt.

Tabelle 14: Übersicht über Dialyse-Bedingungen der aufgereinigten rekombinanten His-Tag Fusionsproteine

Impfantigen	Masse [kDa]	Ausschlussgröße Dialyseschlauch [kDa]	Erste Dialyse (24 h, 4 °C)	Zweite Dialyse (24 h, 4 °C)	Löslichkeit
rSTM1733-His	16,1	3,5	NaCl (0,9 %), 25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,5 mM Tris, pH 5,5	NaCl (0,9 %) pH 6-7	ja
rOmpW-His	24,5	12-14	NaCl (0,9 %), 25 mM NaH ₂ PO ₄ , 2,5 mM Tris, pH 5,5	NaCl (0,9 %) pH 6-7	nein
rKatN-His	33,3	12-14	PBS, 250 mM Desoxycholat, pH 7,0	PBS pH 7,0	ja

3.9 Serologische Methoden

3.9.1 Serotypisierung

Die Serotypisierung der Salmonellen-Stämme von Serovar Marina (48:g,z₅₁:-) erfolgte durch Mitarbeiter des Robert-Koch-Instituts (Nationales Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritis-Erreger, Werningerode).

3.9.2 Antikörper und Seren

In dieser Arbeit wurden verschiedene Hyperimmunseren hergestellt und als polyklonale Primärantikörper verwendet (**Tabelle 15**). Die Seren R-1238/99, R-1249/99 und R-1258/00 wurden im Rahmen anderer Arbeiten hergestellt und lagen bereits im Institut vor. Die eingesetzten Sekundärantikörper mit ihrer jeweiligen Gebrauchsverdünnung sind in der **Tabelle 16** aufgelistet.

Tabelle 15: Überblick über die verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Spezifität	Verwendung	Gebrauchs- verdünnung
R-1258/00 ¹⁾	Antiserum (Kaninchen)	21 kDa Protein aus der äußeren Membran von S. Tm. ATCC19585	ELISA Immuno-Blot	1:250- 1:2.048.000 1:1.000
R-3049/05	Antiserum (Kaninchen)	[keine] ²⁾	ELISA	1:250- 1:32.000
R-3115/05	Antiserum (Kaninchen)	rSTM1733-His	ELISA	1:250- 1:32.000
R-3116/05	Antiserum (Kaninchen)	rOmpW-His	ELISA Immuno-Blot FACS	1:250- 1:32.000 1:1.000 1:100
R-3117/05	Antiserum (Kaninchen)	rKatN-His	ELISA	1:250- 1:32.000

Erläuterungen: 1) hergestellt im Rahmen anderer Projekte der Arbeitsgruppe Bauerfeind;
2) Serum vor erster Immunisierung („Nullserum“).

Tabelle 16: Überblick über die verwendeten Konjugate

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung	Gebrauchs- verdünnung
Anti-DIG-AP- Fragment	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Hybridisierung Detektion DIG-UTP markierter DNS-Sonden	1:10.000
Ni ²⁺ - NTA-Meer- rettich-Peroxidase	Qiagen, Hilden	Western-Blot Überprüfung Fusionsproteine auf His-Tag	1:1.000
Esel-Anti-Kanin- chen-IgG- Meer- rettich-Peroxidase	Amersham, Freiburg	Immuno-Blot Überprüfung Expression von OmpW bzw. rOmpW-His ELISA Titerverlaufskontrollen	1:1.000 1:10.000
AlexaFluor®488- Esel-Anti- Kaninchen-IgG	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	Immunfluoreszenz/FACS Überprüfung Expression von OmpW	1:250

3.9.3 Serumabsorption

Als Ausgangskultur für die Serumabsorption wurden 16 ml LBM im Verhältnis 1:100 (v/v) mit dem Stamm *S. Tm. 1344ΔompW* aus einer Standardanzucht inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert (37 °C, 180 rpm). Zur Ernte der Bakterienzellen wurden 15 ml der Kultur abzentrifugiert (4.500 x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 5 ml einer 0,89 %-igen NaCl-Lösung resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (4.500 x g, 10 min, 4 °C) und Resuspension des Pellets in 1 x PBS. Anschließend wurde die Suspension auf eine Keimdichte von 2×10^{10} KbE/ml eingestellt. Zur Serumabsorption wurde das Serum mit der Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und im Hybridisierungssofen rotierend inkubiert (37 °C, 2 h). Zur Entfernung der Bakterien wurde erneut zentrifugiert (4.500 x g, 10 min, 4 °C). Dieser Absorptionvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt, wobei die Bakterien für die letzten drei Durchgänge jeweils frisch und in Form von Pellets (Keimzahl wie oben angegeben) hergestellt wurden, um eine weitere Verdünnung des Serums zu vermeiden. Das absorbierte Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.9.4 Immuno-Blot

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran (Typ Protran BA 85, Fa. Schleicher & Schuell, über Fa. MAGV, Rabenau-Londorf) übertragen. Dazu wurden auf die Graphitanode der Elektroblochkammer die auf die Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in folgender Reihenfolge aufgebaut: vier in Anodenpuffer I und zwei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere, die in 1 x PBS getränkte Nitrozellulosemembran, das in Anodenpuffer II äquilibrierte Polyacrylamid-Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Auflage der Graphit-Kathode erfolgte der Transfer (0,8 mA/cm², RT, 90 min). Dann wurde die Nitrozellulosemembran in 1 x PBS eingelegt (RT, 30 min). Anschließend wurde die Membran in Blockierungsreagenz für 1 h bei RT inkubiert (1:10 [v/v] Blockstammlösung in *A. dest.* verdünnt). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (20 ml, 5 min, RT) wurde die Membran den Kaninchenserumproben (1:1.000 [v/v] verdünnt in PBS-Tween) für eine Stunde bei RT ausgesetzt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das mit Meerrettich-Peroxidase markierte Esel-Anti-Kaninchen-Ig-Konjugat (1:1.000 [v/v] verdünnt in PBS-Tween) zugegeben, und der gesamte Ansatz wurde inkubiert (RT, 1 h). Vor der Substratzugabe wurde die Membran dreimal in 1 x PBS (20 ml, 5 min, RT) gewaschen. Anschließend wurde sie in 10 ml Substratpuffer inkubiert (30 min, RT), und die Enzymreaktion nach Sichtbarwerden der Banden durch zweimaliges Waschen in je 20 ml *A. dest.* gestoppt (je 5 min, RT).

Der Nachweis des Histidin-Markers an entsprechend markierten Fusionsproteinen entsprach bis auf die folgenden Änderungen der oben beschriebenen Detektionsweise: Anstelle des Primärantikörpers wurde Ni²⁺-NTA-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat

(1:1.000 in PBS-Tween verdünnt) zugegeben und inkubiert (10 ml, 1 h, RT). Anschließend wurde der Blot dreimal mit 1 x PBS gewaschen (20 ml, 5 min, RT) und in Substratpuffer (10 ml, 30 min, RT) inkubiert. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit *A. dest.* gestoppt.

3.9.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis von Impfantigen-spezifischen Antikörpern in Serumproben wurde mittels ELISA durchgeführt. Hierzu wurden 400 ng säulenchromatographisch aufgereinigtes und dialysiertes Impfantigen (rOmpW-His, rSTM1733-His bzw. rKatN-His) pro Vertiefung als Fangantigen verwendet. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten (Typ U-96-Mikrotiterplatte Polysorb, Fa. Nunc, Wiesbaden) erfolgte mit dem entsprechenden Antigen in 150 µl Coating-Puffer pro Test-Vertiefung (16-18 h, RT). Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl PBS-Tween wurde 200 µl Blockpuffer in alle Vertiefungen, ausgenommen die der Blank- und Konjugat-Kontrollen, zugegeben und inkubiert (1 h, 37 °C). Dann wurden 100 µl der Serumproben im Doppelansatz (1:50 in PBS-Tween verdünnt) eingesetzt und inkubiert (je 100 µl / Vertiefung, 37 °C, 90 min). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch die Zugabe des mit Meerrettich-Peroxidase markierten Esel-Anti-Kaninchen-Ig-Konjugats, verdünnt in PBS-Tween (Inkubation 1 h, 37 °C). Zwischen allen Schritten wurden die Platten jeweils dreimal mit 300 µl PBS-Tween gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Zugabe von 0,03 % (v/v) H₂O₂ und 0,5 mg/ml Orthophenylendiamin (OPD) in OPD-Substratpuffer (100 µl/Vertiefung, 37 °C, 30 min). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 1 N H₂SO₄ 50 µl/Vertiefung gestoppt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenphotometer (Typ Titertek Multiskan Ascent 354, Fa. Labsystems GmbH, Meckenheim) bei einer Testwellenlänge von 492 nm.

Für den Null-Wert (Blank) wurden zwei Vertiefungen in allen Schritten ausschließlich mit jeweils 100 µl PBS-Tween belegt, bevor ihnen 100 µl OPD-Substratpuffer mit H₂O₂ (0,03 % [v/v] H₂O₂ und 0,5 mg/ml OPD) zugegeben wurde. Als Positivkontrolle und Referenzwert für den rOmpW-His-ELISA wurde auf jeder Platte das Kaninchen-Hyperimmunserum „R-1258/00“ mitgeführt (**Tabelle 15**). Als Negativkontrollen dienten die Seren, die vor der ersten Immunisierung des jeweiligen Kaninchens gewonnen wurden und somit keine Antigen-spezifische Reaktivität aufweisen sollten („Nullseren“).

3.9.6 Fluorescence-Assisted Cell Sorting (FACS)

Die fraglichen Bakterien wurden zunächst im Standardanzuchtverfahren angezüchtet. Die hergestellte LB-Bouillonkultur wurde dann im Verhältnis 1:50 mit frischem LBM verdünnt. Die weitere Inkubation (37 °C, 180 rpm, ca. 2 h) erfolgte, bis die Bakterienkultur eine OD₆₀₀ = 0,6 erreicht hatte. Die Kultur wurde 1:60 in 1 x PBS (pH 7,4) verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 20 µl mit 30 µl Serum-Gebrauchslösung (1 µl Serum auf 29 µl 1 x PBS) gemischt, so dass ein 50 µl Ansatz eine Gesamtkeimzahl von ca. 2 x 10⁵ KbE beinhaltete. Die Inkubation erfolgte mit Überkopf-

Rotation im Hybridisierungs-ofen (37 °C, 2 h). Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (1.200 x g, 10 min, 4 °C) und in 50 µl AlexaFluor®-Gebrauchslösung (AlexaFluor®488-Esel-Anti-Kaninchen-IgG, 1:250 [v/v] verdünnt in 1xPBS) resuspendiert. Es folgten eine erneute Inkubation mittels Überkopf-Rotation im Hybridisierungs-ofen (37 °C, 1 h) und eine anschließende Zentrifugation (1.200 x g, 10 min, 4 °C). Die Bakterien wurden gewaschen, indem das Pellet in 50 µl PBS (pH 7,4) resuspendiert und erneut abzentrifugiert wurde (1.200 x g, 10 min, 4 °C). Zur Fixation der Bakterien wurde das Pellet in 100 µl FACS-Puffer („BD FACS® Lysing Solution“; Fa. BD Biosciences, Heidelberg) resuspendiert und im Dunkeln inkubiert (30 min, RT). Zur Anfärbung der DNS wurde Propidiumjodid unmittelbar vor der Durchführung der FACS-Analyse bis zu einer Endkonzentration von 20 µg/ml zu den Ansätzen zugegeben, und der gesamte Ansatz für 5 min bei RT inkubiert.

Das Durchflußzytometer („FACSCalibur“; Fa. BD Biosciences, Heidelberg) erfasste die Fluoreszenzsignale von 10.000 Salmonellen pro Probe. Die Messfenster wurden anhand der Partikel-Morphologie und der DNS-Anfärbung festgelegt. Die Definition der Cut-offs für Fluoreszenz-positive Werte (FL-1) erfolgte anhand der Konjugatkontrolle, wobei hier weniger als 2 % positive Ereignisse zugelassen wurden. Zur optimalen Messung wurden die Proben soweit in FACS-Puffer verdünnt, dass die Aquisitionszeiten bei etwa einer Minute lagen.

3.10 Impfungen und Serumgewinnung

Die Immunisierungsversuche waren gem. § 8 Abs. 7, Nr. 2 (Impfungen, Blutentnahmen oder sonstige diagnostische Maßnahmen nach bereits erprobten Verfahren zur Erkennung insbesondere von Krankheiten, Körperschäden usw. bei Mensch oder Tier) des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2936) genehmigungsfrei. Die Tierversuche wurden nach Abs. § 8a Abs. 1 und 2 dem Regierungspräsidium Gießen mit Datum vom 11.01.05 angezeigt (Tierversuchsanzeigen Nr. 135, 136 und 137).

Für die Herstellung von Hyperimmunseren wurde je ein Kaninchen mit den aus den rekombinanten Fusionsproteinen hergestellten Impfstoffen immunisiert. Die Immunisierung erfolgte durch siebenmalige subkutane Applikation von Impfstoff an den Versuchstagen 1, 14, 28, 42, 58, 71, und 85. Vor der ersten und jeweils 14 Tage nach jeder Immunisierung wurde den Kaninchen Blut aus der *Vena auricularis caudalis* entnommen. Am 100. Versuchstag wurden die Tiere zur terminalen Blutentnahme nach Prämedikation mit Atropin (0,5 mg/kg KG s.k.) in Narkose gelegt (25 mg/kg KG Ketamin, 5 mg/kg KG Rompun i.m.). Nach Feststellung eines hyporeflektorischen Lidreflexes bei normoreflektorischem Cornealreflex wurden die Kaninchen unter Blutentzug getötet. Zur Serumgewinnung wurde das gewonnene Vollblut eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann das Serum nach Zentrifugation (1.270 x g, 10 min, RT) abgenommen. Die Seren wurden bei -20 °C gelagert.

3.11 Datenhaltung und Auswertung

3.11.1 Bilddokumentation

Zur Dokumentation von experimentellen Ergebnissen wurden Elektropherogramme und Immuno-Blots abgebildet und die Abbildungen bildtechnisch weiterverarbeitet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Bilddokumentationssystem des Institutes (Modell E.A.S.Y. 429K, Fa. Herolab, Wiesloch). Die Bestimmung von molekularen Massen und die densitometrische Auswertung von Proteinbanden wurden an den digitalisierten Bildern (TIFF-Format) mit Hilfe des Programms „Easy Win 32“ (Version 1.00.70 15.12.95, Fa. Herolab GmbH, Wiesloch) durchgeführt.

3.11.2 Auswertung von DNS- und Aminosäure-Sequenzdaten

Die Sequenz-Rohdaten wurden mit Hilfe des Software-Pakets „LASERGENE 2000®“ (Fa. DnaStar Ltd., London, UK) aufgearbeitet und analysiert. Primersequenzen wurden mit dem Programm „OLIGO®“ Version 4.0 (Fa. MedProbe, Oslo, Norwegen) ermittelt. Alignments und Vergleiche von Nukleotid-Sequenzen wurden nach der ClustalW-Methode, Alignments und Vergleiche von Aminosäure-Sequenzen nach der Jotun-Hein-Methode durchgeführt. Verwendet wurde hierfür das im Internet verfügbare Programm „ClustalW“ (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK).

3.11.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm „Statistical Analysis System“ (SAS) Version 8.2. (Cary, N.C., USA) durchgeführt. Die Signifikanzschwellen sind in **Tabelle 17** aufgeführt.

Tabelle 17: In der vorliegenden Arbeit verwendete Signifikanzschwellen

Signifikanz	p-Wert	Abkürzung
hoch signifikant	$p \leq 0,001$	***
signifikant	$0,001 < p \leq 0,01$	**
schwach signifikant	$0,01 < p \leq 0,05$	*
nicht signifikant	$p > 0,05$	n. s.

4 ERGEBNISSE

4.1 Rekombinante Herstellung von OmpW-, STM1733- und KatN-Histidin-markierten Fusionsproteinen zur Herstellung polyklonaler Hyperimmunseren

Die Herstellung eines OmpW-spezifischen Hyperimmunserums war die Voraussetzung für die Detektion von OmpW in Salmonellen. Das OmpW-Serum sollte als Werkzeug eingesetzt werden, um zu klären, inwieweit Salmonellen, bei denen das *ompW*-Gen nachgewiesen werden konnte, OmpW überhaupt exprimieren und inwieweit OmpW innerhalb des Genus *Salmonella* verbreitet ist. Darüber hinaus sollte das Hyperimmunserum verwendet werden, um OmpW auch in nativem Zustand in der äußeren Membran der Salmonellen zu detektieren und so Anhaltspunkte über die Lokalisation und die Verteilung von OmpW zu erhalten. Vor dem Hintergrund, dass zur Funktion und zur biologischen Bedeutung von OmpW bei Salmonellen bislang sehr wenig bekannt ist und die Anordnung der Gene *stm1733*, *ompW* und *katN* eine Besonderheit der Salmonellen zu sein scheint, wurden für zukünftige Studien auch spezifische Hyperimmunseren gegen deren Translationsprodukte, Stm1733 und KatN, erzeugt. Die Proteine Stm1733 und KatN wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht und sollen Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Klonierung. Die Strategie zur Herstellung polyklonaler Antiseren gegen OmpW und gegen die Expressionsprodukte seiner benachbarten Leserahmen, Stm1733 und KatN, bestand in einer Immunisierung von Kaninchen mit hoch aufgereinigtem Impfantigen. Hierzu wurden die Zielgene in *E. coli* B-Stämmen überexprimiert. Die entsprechenden kodierenden Sequenzen wurden über modifizierte Primer aus *S. Tm.* ATCC19585 mittels PCR amplifiziert und im Bereich von Start- und Stopkodon mit künstlichen Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *HindIII* versehen. Die Verwendung zweier verschiedener Schnittstellen ermöglichte die gerichtete „sticky end“-Ligation des PCR-Amplikons in den entsprechend verdauten Expressionsvektor pET-24b(+). Die eingeführte *HindIII*-Schnittstelle führte zur Zerstörung des Stopkodons des entsprechenden Zielgens, um so das Genprodukt carboxyterminal mit dem vektorkodierten Histidin-Marker zu fusionieren. Die erfolgreiche Transformation der rekombinanten Plasmide in *E. coli* BLR(DE3) wurde im ersten Schritt über die erworbenen Kanamycin-Resistenz-eigenschaften überprüft. Die weitere Verifizierung erfolgte mittels insertspezifischer PCR für das jeweils klonierte Gen und vektorspezifischer PCR mit den Primern pET-A/pET-B. Zur Bestimmung der Nukleotid-Sequenz wurde bei allen rekombinanten Plasmiden sowohl der sense- als auch der antisense Nukleotidstrang im Bereich der inserierten Gensequenz mit mehreren vektorspezifischen und insertspezifischen Primern sequenziert (**Tabelle 12**).

Die Ligations- und Transformationsversuche erbrachten auf diesem Wege Transformanten für die Gene *ompW* und *stm1733* (**Tabelle 18**). Das Gen *katN* konnte zunächst nicht erfolgreich in den Vektor integriert werden, so dass eine Zwischenklonierung in den nicht zur Expression befähigten Vektor pCR8/GW/Topo[®] erfolgte. Für diese Zwischenklonierung wurde ungeschnittenes PCR-Amplifikat über eine vektorgebundene Topoisomerase in das Plasmid integriert. Nach erfolgreicher Integration wurde das *katN*-Gen an den *Nde*I- und die *Hind*III-Schnittstellen herausgeschnitten und in die Ligation mit dem Expressionsvektor pET-24b(+) eingesetzt. Auf diese Weise wurden Transformanten erzeugt, deren Resistenzeigenschaften, PCR-Ergebnisse und Sequenzierungsergebnisse das Vorhandensein von *rkatN-His* bestätigten (**Tabelle 18**). Die Sequenzierung ergab, dass die Nukleotid-Sequenzen der beiden rekombinanten Plasmide pHIT-IV-29 (rOmpW-His) und pHIT-IV-31 (rKatN-His) im Bereich des inserierten Strukturgens mit den veröffentlichten *ompW*- bzw. *katN*-Gensequenzen des *S. Tm.*-Stammes LT2 (#AE008777) exakt übereinstimmten. Die Nukleotid-Sequenz des Plasmids pHIT-IV-28 (rStm1733-His) wies eine veränderte Base an Position 288 nach dem Startkodon auf, die jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz des Translationsproduktes hatte. **Abbildung 10** zeigt die Aminosäure-Sequenzen der Translationsprodukte rStm1733-His, rOmpW-His und rKatN-His, wie sie aus den Nukleotid-Sequenzen der rekombinanten Plasmide abzuleiten waren.

Um zu überprüfen, ob die mit den rekombinanten Plasmiden transformierten *E. coli*-Bakterien die entsprechenden Fusionsproteine auch exprimierten, wurden die Bakterien unter Kanamycin/Tetrazyklin-Selektionsdruck angezüchtet und mit IPTG induziert. Die Proteinprofile der Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Verfahren analysiert. In allen drei Transformanten ließ sich mittels IPTG die Expression eines Proteins induzieren, welches in der SDS-PAGE die jeweils erwartete elektrophoretische Motilität aufwies (**Abbildung 12**). Für rOmpW-His konnte ab einer IPTG-Konzentration von ca. 16 μ M das Auftreten einer zweiten ca. 1-2 kDa größeren Bande beobachtet werden. Der relative Proteingehalt von rOmpW-His am Gesamtproteingehalt wurde densitometrisch bestimmt, wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben. Der relative Anteil an gebildetem rOmpW-His war mit 21,8 % bei Zugabe von 62,5 μ M und Inkubation für 4 h (30 °C, 180 rpm) am größten (**Abbildung 11**). Die Überprüfung der Identität dieser induzierbaren Banden erfolgte mittels His-Tag Nachweis über Western-Blot-Analysen mit Ni²⁺-NTA-Peroxidasekonjugat. Die IPTG-induzierten Banden waren die einzigen, welche im Western-Blot erkannt wurden. Im Falle von rOmpW-His wurden beide Banden durch das Konjugat detektiert.

Isolierung und Reindarstellung. Im nächsten Schritt wurde versucht, die rekombinanten Proteine rStm1733-His, rKatN-His und rOmpW-His anhand ihrer Histidin-Marker aus Keimlysaten der Transformanten an einer Ni²⁺-NTA-Matrix affinitätschromatographisch aufzureinigen. Um den Verlauf der Aufreinigung zu kontrollieren, wurden entsprechende Wasch- und Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen, die das Zielprotein in hochreiner Form enthielten, wurden gepoolt und einer zweifachen Dialyse gegen PBS bzw. für rKatN-His gegen PBS mit Desoxycholatzusatz unterzogen, um sie in ein verimpfbares Lösungsmedium zu überführen (**Abbildung 12**).

Die durchschnittliche Ausbeute an aufgereinigtem und dialysiertem Protein betrug 4,9 mg für rStm1733-His, 7,2 mg für rOmpW-His bzw. 48,0 mg für rKatN-His pro Liter induzierter Bakterienkultur.

Herstellung der Hyperimmunseren im Kaninchen. In zweiwöchigen Abständen wurden 100 µg der aufgereinigten und dialysierten Fusionsproteine rStm1733-His, rOmpW-His und rKatN-His zusammen mit inkompletem Freundschens Adjuvans mehrmals subkutan an je ein Kaninchen verimpft. Vor der ersten Impfung und nach jeder weiteren wurden den Kaninchen Serumproben entnommen, um die spezifischen Ig-Antikörper-Titer im ELISA zu bestimmen (**Abbildung 13**). Um einschätzen zu können, wie spezifisch die Reaktivität der hergestellten Seren gegen OmpW, Stm1733 oder KatN ist, wurden die Seren, die vor der ersten Immunisierung gewonnen wurden, als „Nullseren“ mitgeführt. Das *ompW*-spezifische Serum R-1258/00, das aus einer Immunisierung mit einer OmpW-Aufreinigung aus der äußeren Membran von *S. Tm.* ATCC19585 stammte, wurde als Kontrolle für die Beschichtung der ELISA-Platten mit rOmpW-His und als Kontrolle für die Durchführung des ELISAs verwendet.

Bereits nach der dritten Immunisierung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Antikörperspiegel gegen alle drei Impfantigene. Die stärkste Antigenität wies dabei rKatN-His auf, wobei nach der siebten Immunisierung allerdings ein leichter Abfall im Titer festzustellen war. Der Anstieg der Antikörpertiter gegen rStm1733-His und rOmpW-His verlief dagegen deutlich langsamer und stieg auch nach der siebten Immunisierung noch an. Das OmpW-spezifische Serum R-1258/00 zeigte eine hohe Reaktivität im rOmpW-His-ELISA, nicht aber mit den anderen beiden Fusionproteinen rStm1733-His und rKatN-His.

Die **Abbildung 14** zeigt den Spezifitätsnachweis für das Anti-rOmpW-His-Hyperimmunserum R-3116/05 im Immuno-Blot. Das Serum erkannte die rOmpW-His-Doppelbande im Bereich von ca. 23 kDa in dem mit IPTG-induzierten Kulturlysate bzw. im Impfstoff. Neben der Bande von rOmpW-His wurden bei allen *E. coli*-Stämmen, unabhängig davon, ob sie mit IPTG induziert worden waren, eine Bande bei etwa 22 kDa sowie eine weitere Bande bei etwa 25 kDa durch das Serum erkannt. Beide Banden waren nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung von rOmpW-His nicht mehr zu beobachten. Allerdings wurde in der Probe mit aufgereinigtem rOmpW-His durch das Serum eine schwache Bande bei ca. 32 kDa detektiert, welche in den *E. coli*-Ganzzelllysaten vor der Aufreinigung nicht zu sehen war.

Tabelle 18: Identitätsprüfung der erzeugten Transformanten und ihrer Expressionsprodukte

GVO	genetische Charakterisierung				Übereinstimmung Sequenz ¹⁾ [%]	Expressionsprodukt		
	Amplifikat [bp]					Protein	Größe [kDa]	His-Tag ²⁾
	Insert-PCR		Vektor-PCR					
	Soll	Ist	Soll	Ist				
BLR(DE3, pHIT-IV-28)	405	~400	615	~610	99 ³⁾	rStm1733-His	16,1	positiv
BLR(DE3, pHIT-IV-29)	639	~640	849	~850	100	rOmpW-His	23,5	positiv
BLR(DE3, pHIT-IV-31)	445	~450	1.089	~1.100	100	rKatN-His	33,3	positiv

Erläuterungen: **GVO:** Gentechnisch veränderter Organismus;
1) bezogen auf die Konstruktsequenz aus Vektorsequenz und Sequenz von *S. Tm.* LT2 (NCBI-Genbank #AE008777);
2) Nachweis mittels Ni²⁺-NTA-POD im Western-Blot;
3) stille Mutation einer Base (G⇒A) an Position 288;
Soll, errechnete Länge des Amplifikats anhand der veröffentlichten Nukleotid-Sequenz von *S. Tm.* LT2 (#AE008777);
Ist, aufgrund der elektrophoretischen Motilität im Agarosegel geschätzte Amplifikat-Länge.

rStm1733-His

MSVLNPCMTC	GACCAYFRVS	FYWAEGDDAS	GRVPASLTEP	VTPFLRCMAG	50
TNQQPHCKA	LIGTPGENVS	CAIYENRPST	CREFSISGEG	GEVNEACNRA	100
RARYGLPPLY	KDMLFHTTAD	AATVELSRVQ	LPANKLAAAL	<u>E</u> <u>HHHHHH</u> .	148

rOmpW-His

<u>MKKFTVAALA</u>	<u>LTLLSGSAF</u>	<u>AHEAGEFFMR</u>	AGPATVRPTE	GAGGTLGHLN	50
GFDVSNNTQL	GLTFTYMATD	NIGVELLAAT	PFRHKVGTGA	TGDIATVHLL	100
PPTLMAQWYF	GDSSSKVRPY	VGVGNYTTF	FDNDFNDNGK	NAGLSDLSFK	150
DSWGAAGQVG	VDYLINRDWL	IGASVWYMDI	DTTANYKMGG	VQHHDSVRLD	200
PWVFMFSAGY	RFKLAALAE	<u>H</u> HHHHH.			225

rKatN-His

MFRHVKQLQY	TVRVSEPMPG	LANLLLEQFG	GPQGELAAAC	RYFTQGLSDD	50
DAGRREMLMD	IATEELSHLE	IIGSLVGMLN	KGAKGELAEG	TENEAELYRS	100
LTQNGNDSHI	TSLLYGGGPA	LTNSGGVPWT	AAYIDTIGEV	TADLRSNIAA	150
EARAKIIYER	LINLTDDPGV	KDTLSFLMTR	EVAHQLSFEK	ALYSIRNNFP	200
PGKLPPVEQY	TDVYYNMSQG	DDPRGSWNSD	ENFNYVAEPM	PAVDGGDGLA	250
TVKLPREQMA	LLKAMAERTK	SDPTVDPLTG	AELGCGEPEK	<u>DKKLAAALE</u> <u>H</u>	300
<u>HHHHH</u> .					305

Abbildung 10: Anhand der DNS-Sequenzen ermittelte Aminosäure-Sequenzen der rekombinanten Histidin-markierten Fusionsproteine rStm1733-His, rOmpW-His und rKatN-His (Ergebnisse der Doppelstrang-Nukleotid-Sequenzierung)

schattiert, Histidin-Marker; unterstrichen, Linkerpeptid; doppelt unterstrichen, Signalpeptid von OmpW.

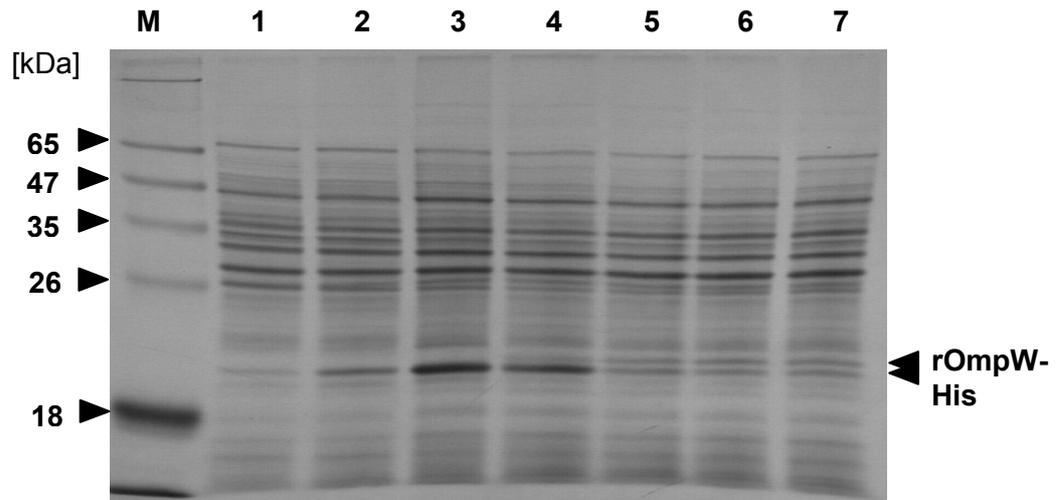


Abbildung 11: Expression von rOmpW-His bei Modulation der für die Induktion verwendeten IPTG-Konzentration (12,5 % SDS-Gel, Coomassie gefärbt)

IPTG, Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid

Spur:

- | | |
|-----------------------|---|
| 1, 0 μ M IPTG; | 5, 250 μ M IPTG; |
| 2, 3,9 μ M IPTG; | 6, 1 mM IPTG; |
| 3, 15,6 μ M IPTG; | 7, 4 mM IPTG; |
| 4, 62,5 μ M IPTG; | M, Proteinmassenstandard, SeeBlue plus [®] . |

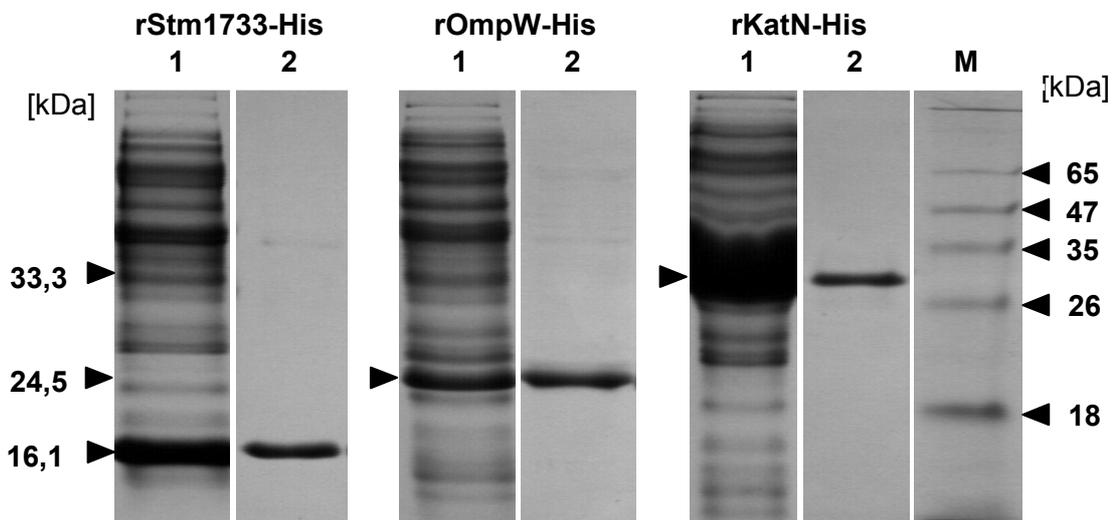


Abbildung 12: Auftrennung der rekombinanten Histidin-Fusionsproteine rStm1733-His, rOmpW-His und rKatN-His vor und nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung (12,5 % SDS-Gel, Coomassie gefärbt)

Spur:

- 1, 20 μ l Hitzelysate der mit IPTG induzierten Transformanten;
 2, 20 μ l Impfantigen (200 μ g/ml);
 M, Proteinmassenstandard, SeeBlue plus[®].

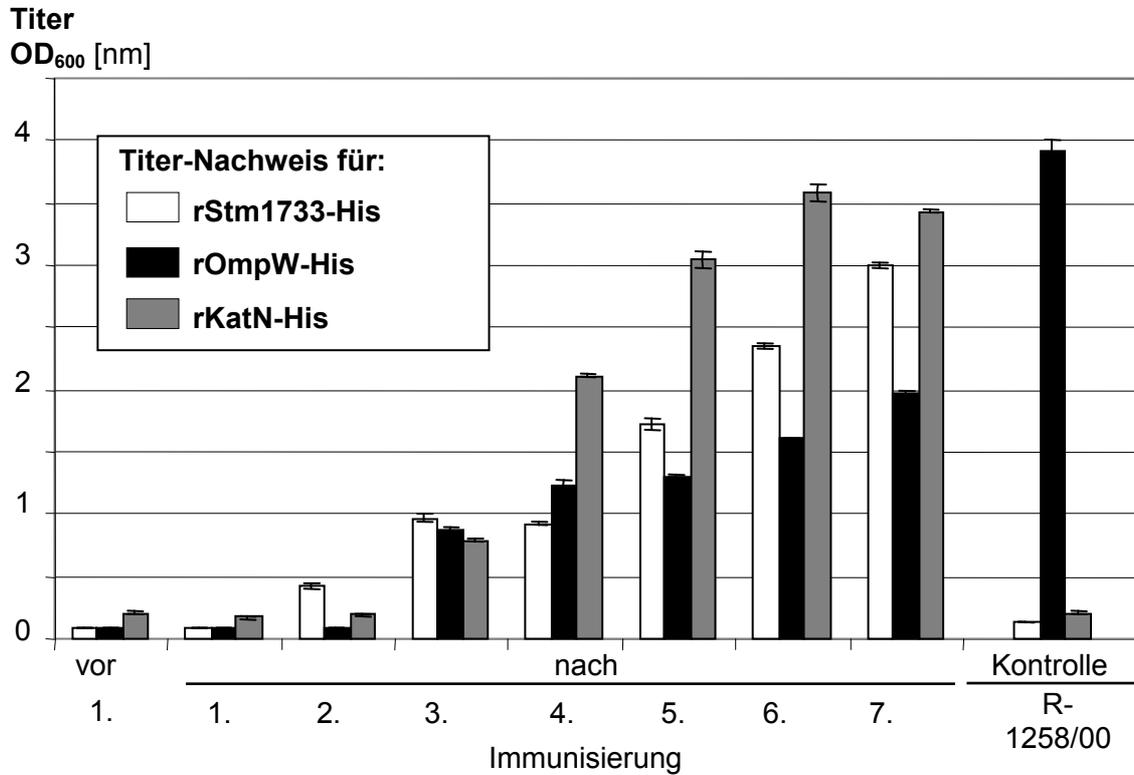


Abbildung 13: Serumantikörper bei geimpften Kaninchen gegen die rekombinanten Histidin-Fusionsproteine rStm1733-His, rOmpW-His und KatN-His (ELISA-Ergebnisse; Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Testansätzen, Serumverdünnung 1:16.000)

R-1258/00, Hyperimmunserum gegen natives OmpW aus einem OMP-Präparat von *S. Tm.* ATCC19585.

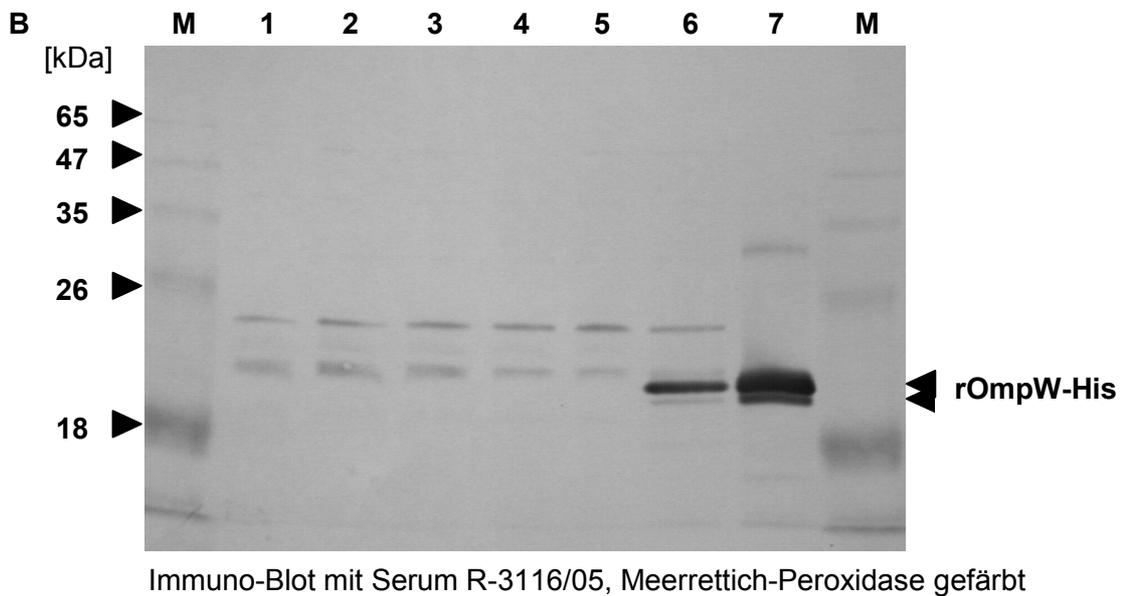
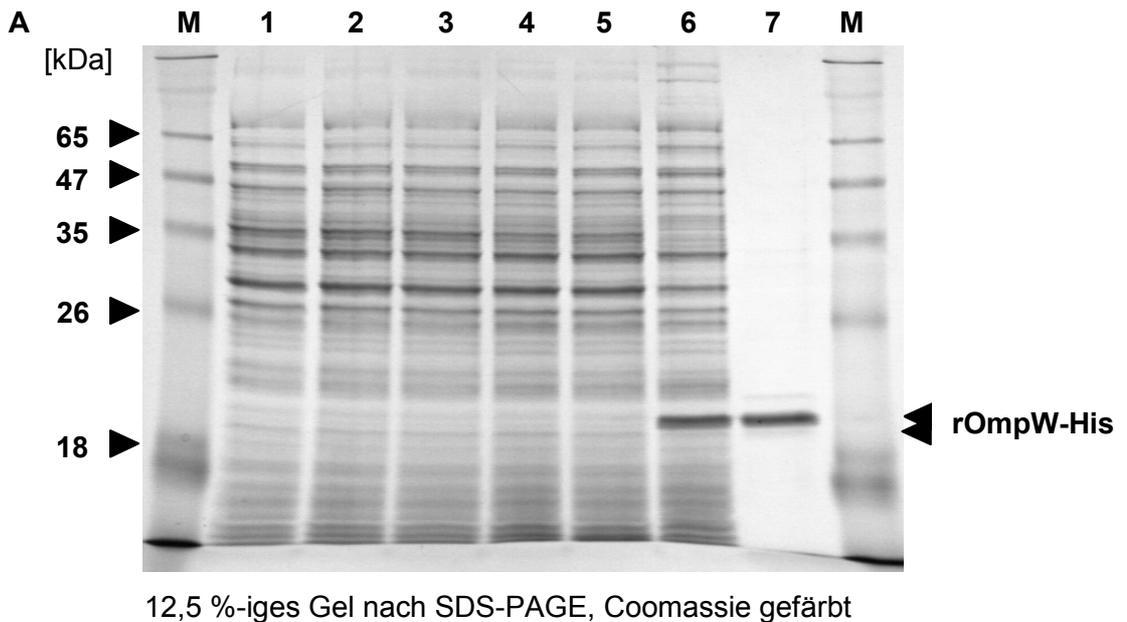


Abbildung 14: Darstellung von rOmpW-His in der SDS-PAGE (A) und Überprüfung der Spezifität des Anti-rOmpW-His-Hyperimmunsersums im Immuno-Blot (B)

Spur:

1, BLR(DE3);

2, BLR(DE3), induziert mit 62,5 μ M IPTG;

3, BLR(DE3, pET-24b[+]);

4, BLR(DE3, pET-24b[+]), induziert mit 62,5 μ M IPTG;

5, BLR(DE3, pHIT-IV-29);

6, BLR(DE3, pHIT-IV-29), induziert mit 62,5 μ M IPTG;

7, Impfantigen rOmpW-His (2 μ g)

M, Proteinmassenstandard, SeeBlue plus[®].

4.2 Vorkommen von OmpW bei Salmonellen und anderen Bakterien

4.2.1 Vorkommen von OmpW bei Salmonellen

Die Untersuchungen zum Vorkommen von OmpW bei *Salmonella* spp. erstreckten sich auf die Referenz-Stammsammlungen SARB und SARC sowie zehn weitere Stämme der Spezies *S. bongori* und vier Stämme des Serovars *S. Marina*. Die Studien erfolgten einerseits mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung zum Gennachweis und andererseits mittels Immuno-Blot-Verfahren zur Analyse der OmpW-Expression.

Der Nachweis des *ompW*-Gens mittels spezifischer Primer lieferte ein positives Signal in der errechneten Größe von 639 bp bei 99 von 100 getesteten Salmonellen-Stämmen (**Tabelle 19**). Einzig der Stamm SARC9 aus dem Serovar *S. Marina* war negativ. Die vier anderen Stämme des Serovars *S. Marina* waren hingegen positiv für *ompW* (**Abbildung 15, A**). Die Ergebnisse des PCR-Nachweises konnten in allen Fällen durch die Dot-Blot-Hybridisierung bestätigt werden (**Tabelle 19**).

Die 16 Stämme der SARC-Sammlung, die vier *S. Marina*-Stämme sowie die zehn *S. bongori*-Stämme wurden zusätzlich einer DNS-DNS-Hybridisierung im Southern-Blot-Verfahren unterzogen. Zu diesem Zweck wurde chromosomale Salmonellen-DNS gewonnen und ein *Asel*-Restriktionsverdau durchgeführt. Im Bereich von *ompW* besitzt *Asel* eine Restriktionsschnittstelle unmittelbar stromaufwärts des *ompW*-Startkodons und eine zweite Schnittstelle stromabwärts im *katN*-Gen. Das resultierende DNS-Fragment hat eine Größe von 1.228 bp, welche anhand der Datenbanksequenz von *S. Tm.* LT2 (NCBI-Datenbank #AE008777) ermittelt worden war. Bei *E. coli* ist dieser Bereich zwischen *ompW* und *katN* aufgrund einer Bakteriophagen-Insertionssequenz hochvariabel. Ziel der Southern-Blot-Hybridisierung von *Asel*-Fragmenten war es, zu klären, ob *ompW* stets chromosomal lokalisiert ist und wie variabel der *ompW*-Genlokus innerhalb des Genus *Salmonella* ist.

Bei allen 30 getesteten Salmonellen-Stämmen wurde, mit Ausnahme von SARC9, mit der *ompW*-spezifischen Sonde ein DNS-Fragment detektiert. Alle Stämme der Spezies *S. enterica* gaben, unabhängig von Ihrer Subspezies- oder Serovar-Zugehörigkeit, ein Signal im Bereich der erwarteten Größe von 1.228 bp. Die zehn Stämme der Spezies *S. bongori* zeigten hingegen zwei Banden, wobei die größere (ca. 3.000 bp) erst bei niedrigerer Stringenz (ab 55 °C) sichtbar wurde, die kleinere Bande (ca. 600 bp) jedoch bei allen Stämmen bereits bei hoher Stringenz (65 °C) auftrat. Datenbanksequenzen zu *ompW* bei Stämmen der Spezies *S. bongori* liegen derzeit noch nicht vor.

Das Gen *ompW* liegt bei den bisher sequenzierten Salmonellen unmittelbar zwischen den Leserahmen *stm1733* und *katN* (*S. Choleraesuis*, #NC_006905; *S. Paratyphi A*, #NC_006511; *S. Typhi*, #NC_003198; *S. Tm.* #NC_003197). Um zu prüfen, ob das *ompW*-Gen auch bei anderen Salmonellen in dieser Art und Weise positioniert ist,

wurden die Stämme zunächst mit genspezifischen PCRs auch auf die Präsenz von *stm1733* und *katN* untersucht. Bei allen 100 Stämmen konnten Amplifikate der errechneten Größen nachgewiesen werden (**Tabelle 19**). Zur Überprüfung der unmittelbaren Nachbarschaft von *stm1733* und *katN* mit dem *ompW*-Gen wurden die Stämme der SARC-Sammlung, die *S. bongori*-Stämme und die *S. Marina*-Stämme über drei verschiedene Kombinationen der genspezifischen Primer getestet (Lokalisations-PCRs). Die *ompW*-umgreifende Amplifikation des gesamten Bereiches von *stm1733* bis *katN* diente der Überprüfung auf mögliche Insertionen oder Deletionen in unmittelbarer Nachbarschaft von *ompW*. Die Kombinationen eines *ompW*-spezifischen Primers mit jeweils einem *stm1733*- oder *katN*-spezifischen Primer diente darüberhinaus der Überprüfung der Orientierung der Gene zueinander.

Die erzeugten Amplifikate und ihre Größe wiesen bei 29 von 30 getesteten Stämmen darauf hin, dass die Gene *stm1733*, *ompW* und *katN* auch bei den hier untersuchten Stämmen in derselben Art und Weise angeordnet sind wie bei *S. Tm. LT2*. Abweichende PCR-Ergebnisse lieferte der Stamm SARC9, der bereits in der genspezifischen PCR *ompW* negativ war (**Abbildung 15, A**). SARC9 zeigte mit den kombinierten Primern aus den genspezifischen PCRs kein Amplifikat für den Bereich *stm1733-ompW* sowie jeweils ein um ca. 600 bp kleineres Amplifikat für den Genbereich *ompW-katN* und in der umgreifenden PCR *stm1733-katN* (**Abbildung 15, B**).

Tabelle 19: Untersuchung der Verbreitung und der Lokalisation des *ompW*-Gens im Genus *Salmonella*

Stämme	Spezies	Sub- spezies	Anzahl der Stämme (positive/getestete)												
			genspezifisch ¹⁾						PCR						
			stm 1733		ompW		katN		lokalisationsspezifisch ²⁾		Dot-Blot		ompW-spezifische DNS-Hybridisierung		
stm 1733	ompW	ompW	katN	stm1733 -ompW	katN	ompW	stm1733- ompW	katN	80 °C	70 °C	60 °C	65 °C	55 °C	45 °C	
SARB1-72, SARC1/2	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	74/74	74/74	74/74	74/74	2/2	2/2	2/2	2/2	0/74	74/74	74/74	2/2	2/2
SARC3/4	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
SARC5/6	<i>enterica</i>	<i>arizonae</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
SARC7/8	<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
SARC9/10	<i>enterica</i>	<i>houtenae</i>	6/6	5/6 ³⁾	6/6	6/6	6/6 ⁴⁾	5/6 ³⁾	6/6 ⁴⁾	0/6	5/6 ³⁾	5/6 ³⁾	5/6 ³⁾	5/6 ³⁾	5/6 ³⁾
SARC11/12, 240-247	<i>bongori</i>	-	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	0/10
SARC13/14	<i>enterica</i>	<i>indica</i>	2/2	100	100	100	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
SARC15/16	<i>enterica</i>	VII	2/2	100	100	100	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Total [%]:			100	99	100	100	100	96	100	0	99	99	96	96	96

Erläuterungen:

- 1) Primerpaare: STD-33/STU-30 (*stm1733*), STD-34/STU-29 (*ompW*), STD-17/STU-19 (*katN*);
- 2) Primerpaare: STU-30/STD-34 (*stm1733-ompW*), STU-29/STD-17 (*ompW-katN*), STD-17/STU-30 (*stm1733-katN*);
- 3) Stamm SARC9 (Serovar Marina, 48:g:z₅₁:-) ist negativ für *ompW*;
- 4) Stamm SARC9 zeigt eine ca. 600 bp kleinere Bande.

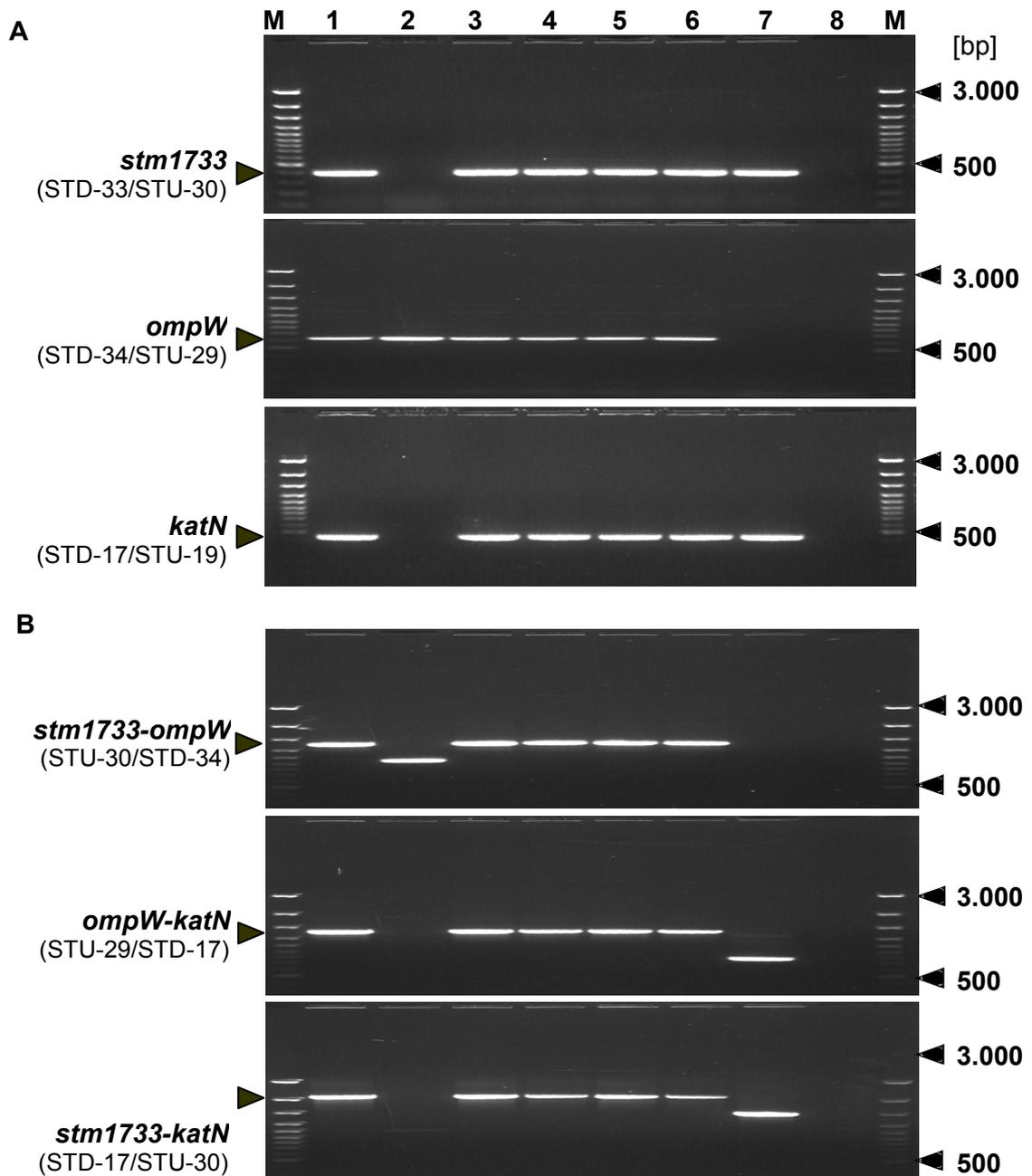


Abbildung 15: Nachweis von *ompW* und den benachbarten Leserahmen *stm1733* und *katN* (A) und Nachweis ihrer Nachbarschaft (B) bei Salmonellen mittels PCR

(1,5 % TAE-Agarosegele nach Ethidiumbromidfärbung);

bp, Basenpaare

Spur:

M, Molekularmassenstandard Gene Ruler plus®;

1, *S. Tm.* ATCC19585;

5, *S. Marina* 3019/01;

2, *E. coli* C600;

6, *S. Marina* 319/02;

3, *S. Marina* P6638/01;

7, *S. Marina* SARC9;

4, *S. Marina* P1056/06;

8, *A. dest.*

Zur Klärung der Frage, ob die genetisch *ompW*-positiven Stämme das OmpW-Protein auch tatsächlich exprimierten, wurde die Keimdichte von Übernachtskulturen über die $OD_{600\text{ nm}}$ standardisiert und das Salmonellenproteom von etwa 6×10^6 KbE mittels Immuno-Blot-Analysen der Keimlysate unter Verwendung des rOmpW-His-spezifischen Hyperimmunserums R-3116/06 untersucht. Es zeigte sich, dass alle 99 *ompW*-positiven Stämme unter Standard-Anzuchtbedingungen auch das Protein exprimierten, jedoch auf unterschiedlichen Expressionsniveaus. **Abbildung 16** zeigt exemplarisch jeweils zwei Salmonellen-Stämme mit sehr starkem (SARC10, SARB5), mit durchschnittlichem (SARB54, SARB30) und kaum detektierbarem (SARB48, SARB49) OmpW-Signal im Immuno-Blot. Der *ompW*-negative Stamm SARC9 zeigte als einziger Stamm keine OmpW-Expression. Die densitometrisch ermittelte Expressionsstärke schwankte, auf den *S. Tm.* Stamm SL1344 bezogen, zwischen 7 % (SARB49) und 1030 % (SARB45) (**Abbildung 17**). Die stärkste Expression von OmpW wiesen die Stämme der Serovare Paratyphi A und Paratyphi B auf, die sechs getesteten Stämme exprimierten OmpW etwa 5-10 mal stärker als SL1344. Eine extrem schwache Expression zeigten zwei Stämme des Serovars Paratyphi C mit 7 % (SARB49) und 26 % (SARB48), wobei ein dritter Stamm dieses Serovars (SARB50) mit etwa 150 % eine durchschnittliche Expression von OmpW aufwies. Die vier OmpW-positiven *S. Marina*-Stämme zeigten eine starke Expression des Proteins in einem Bereich zwischen 260 % und 420 %. Die vier Stämme des Serovars Typhimurium stellten sich bezüglich ihrer Expressionsstärken mit 105 % (SARB67), 125 % (SARB70), 160 % (SARB66) und 350 % (SARB65) sehr heterogen dar, wobei der Bezugsstamm SL1344 von allen getesteten Stämmen dieses Serovars die geringsten Mengen OmpW exprimierte.

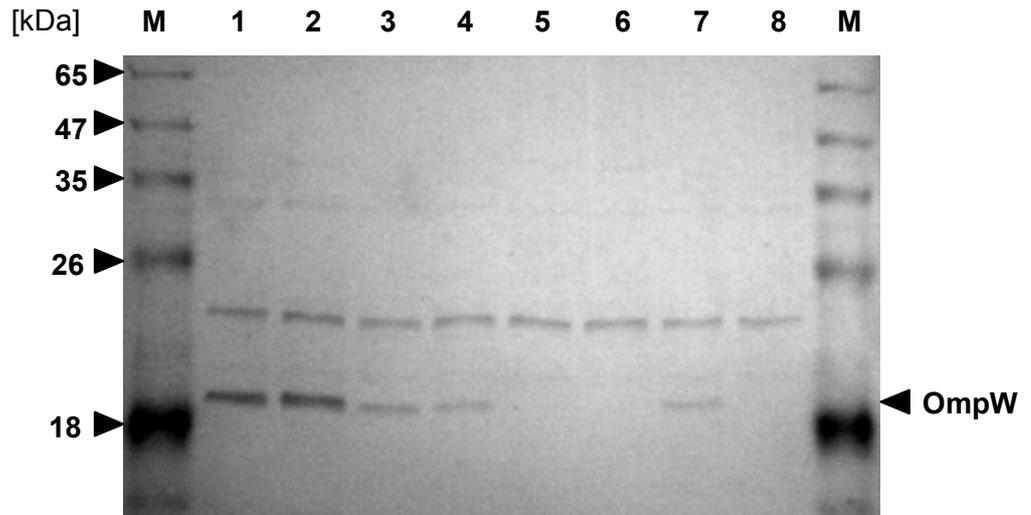


Abbildung 16: Unterschiedliche OmpW-Signalstärken von ausgewählten Salmonellen-Stämmen (Immuno-Blot von Ganzzelllysaten mit Serum R-3116/05, Meerrettich-Peroxidase gefärbt)

Spur:

M, Proteinmassenstandard, SeeBlue plus®;

1, SARC 10;

5, SARB 48;

2, SARB 5;

6, SARB 49;

3, SARB 54;

7, S. Tm. SL1344;

4, SARB 30;

8, S. Tm. SL1344 Δ ompW.

Anzahl
Stämme

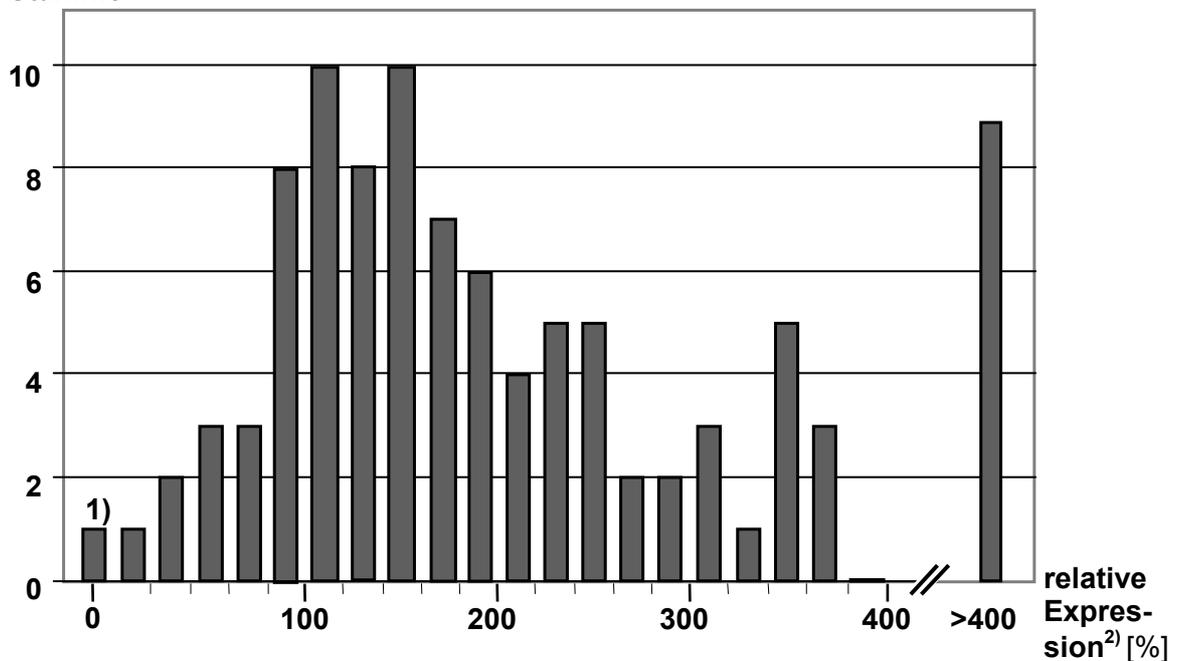


Abbildung 17: Überprüfung der OmpW-Expression bei Salmonellen mittels Immuno-Blot-Verfahren (Ergebnisse der Densitometrie)

1) Stamm SARC9 exprimiert OmpW nicht;

2) Bezogen auf die OmpW-Expression von S. Tm. SL1344 (=100 %).

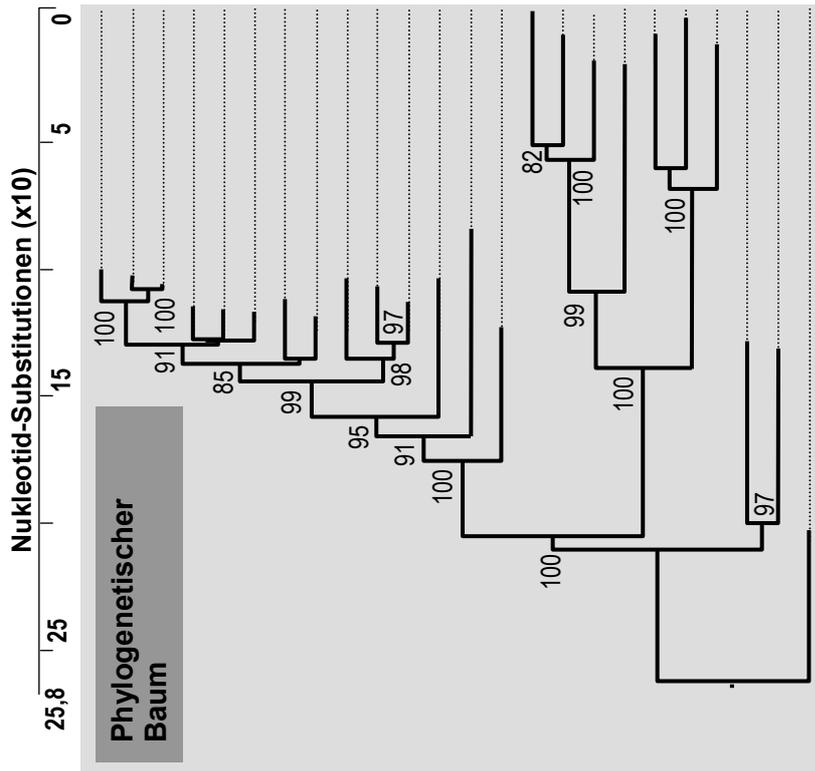
4.2.2 Vorkommen von *OmpW* bei anderen Bakterien

Das Vorkommen von *ompW* bzw. *ompW*-homologen Genen wurde nicht nur bei verschiedenen Salmonellen-Stämmen untersucht, sondern auch bei anderen Bakterien-Genera. Zu diesem Zweck wurde der Nachweis über das Vorkommen der Gene *stm1733*, *ompW* und *katN* mittels PCR geführt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der *ompW*-spezifischen PCR mittels der sensitiveren DNS-DNS-Hybridisierung im Dot-Blot- und im Southern-Blot-Verfahren nachvollzogen, um auch *ompW*-homologe Gensequenzen aufzuspüren.

Die PCR erbrachte den Nachweis des *ompW*-Gens für alle neun getesteten *E. coli*-Isolate sowie den *Shigella sonnei*-Stamm. Allerdings lieferte keiner der getesteten Bakterienstämme in der genspezifischen PCR für *stm1733* oder *katN* ein Signal, das auf das Vorhandensein dieser Gene schließen ließ. Die Ergebnisse in der *ompW*-spezifischen PCR waren bei zwei der getesteten *E. coli*-Stämme auffällig. Der *E. coli*-Stamm F107/86 (Serovar O139:K12:H1) zeigte nur eine schwache Bande, der Stamm 2324 (Serovar O157:H7) wies eine zusätzliche zweite Bande gleicher Intensität bei ca. 1.300 bp auf. Die Anwesenheit von *ompW* konnte bei allen PCR-positiven Stämmen mittels DNS-DNS-Hybridisierung sowohl im Dot-Blot-Verfahren als auch im Southern-Blot-Verfahren bestätigt werden. Die Signale wurden allerdings im Vergleich zu den untersuchten Salmonellen-Stämmen erst bei niedrigerer Stringenz sichtbar (**Tabelle 20**). Im Southern-Blot offenbarte sich bei den *E. coli*-Stämmen bezüglich der Bandengrößen ein sehr heterogenes Bild: Lediglich die Stämme C600 (K12) und H10407 (O78:K80:H11) wiesen die aufgrund der bekannten Gensequenz von *E. coli* K12 erwartete Bandengröße von ca. 1.400 bp auf (NCBI-Genbank #NC_000913). Die *ompW*-spezifische Sonde detektierte bei *E. coli* 2430 zwei DNS-Fragmente der Größen 3.500 bp und 5.100 bp. Bei den Stämmen 2324, 570/89 und HUS2 hybridisierte je eine Bande mit der Größe von 6.100 bp. Auch bei den übrigen *E. coli*-Stämmen hybridisierte je eine Bande, die allerdings jeweils eine unterschiedliche Größe zwischen 2.500 bp und 4.100 bp aufwies. Bei dem *Shigella sonnei*-Stamm hybridisierte eine 1.200 bp-Bande, was anhand von publizierten Sequenzdaten vorausberechnet worden war (NCBI-Genbank #NC_007384).

Bei einigen PCR-negativen Stämmen der Arten *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* und *Clostridium sporogenes* waren *ompW*-homologe Sequenzen mit der *ompW*-Gensonde nachweisbar, wenn die DNS-DNS-Hybridisierung bei niedriger Stringenz durchgeführt wurde. Mit Ausnahme des positiven Hybridisierungsergebnisses bei dem *Cl. sporogenes*-Stamm NCTC 532 war ein enger Zusammenhang zwischen phylogenetischer Verwandtschaft eines untersuchten Bakterienstammes zum Genus *Salmonella* und einem positiven *ompW*-Gennachweis festzustellen (**Abbildung 18**). Die Stämme aus den Genera *Escherichia* und *Shigella* sind den Salmonellen, bezogen auf ihre 16S-rRNS-Sequenzen, phylogenetisch am ähnlichsten. Der *ompW*-Gennachweis gelang bei diesen Stämmen sowohl in der *ompW*-spezifischen PCR wie auch mit der *ompW*-Sonde. Bakterienstämme des

nächst-verwandten phylogentischen Klusters, bestehend aus den Arten *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Serratia marcescens*, waren für *ompW* in der PCR negativ, es konnten jedoch *ompW*-homologe Sequenzen mit der DNS-Sonde detektiert werden. Alle Bakterien mit geringerem Verwandtschaftsgrad zu Salmonellen waren im *ompW*-Gennachweis negativ, mit Ausnahme des *Cl. sporogenes*-Stammes NCTC 532. *Cl. sporogenes* zeigte ein schwaches Signal sowohl in der Dot-Blot-Hybridisierung, als auch in der Southern-Blot-Hybridisierung mit der *ompW*-Sonde. Die von der *ompW*-Sonde im Southern-Blot-Verfahren detektierte Bande hatte eine Größe von etwa 1.200 bp und besaß damit etwa dieselbe Größe wie das detektierte DNS-Fragment bei *Salmonella enterica*. Die drei anderen getesteten Spezies aus dem Genus *Clostridium* waren in der DNS-DNS-Hybridisierung negativ (**Tabelle 20**).



Genus	gefestet		Anzahl positiver Reagenten ¹⁾					
	Spezies [n]	Stämme [n]	PCR			Dot-Blot (ompW)		
			stm1733	ompW	katN	80 °C	70 °C	60 °C
<i>Salmonella</i>	2	100	100	99	100	0	99 ¹⁾	99 ¹⁾
<i>Escherichia</i>	1	9	0	9	0	0	9	9
<i>Shigella</i>	1	1	0	1	0	0	1	1
<i>Citrobacter</i>	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Klebsiella</i>	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Serratia</i>	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Yersinia</i>	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Hafnia</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus</i>	4	9	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia</i>	5	5	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella</i>	1	3	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mannheimia</i>	4	4	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i>	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i>	4	4	0	0	0	1 ²⁾	1 ²⁾	1 ²⁾
<i>Actinomyces</i>	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>Dermatophilus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Rhodococcus</i>	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	3	3	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	1	2	0	0	0	0	0	0
<i>Bordetella</i>	1	1	0	0	0	0	0	0

Abbildung 18: Nachweis der Verbreitung des ompW-Gens und Zusammenhang mit der 16S-rRNS Phylogenie

(ClustalW-Analyse mit Bootstrap-Werten ≥ 70 % von 16S-rRNS-Nukleotid-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank: MegAlign DNA-Star, slow/accurate, IUB)

- 1) Stamm SARC9 (Serovar S. Marina) ist ompW negativ;
- 2) Stamm NCTC532 zeigt ein schwaches Signal.

Tabelle 20: Nachweis von *ompW* mittels Southern-Blot-Analyse bei verschiedenen Bakterienstämmen außerhalb des Genus *Salmonella*

Bakterien-Spezies	<i>ompW</i> -positive/getestete Stämme in der Southern-Blot-Hybridisierung		
	65 °C	55 °C	45 °C
<i>Escherichia coli</i>	0/9	2/9 ¹⁾	9/9
<i>Shigella sonnei</i>	0/1	0/1	1/1
<i>Citrobacter freundii</i>	0/1	1/1	1/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0/1	1/1	1/1
<i>Serratia marcescens</i>	0/1	0/1	0/1
48 Stämme aus 19 weiteren Genera ²⁾	1/43 ³⁾	1/43 ³⁾	1/43 ³⁾

Erläuterungen:

- 1) *E. coli* 570/89 (O111:H) und 2324 (O157:H7) reagierten bereits bei 55 °C mit der *ompW*-spezifischen Gensonde;
- 2) *Acinetobacter*, *Arcanobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Clostridium*, *Dermatophilus*, *Enterococcus*, *Hafnia*, *Listeria*, *Morganella*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*;
- 3) *Clostridium sporogenes* NCTC532 zeigt ein schwach positives Signal.

4.3 Untersuchungen zur biologischen Funktion von OmpW bei Salmonellen

4.3.1 Verifizierung OmpW-exprimierender und -defizienter Salmonellen-Stämme

4.3.1.1 Charakterisierung der natürlichen *ompW*-Deletionsmutante SARC9

Der als *ompW*-negativ identifizierte *S. Marina*-Stamm SARC9 wurde einer weiteren Identitätsprüfung unterzogen, wie auch die vier anderen *S. Marina*-Stämme aus der Stammsammlung des Institutes. Zunächst wurde die Zugehörigkeit zum Genus *Salmonella* mittels PCR überprüft. Als Kriterium dienten die Gene *invA* und *stn*, die als Salmonellen-spezifisch angesehen werden und für das Salmonellen Invasionsprotein A bzw. das *Salmonella*-Enterotoxin kodieren (Ziemer & Steadham, 2003). Die Serotypisierung durch das Robert-Koch-Institut bestätigte darüber hinaus die Identität als *S. Marina*-Isolate (**Tabelle 21**).

Zur Charakterisierung des *stm1733-katN*-Genlokus wurden die Stämme SARC9 und 3019/01 in diesem Bereich sequenziert. Nach den Ergebnissen der ClustalW-Analyse stimmte der *S. Marina*-Stamm 3019/01 mit dem *S. Tm.*-Stamm LT2 (NCBI-Genbank

#AAL20650) zu 98,6 % in der OmpW-Aminosäure-Sequenz überein, die *S. Tm.*-Stämme SL1344 und ATCC19585 mit LT2 sogar zu 100 % (**Abbildung 19**). Dagegen besaß der Stamm SARC9 eine 614 bp große Deletion, welche die 3'-gelegenen Teile von *ompW* und *katN* sowie deren intergenischen Bereich umfasste (**Abbildung 19**, **Abbildung 20** und **Abbildung 21**). Betroffen von der Deletion sind demnach die jeweils carboxyterminalen Abschnitte der Proteine OmpW und KatN, was im Falle von OmpW zu einem Proteinfragment von nur 95 Aminosäuren (**Abbildung 19**) und bei KatN zu einem um 46 Aminosäuren größeren Translationsprodukt (**Abbildung 20**) führt. Die Ähnlichkeit des trunkierten OmpW beträgt 58,3 % im Vergleich zu *S. Tm.* LT2. Insgesamt sind 158 Aminosäuren von den 213 Aminosäuren verändert bzw. deletiert. Legt man die für OmpW bei *E. coli* ermittelte Sekundärstruktur (Hong *et al.*, 2006) zugrunde, so besitzt das trunkierte OmpW von SARC9 nur eine der ursprünglich acht transmembranalen Beta-Faltblatt-Strukturen und besteht nach Abspaltung des mutmaßlichen Signalpeptids lediglich aus 32 unveränderten Aminosäuren (**Abbildung 19**).

Tabelle 21: Identitätsprüfung der *S. Marina*-Stämme mittels PCR und Serotypisierung

Stamm	Herkunft		Salmonellen-spez. PCR		Typisierungsergebnis des RKI	
	Isolation	Einsender	<i>invA</i>	<i>stn</i>	Subspezies	Serovar
SARC9	k. A.	SGSC	+	+	<i>houtenae</i>	Marina
3019/01	Leguan, Organ	Vet.-Patho.	+	+	<i>houtenae</i>	Marina
319/02	Schlange, Organ	Vet.-Patho.	+	+	<i>houtenae</i>	Marina
P6638/01	Schlange, Organ	Tierarzt	+	+	<i>houtenae</i>	Marina
P1056/96	Iguana, Kloaken- Tupfer	Tierarzt	+	+	<i>houtenae</i>	Marina

Erläuterungen: **RKI**, Robert-Koch-Institut, Werningerode; **SGSC**, *Salmonella* Genetic Stock Centre, University of Calgary, Kanada; **Vet.-Patho.**, Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig Universität Gießen; **k. A.**, keine Angaben.

	— Signalpeptid —	— $\beta 1$ —	— $\beta 2$ —	— $\beta 3$ — <i>L</i> —	
S. Typhimurium ¹⁾	MKKFTVAALALITLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
S. Choleraesuis	MKKFTVAALVLTLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
S. Typhi	MKKFTVAALALITLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
S. Paratyphi A	MKKFTVAALALITLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
S. Marina 3019/01	MKKFTVAALALITLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
S. Marina SARC9	MKKFTVAALALITLLSGSAFAHEAGEFFMRAGPATVTRPTEGAGGTLGHLNGFDVSNNTQLGLTFTTYMATDNI				80
	<i>P</i> — $\beta 3$ —	— $\beta 4$ — <i>PP</i> —	— $\beta 5$ —	— α —	— $\beta 6$ —
S. Typhimurium ¹⁾	PF HHK VG TG ATGDIATVHLLPPTLMAQWYFGDSSSKVRPYVGVGVNYTTFDNDFNDNGKNAGLSDLSEKDSWGAAGQVG				160
S. Choleraesuis	PF HHK VG TG ATGDIATVHLLPPTLMAQWYFGDSSSKVRPYVGVGVNYTTFDNDFNDNGKNAGLSDLSEKDSWGAAGQVG				160
S. Typhi	PF HHK VG TG ATGDIATVHLLPPTLMAQWYFGDSSSKVRPYVGVGVNYTTFDNDFNDNGKKTGLSDLSEKDSWGAAGQVG				160
S. Paratyphi A	PF HHK VG TG ATGDIATVHLLPPTLMAQWYFGDSSSKVRPYVGVGVNYTTFDNDFNDNGKKTGLSDLSEKDSWGAAGQVG				160
S. Marina 3019/01	PF HHK VG TG ATGDIATVHLLPPTLMAQWYFGDSSSKVRPYVGVGVNYTTFDNDFNDNGKKTGLSDLSEKDSWGAAGQVG				160
S. Marina SARC9	<u>AR</u> <u>SP</u> <u>PP</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> .				95
	— $\beta 7$ — <i>W</i> —	— $\beta 8$ —			
S. Typhimurium ¹⁾	VDYLINRDWLLIGASVWYMDIDTITANYKMGVQVHHDVRLDPWVFMFSAGYRF .				212
S. Choleraesuis	VDYLINRDWLLIGASVWYMDIDTITANYKMGVQVHHDVRLDPWVFMFSAGYRF .				212
S. Typhi	VDYLINRDWLLIGASVWYMDIDTITANYKMGVQVQHDVRLDPWVFMFSAGYRF .				212
S. Paratyphi A	VDYLINRDWLLIGASVWYMDIDTITANYKMGVQVQHDVRLDPWVFMFSAGYRF .				212
S. Marina 3019/01	VDYLINRDWLLIGASVWYMDIDTITANYKMGVQVQHDVRLDPWVFMFSAGYRF .				212

Abbildung 19: Vergleich der bisher bekannten OmpW-Aminosäure-Sequenzen von S. Tm. LT2 (#AAL20650), S. Choleraesuis SC-B67 (#YP216715), S. Typhi Ty2 (#AAO69271) und S. Paratyphi A (#AAV77106) mit Aminosäure-Sequenzen von S. Tm. ATCC19585²⁾, S. Tm. SL1344²⁾, S. Marina 3019/01²⁾ und S. Marina SARC9²⁾ (Aminosäure-Alignment mit dem Internet-Programm ClustalW, European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)

- 1) Identisch für die S. Typhimurium-Stämme LT2, SL1344 und ATCC19585.
 - 2) Aminosäuresequenzen, die aus eigenen Nukleotid-Sequenzierungen abgeleitet wurden;
- Konservierungsgrad der Aminosäuren (nach ClustalW): \underline{x} , identische Aminosäuren; \underline{x} , konservierte Substitutionen; \underline{x} , schwach konservierte Substitutionen; \underline{x} , nicht konserviert.
- Strukturelle Domänen (nach Hong *et al.*, 2006): α , mutmaßliche α -Helixstruktur; β , Membran-durchspannende β -Faltblatt-Struktur; *P*, mutmaßliche laterale Öffnung des β -Fasses umgeben von Prolinen;
- w*, *L*, hydrophobes Tor des β -Fasses bestehend aus den Aminosäuren L56 und W155 im maturen Protein.

LT2	MFRHVKQLQYTVRVSEPNPGLANLLLEQFGGPQOGELAAACRYFTQGLSDD	50
ATCC19585	MFRHVKQLQYTVRVSEPNPGLANLLLEQFGGPQOGELAAACRYFTQGLSDD	50
3019/01	MFRHVKQLQYTVRVSEPNPGLANLLLEQFGGPQOGELAAACRYFTQGLSDD	50
SARC9	MFRHVKQLQYTVRVSEPNPGLANLLLEQFGGPQOGELAAACRYFTQGLSDD	50
LT2	DAGRREMLMDIATEELSHLEIIGSLVGMNLKGAKEGELAEGTENEAEIYRS	100
ATCC19585	DAGRREMLMDIATEELSHLEIIGSLVGMNLKGAKEGELAEGTENEAEIYRS	100
3019/01	DAGRREMLMDIATEELSHLEIIGSLVGMNLKGAKEGELAEGTENEAEIYRS	100
SARC9	DAGRREMLMDIATEELSHLEIIGSLVGMNLKGAKEGELAEGTENEAEIYRS	100
LT2	LTQNGNDSHITSLLYGGGPALTNSSGGVPWTAAYIDTIGEVTADLRSNIAA	150
ATCC19585	LTQNGNDSHITSLLYGGGPALTNSSGGVPWTAAYIDTIGEVTADLRSNIAA	150
3019/01	LTQNGNDSHITSLLYGGGPALTNSSGGVPWTAAYIDTIGEVTADLRSNIAA	150
SARC9	LTQNGNDSHITSLLYGGGPALTNSSGGVPWTAAYIDTIGEVTADLRSNIAA	150
LT2	EARAKI IYERLINLTDDPGVKDTLSFLMTREVAHQLSFEKALYSIRNFP	200
ATCC19585	EARAKI IYERLINLTDDPGVKDTLSFLMTREVAHQLSFEKALYSIRNFP	200
3019/01	EARAKI IYERLINLTDDPGVKDTLSFLMTREVAHQLSFEKALYSIRNFP	200
SARC9	EARAKI IYERLINLTDDPGVKDTLSFLMTREVAHQLSFEKALYSIRNFP	200
LT2	PGKLPVVEQYTDVYYNMSQGDDPRGSWNSDENFNYVAEPMPAVDGGDGLA	250
ATCC19585	PGKLPVVEQYTDVYYNMSQGDDPRGSWNSDENFNYVAEPMPAVDGGDGLA	250
3019/01	PGKLPVVEQYTDVYYNMSQGDDPRGSWNSDENFNYVAEPMPAVDGGDGLA	250
SARC9	PGKLPVVEQYTDVYYNMSQGDDPRGSWNSDENFNYVAEPMPAVDGGDGLA	250
LT2	TVKLPREQMALLKAMAERTKSDPTVDPLTGAELGCCEPKEDK.	292
ATCC19585	TVKLPREQMALLKAMAERTKSDPTVDPLTGAELGCCEPKEDK.	292
3019/01	TVKLPREQMALLKAMAERTKSDPTVDPLTGAELGCCEPKEDK.	292
SARC9	TVKLPREQMALLKAMAERTKSDPTVDPLTGAELGCCEPKEDK.	300
LT2		292
ATCC19585		292
3019/01		292
SARC9	RIKNPASCANALPERRVFNARAATVNFPIPAPSLWL.	337

Abbildung 20: Vergleich der KatN-Aminosäure-Sequenzen von *S. Tm.* LT2 (#AE008777) mit KatN-Sequenzen von *S. Tm.* ATCC19585¹⁾, *S. Marina* 3019/01¹⁾ und *S. Marina* SARC9¹⁾ (Aminosäure-Alignment mit dem Internet-Programm ClustalW, European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK)

1) Aminosäuresequenzen, die aus eigenen Nukleotid-Sequenzierungen abgeleitet wurden;

Konservierungsgrad der Aminosäuren (nach ClustalW):

x, identische Aminosäuren; **x**, konservierte Substitutionen;

x, schwach konservierte Substitutionen; **x**, nicht konserviert.

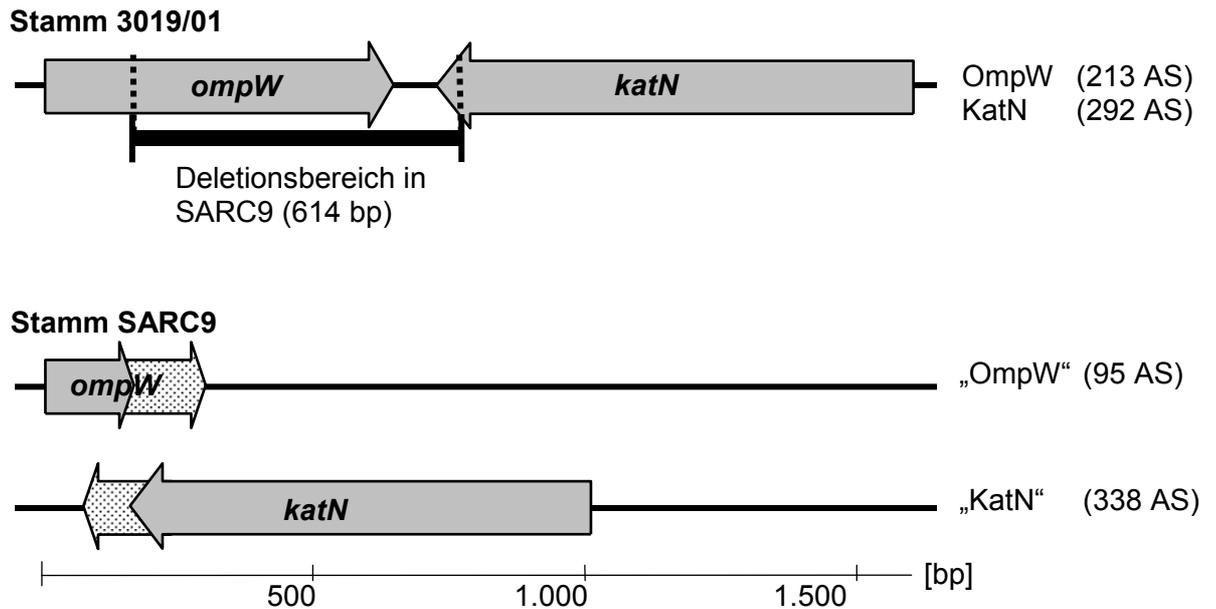


Abbildung 21: Genkarten vom Genbereich *ompW-katN* der *S. Marina*-Stämme SARC9 und 3019/01 (Ergebnisse der Sequenzanalysen)

AS, Aminosäuren; **Blockpfeile**, Leserahmen;
grau, ursprünglicher Leserahmen;
gepunktet, aufgrund der Deletion veränderter Bereich im Leserahmen.

4.3.1.2 Charakterisierung der gentechnisch erzeugten *ompW*-Knockout-Mutante SL1344 Δ *ompW*

Die Versuche zur Herstellung einer chromosomalen *ompW*-Knockout-Mutante von *S. Tm.* SL1344 durch homologe Rekombination führten nach elf Versuchen zum Erfolg. Ein Elektroporationsansatz mit 1,6 μ g aufgereinigtem Amplifikat aus der Template-PCR resultierte in einer einzigen Kolonie (SL1344 Δ *ompW*) mit der gewünschten Kanamycin-Resistenz. Diese Kolonie wurde zunächst mittels PCR überprüft. Hierbei konnte mit der für die *kan*-Genkassette spezifischen PCR zum einen das Vorhandensein der Kanamycin-Resistenzkassette (*kan*) nachgewiesen werden (Amplifikatgröße: ca. 470 bp), zum anderen mit der *ompW*-spezifischen PCR die erfolgte Integration von *kan* in das zu eliminierende *ompW*-Gen. Die inserierte *kan*-Genkassette wurde beidseits von kurzen *ompW*-Genfragmenten flankiert. Diese Genfragmente beinhalteten die Bindungsstellen der *ompW*-spezifischen PCR-Primer STU-29 und STD-34, so dass sich in der *ompW*-spezifischen PCR die Bandengröße des Amplikons durch die Integration der Resistenzkassette von ca. 640 bp im Wildtyp-Stamm SL1344 auf ca. 1.530 bp in der SL1344 Δ *ompW*-Mutante vergrößerte. Die benachbarten Leserahmen *stm1733* und

katN zeigten in der jeweiligen genspezifischen PCR die selben Amplifikatgrößen wie der Wildtyp-Stamm SL1344 (**Abbildung 22**). Auch PCRs mit verschiedenen Kombinationen der genspezifischen Primer für *stm1733*, *ompW* und *katN* lieferten Banden in den erwarteten Größen (**Tabelle 22**).

Um die Ergebnisse der PCRs zu bestätigen und sicherzustellen, dass nur eine Resistenzkassette in das Chromosom von SL1344 integriert worden ist, wurden *NaeI*- bzw. *Asel*-restringierte Präparationen des Salmonellenchromosoms mittels Southern-Blot-Hybridisierung untersucht. Dazu wurden sowohl die *S. Tm.*-Stämme ATCC19585 und SL1344 als auch die mutmaßliche SL1344 Δ *ompW*-Mutante mit einer *ompW*- und einer *kan*-spezifischen DNS-Sonde untersucht. Als Kontrolle für die Hybridisierung der Sonden wurde die für die Herstellung der Knockout-Mutante mit dem Primerpaar *OmpW_H1_Omp1/OmpW_H2_Omp2* amplifizierte *kan*-Resistenzkassette auf dem Southern-Blot mitgeführt. Das Amplifikat der *kan*-Resistenzkassette hatte eine Größe von 1.557 bp und hybridisierte wie erwartet mit der *kan*-spezifischen Gensonde. Eine Hybridisierung erfolgte, allerdings in geringerem Maße, auch mit der *ompW*-spezifischen Sonde. Verantwortlich hierfür sind die *ompW*-Fragmente an beiden Enden des Amplikons, die als homologe Extensionen H1 und H2 im Zuge der Amplifikation an die *kan*-Resistenzkassette angehängt worden waren. Wie zu erwarten war, hybridisierte bei den *S. Tm.* Wildtyp-Stämmen jeweils eine einzige diskrete Bande mit der *ompW*-Gensonde (1.228 bp/*Asel*-Fragment, 5.145 bp/*NaeI*-Fragment), während die DNS-Präparate der beiden Stämme mit der *kan*-Gensonde nicht reagierten. Dagegen hybridisierte ein 2134 bp (*Asel*) bzw. ein 2145 bp (*NaeI*) großes genomisches DNS-Fragment des Knockout-Stammes SL1344 Δ *ompW* mit der *kan*-spezifischen Gensonde (**Abbildung 25**). Damit bestätigte die Southern-Blot-Analyse die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen, dass das *ompW*-Gen in *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW* durch die *kan*-Kassette substituiert worden war. Der erzeugte Stamm war damit als chromosomale Knockout-Mutante SL1344 Δ *ompW* bestätigt. Darüber hinaus ließ sich die *kan*-Kassette ausschließlich am gewünschten Genort nachweisen.

Für die nachfolgenden funktionalen Analysen der Knockout-Mutante sollte auch eine Variante der SL1344 Δ *ompW*-Mutante hergestellt werden, bei der das fehlende *ompW*-Gen mit Hilfe des „low-copy“ Plasmids pBR322 *in trans* wieder eingeführt wurde. Die Klonierung erfolgte inklusive des stromaufwärts von *ompW* lokalisierten intergenischen Bereiches. Die erfolgreiche Integration in die *Scal*-Schnittstelle des Plasmids resultierte in einer Zerstörung des *bla*-Gens und damit einem Verlust der Ampicillin-Resistenz bei erhaltener Tetrazyklinresistenz. Für eine erste Selektion des zunächst transformierten *E. coli*-Stammes BL21(DE3) erfolgte eine parallele Anzucht auf Tetrazyklin- und Ampicillin-haltigen Nährböden, wobei zahlreiche Tetrazyklin resistente Transformanten identifiziert werden konnten, die Ampicillin-sensitiv waren. Das Plasmid einer Transformante mit entsprechenden Resistenzeigenschaften wurde im Bereich der *Scal*-Schnittstelle doppelsträngig sequenziert. Die DNS-Sequenzierung ergab die erfolgreiche Integration von *ompW* (**Abbildung 24**) und eine 100 %-ige Übereinstimmung mit den Sequenzen der *S. Tm.*-Stämme LT2 (NCBI-Genbank #AE008777) und ATCC19585. Dieses rekombinante Plasmid wurde als pHIT-VI-46 bezeichnet und nun

in die SL1344 Δ *ompW*-Mutante transformiert. Die Selektion erfolgte über Tetrazyklin- und Kanamycin-haltige Nährböden. Die Überprüfung der gewachsenen Kolonien auf das plasmidkodierte *ompW*-Gen erfolgte mittels *ompW*-spezifischer PCR (**Abbildung 23**). Der komplementierte Stamm SL1344 Δ *ompW*-C zeigte die zwei erwarteten Banden. Die größere Bande (ca. 1.500 bp) ist das Amplifikat der integrierten *kan*-Kassette, die wie vorgesehen an ihrem linken und rechten Ende noch die von dem *ompW*-Gen stammenden Primerbindungsstellen (homologe Extensionen H1 und H2) besaß. Die kleinere Bande (ca. 640 bp) reflektierte das über das Komplementierungsplasmid wieder eingeführte *ompW*-Gen. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass die SL1344 Δ *ompW*-Mutante über das Plasmid für *ompW* komplementiert werden konnte.

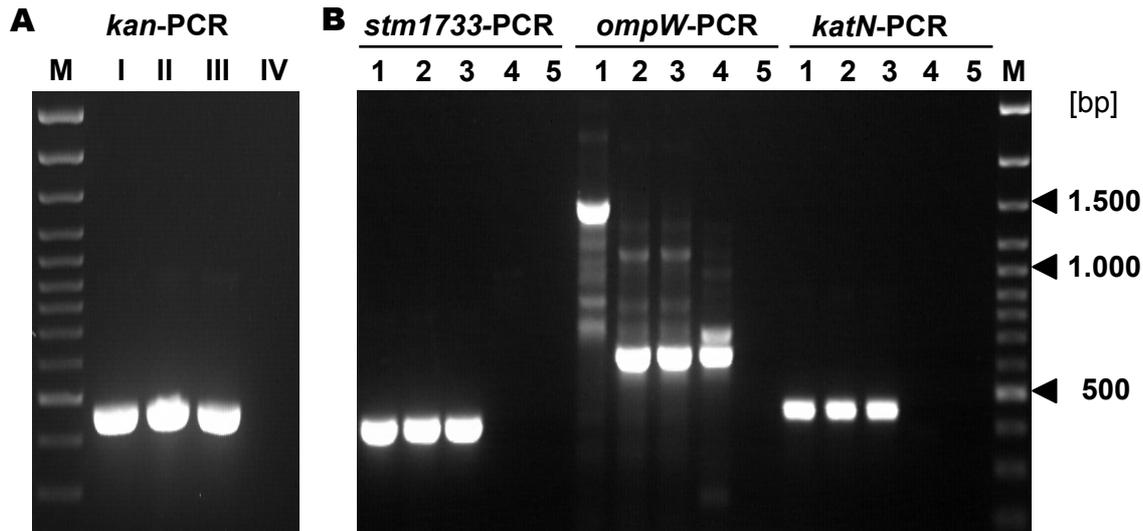


Abbildung 22: Verifizierung der SL1344 Δ *ompW*-Knockout-Mutante mittels PCR (1,5 % TAE-Agarosegel, Ethidiumbromid-gefärbt)

M, Molekularmassenstandard Gene Ruler plus[®]

Gel A: I, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*; III, pKD4;
II, JM109(pKD4); IV, *A. dest.*

Gel B: 1, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*; 4, *E. coli* C600;
2, *S. Tm.* SL1344; 5, *A. dest.*
3, *S. Tm.* ATCC19585;

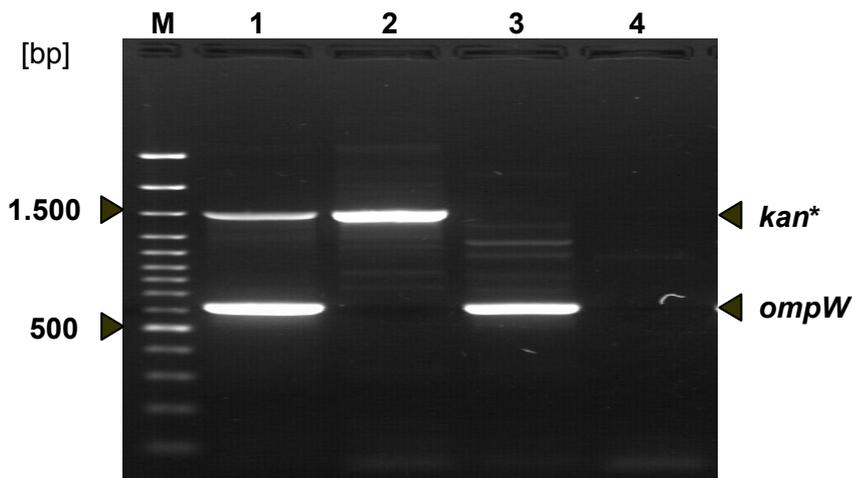


Abbildung 23: Überprüfung der komplementierten Knockout-Mutante SL1344 Δ *ompW*-C mittels *ompW*-spezifischer PCR (1,5 % TAE-Agarosegel, Ethidiumbromid-gefärbt).

1, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*-C; 3, *S. Tm.* SL1344;
2, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*; 4, *A. dest.*

*kan**, *kan*-Genkassette mit *ompW*-Sequenzfragmenten.

Tabelle 22: Übersicht über durchgeführte PCR- und Southern-Blot-Analysen zur genetischen Charakterisierung der S. Tm. SL1344 Δ ompW-Knockout-Mutante

Methode	Spezifikationen			Bandengröße [bp]			
	Restriktionsenzym ¹⁾	Primer bzw. Sonde ²⁾	Genbereich	WT		Δ ompW	
				Soll	Ist	Soll	Ist
genspezifische-PCR	-	STU-30/STD-33	<i>stm1733</i>	405	~400	405	~400
	-	STU-29/STD-34	<i>ompW</i>	639	~640	1.530	~1.500
	-	STU-19/STD-17	<i>katN</i>	445	~450	445	~450
	-	kt/k2	<i>kan</i>	k. S.	k. S.	471	~470
	-	pKD46-1/-2	pKD46	k. S.	k. S.	2.053	~2.000
Lokalisations-PCR	-	STU-30/STD-34	<i>stm1733-ompW</i>	1.365	~1.400	2.272	~2.300
	-	STU-29/STD-17	<i>ompW-katN</i>	1.382	~1.400	2.289	~2.300
	-	STU-30/STD-17	<i>stm1733-katN</i>	2.124	~2.100	3.031	~3.000
Southern-Blot-Hybridisierung	<i>NaeI</i>	STU-29/STD-32	<i>yciC-trpA</i>	5.145	~5.100	k. S.	k. S.
	<i>AseI</i>	STU-29/STD-32	<i>katN-ompW</i>	1.228	~1.200	k. S.	k. S.
	<i>NaeI</i>	kt/k2	<i>kan-stm1733</i>	k. S.	k. S.	2.134	~2.100
	<i>AseI</i>	kt/k2	<i>katN-stm1733</i>	k. S.	k. S.	2.145	~2.100

Erläuterungen: 1) Restriktionsfragment-Analyse nach Verdau chromosomaler Salmonellen-DNS mit dem entsprechenden Restriktionsenzym;
 2) Primerpaare für PCR-Amplifikation und DNS-Sonden-Herstellung (Primersequenzen siehe **Tabelle 12**);

Soll, errechnete Länge des Amplifikats anhand der veröffentlichten Nukleotid-Sequenz von S. Tm. LT2 (#AE008777);

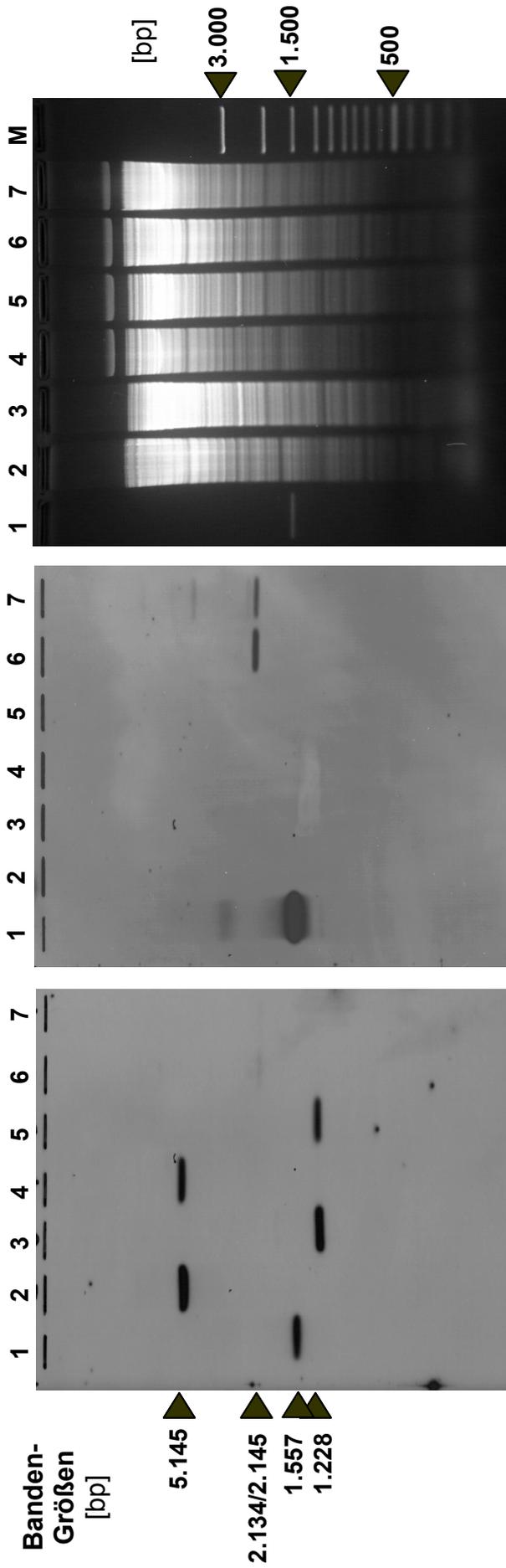
Ist, aufgrund der elektrophoretischen Motilität im Agarosegel geschätzte Amplifikat-Länge;

k. S., kein Signal, da Gen nicht vorhanden.

<u>AGTACT</u> GATC	ACCTGCAAAA	AACTAACGTA	TCAATAGATT	ACAACGGAAA	50
TTAATCTGTC	CCGCAGTGTT	CGCGAATCTT	AACGCCACGC	GCCATTGCGG	100
GACATTGATT	ACCTTAGCCA	GCCTTTATCG	CCAGGGCAAC	AGGAGCAGAC	150
AAATATTTGC	ATAGCGTGAA	TATGTCAAAA	TTGATCTGAA	TTCCTATAAC	200
CAGGATTTTC	AATACAAGTT	CTAAATTAAT	CTGGATCAAT	AAATGTTAAA	250
TTATAAGAAC	AAATGTGATC	TGTATTAGAT	CACTTATTAC	TTCATTGTGG	300
GTATATTCAT	CACGCTTTTA	TAACCATAAC	GATGGAGCGG	<u>GTATGAAAAA</u>	350
ATTTACAGTG	GCGGCACTGG	CGTTAACAAC	TCTTCTCTCA	GGCAGCGCGT	400
<u>TCGCGCACGA</u>	AGCCGGAGAA	TTCTTTATGC	GTGCAGGTCC	GGCAACCGTC	450
AGACCTACAG	AAGGGGCGGG	TGGTACGCTG	GGGCATTTAA	ACGGGTTTGA	500
TGTGAGTAAT	AACACGCAAC	TCGGCCTGAC	ATTCACCTAC	ATGGCGACGG	550
ACAATATCGG	GGTTGAATTG	CTGGCGGCTA	CGCCGTTCCG	CCATAAGGTG	600
GGTACGGGCG	CGACGGGCGA	TATCGCCACG	GTCCACCTGT	TACCGCCAAC	650
GTTAATGGCG	CAGTGGTACT	TCGGCGATTC	CAGCAGCAA	GTGCGTCCTT	700
ATGTCGGCGT	GGGGGTGAAC	TACACCACCT	TCTTCGATAA	CGACTTTAAC	750
GATAATGGTA	AAAATGCCGG	GCTGTCCGAT	CTGAGCTTTA	AGGATTCCTG	800
GGGCGCGGCA	GGGCAAGTTG	GGGTAGATTA	CCTGATTAAC	CGCGACTGGT	850
TAATTGGCGC	CTCTGTCTGG	TACATGGATA	TTGATACTAC	CGCCAATTAT	900
AAAATGGGCG	GCGTTCAGCA	TCATGACAGC	GTGCGTCTGGA	CCCATGGGT	1.000
ATTTATGTTC	TCGGCAGGCT	ATCGTTTCTA	<u>AAGTACT</u>		1.037

Abbildung 24: Nukleotid-Sequenz des Inserts im Komplementierungsplasmid pHIT-VI-46. (Ergebnis der Doppelstrangsequenzierung)

grau hinterlegt, *Sca*I-Restriktionsschnittstellen;
unterstrichen, kodiert Signalpeptid von *ompW*;
Fettdruck, Start- bzw. Stopcodon von *ompW*.



1 % TAE-Agarosegel nach Auftrennung von restringierter genomischer DNS, Ethidiumbromid-gefärbt

Southern-Blot, Hybridisierung von restringierter genomischer DNS mit der *kan*-spezifischen Sonde

Southern-Blot, Hybridisierung von restringierter genomischer DNS mit der *ompW*-spezifischen Sonde

Abbildung 25: Überprüfung der korrekten Insertion der Kanamycin-Resistenzgenkassette anstelle von *ompW* im Chromosom von *S. Typhimurium* SL1344 Δ *ompW* mittels DNS-DNS-Hybridisierung im Southern-Blot-Verfahren

- 1, PCR-Amplifikat der Kanamycinresistenz-Genkassette (*kan^R*) für die Substitution von *ompW*
- 2, *S. Tm.* ATCC19585 Nael-Verdau
- 3, *S. Tm.* ATCC19585 Asel-Verdau
- 4, *S. Tm.* SL1344 Nael-Verdau
- M, Molekularmassenstandard, Gene Ruler plus®
- 5, *S. Tm.* SL1344 Asel-Verdau
- 6, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW* Nael-Verdau
- 7, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW* Asel-Verdau

Abschließend wurden die erzeugten SL1344-Mutanten zur genetischen Charakterisierung anhand ihrer *Xba*I-Restriktionsmuster miteinander verglichen (**Abbildung 26**). Der SL1344-Wildtypstamm zeigte ein identisches Restriktionsmuster wie SL1344(pKD46) nach Hitze-induzierter Elimination des Rekombinaseplasmids pKD46. Wie erwartet hatte die Elektroporation und anschließende Elimination von pKD46 keinen Einfluss auf das *Xba*I-Restriktionsmuster von SL1344. Die SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante und der komplementierte Stamm unterschieden sich in ihrem *Xba*I-Restriktionsmuster vom Wildtypstamm, denn durch die Kanamycin-Resistenzkassette wurden zwei etwa 1,5 kB voneinander entfernt liegende *Xba*I-Schnittstellen in das Chromosom von *S. Tm.* SL1344 eingeführt. Das etwa 463 kB große *Xba*I-Fragment, auf dem *ompW* von *S. Tm.* liegt (Stamm LT2, #AE008777), fehlt daher den beiden SL1344-Mutanten. Die Mutanten weisen stattdessen zwei kleinere Fragmente auf, wovon das größere Fragment eine errechnete Größe von 346 kB besitzt und bei etwa 350 kB mit anderen Fragmenten im Agarosegel eine gemeinsame Bande bildet. Das kleinere, für die Knockout-Stämme charakteristische Fragment, hat eine errechnete Größe von 116 kB und ist bei beiden Stämmen als diskrete Bande bei etwa 120 kB zu erkennen. Die SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante unterscheidet sich vom komplementierten Stamm SL1344 $\Delta ompW$ -C lediglich durch eine geringfügig stärkere Bande im Bereich von etwa 0,5 kB, die auf das Komplementierungsplasmid pHIT-VI-46 (ca. 5.300 bp) zurückzuführen ist. Über den Restriktionsmustervergleich wurde bestätigt, dass die erzeugten isogenen Stämme Derivate des *S. Tm.*-Stammes SL1344 waren.

In einem weiteren Schritt wurde die SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante und der komplementierte Stamm SL1344 $\Delta ompW$ -C auf die Expression von OmpW untersucht. Hierzu wurden Immuno-Blot-Analysen mit den OmpW-spezifischen Antiseren R-3116/05 und R-1258/00 durchgeführt. Mit beiden Seren konnte OmpW bei der SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante nicht detektiert werden, wohl aber beim komplementierten Stamm SL1344 $\Delta ompW$ -C sowie beim Ausgangsstamm SL1344 (**Abbildung 27**). Der komplementierte Stamm zeigte darüber hinaus eine deutlich stärkere Expression von OmpW als SL1344. Die Immuno-Blot-Analyse bestätigte die erfolgreiche Herstellung einer SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante und deren Komplementierung mit *ompW* unter Regulation des natürlichen Promotors.

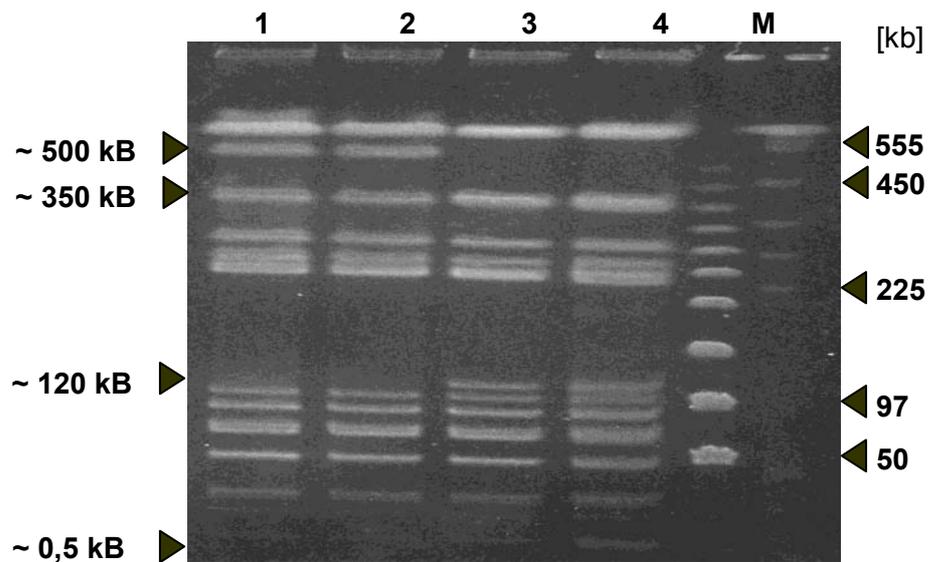


Abbildung 26: Identitätsprüfung der isogenen SL1344-Stämme anhand ihrer *Xba*I-Restriktionsmuster in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (1 % TBE-Agarosegel, Ethidiumbromid gefärbt).

Spur:

- 1, *S. Tm.* SL1344;
- 2, *S. Tm.* SL1344(pKD46), nach Elimination von pKD46;
- 3, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*;
- 4, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*-C;
- M, Molekularmassenstandards, Pulse Marker 50-1.000 kB[®];
Pulse Marker 225-2.200 kB[®].

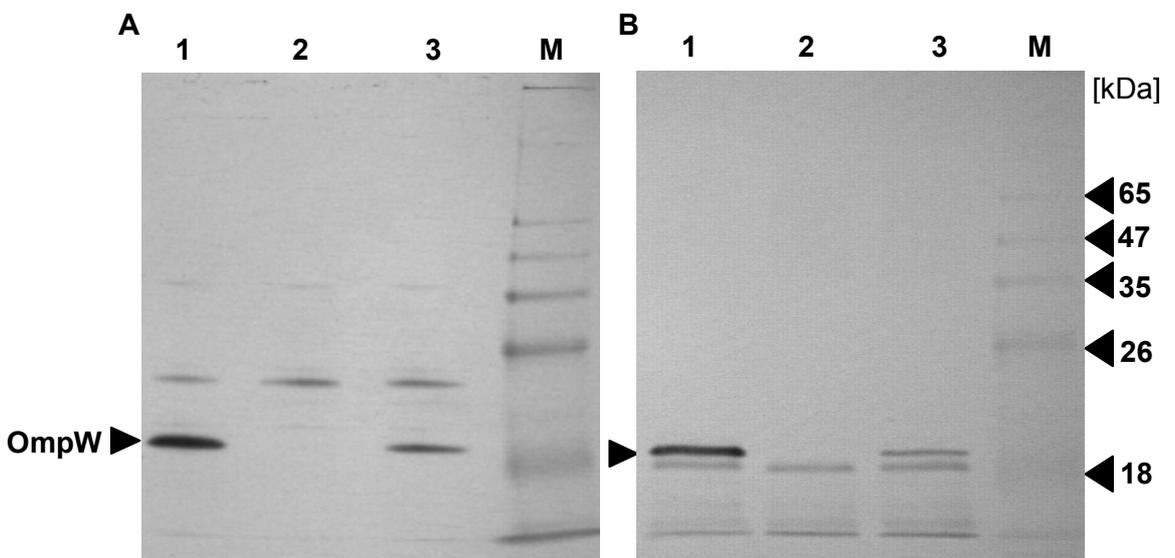


Abbildung 27: Nachweis der Expression von OmpW bei den isogenen SL1344-Stämmen (Immuno-Blot-Analyse von Ganzzelllysaten mit den OmW-spezifischen Seren R3116/05 [A] und R-1258/00 [B]).

Spur:

- 1, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*-C; 3, *S. Tm.* SL1344;
- 2, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*; M, Proteinstandard, SeeBlue plus[®].

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob OmpW auch in der komplementierten OmpW-Knockout-Mutante von SL1344 in der äußeren Membran des Bakteriums lokalisiert ist. Hierzu wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit dem Serum R-3116/05 durchgeführt (**Abbildung 28**). Die Salmonellen wurden im nativen Zustand mit dem Serum und dem AlexaFluor®-markierten Sekundärantikörper inkubiert und unmittelbar vor der Messung fixiert, permeabilisiert und mit dem DNS-Farbstoff Propidiumjodid gegengefärbt. Die drei SL1344-Stämme zeigten dabei keine Unterschiede in ihren Fluoreszenzeigenschaften. Für jeden der SL1344-Stämme waren etwa 5 % der Messereignisse als schwach positiv einzustufen und zeigten gleichzeitig eine Anfärbbarkeit von DNS mit Propidiumjodid. Über 85 % der DNS-haltigen Partikel waren jedoch negativ für OmpW. Damit konnte für alle drei Stämme kein OmpW-Nachweis auf der Oberfläche der Salmonellen mit dem Serum R-3116/06 erbracht werden.

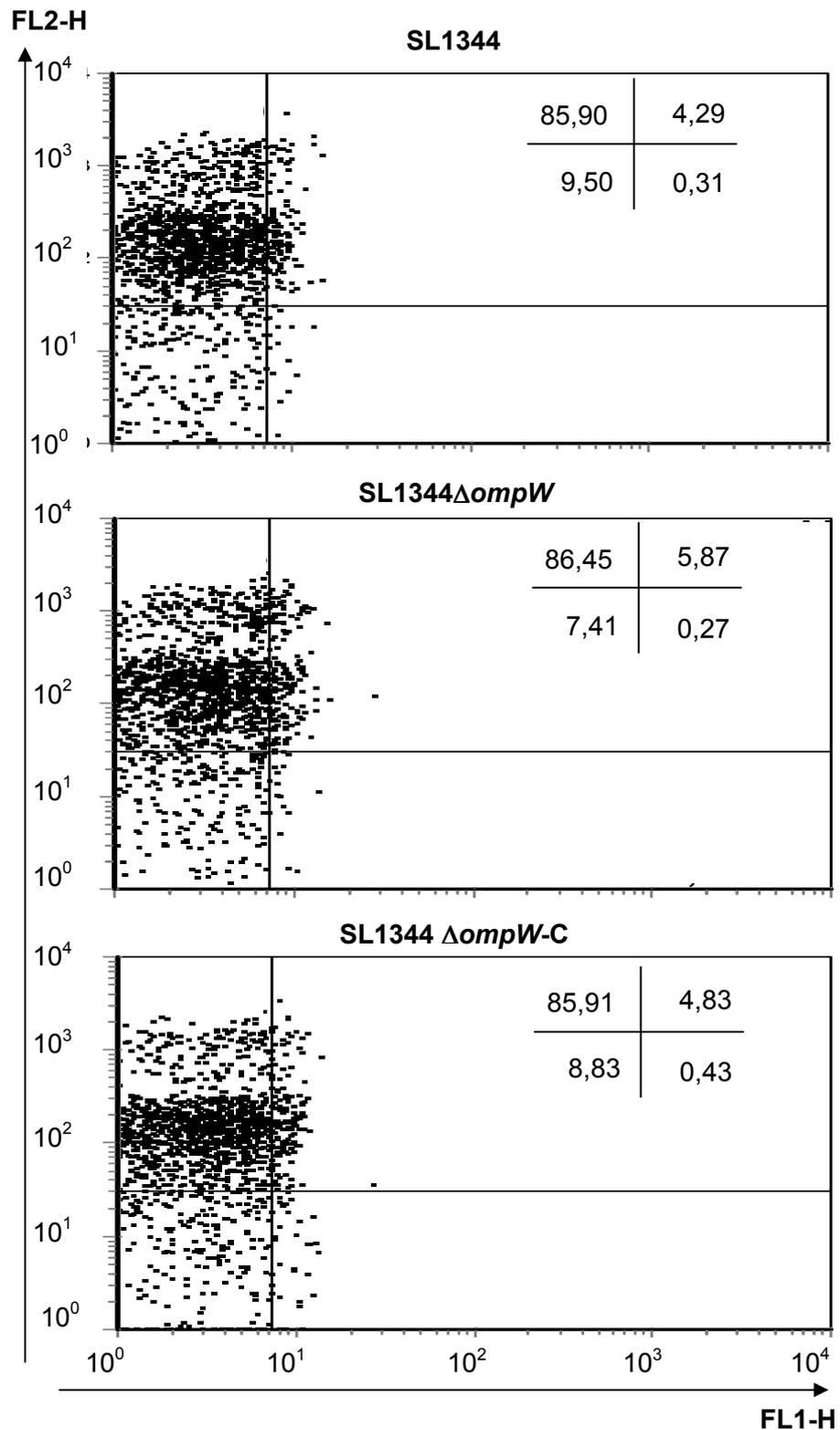


Abbildung 28: Untersuchung der Oberflächenlokalisierung von OmpW an nativen Salmonellen-Präparationen im Durchflusszytometer (Immundeckoration durch das rOmpW-His-spezifische Hyperimmenserum R-3116/05 und Detektion mit einem Alexa-Fluor[®]-markierten Sekundärantikörper).

FL1-H, Fluoreszenzsignal für Alexa-Fluor[®];
FL2-H, Fluoreszenzsignal für Propidiumjodid.

4.3.2 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von OmpW

Ziel der Untersuchungen war es, phänotypische Unterschiede zwischen OmpW-exprimierenden und OmpW-defizienten Stämmen zu finden und damit die physiologische Funktion von OmpW für Salmonellen aufzudecken. Für die Tests standen einerseits die natürliche OmpW-Deletionsmutante *S. Marina* SARC9 und vier andere OmpW-exprimierende *S. Marina*-Stämme zur Verfügung, andererseits der *S. Tm.*-Stamm SL1344 und seine isogenen Mutanten *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW* und *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW-C*.

4.3.2.1 Biochemische Stoffwechselleistungen

Zur phänotypischen Charakterisierung der OmpW-exprimierenden und -defizienten Salmonellen-Stämme wurde zunächst untersucht, wie sich das Fehlen von OmpW auf die Aufnahme und Verstoffwechslung von verschiedenen Substraten auswirkte. Hierzu wurde der kommerzielle api20E[®]-Test eingesetzt, der 20 Stoffwechselleistungen der Enterobacteriaceae erfaßt.

Die Stoffwechselleistungen waren in allen Fällen Salmonellen-typisch (**Tabelle 23**). So konnten alle Teststämme mit einer Sicherheit von 93 % - 99 % als Salmonellen identifiziert werden. Die *S. Marina*-Stämme wiesen untereinander hauptsächlich Unterschiede in der Verstoffwechslung von Zuckern auf. Der OmpW-defiziente Stamm SARC9 unterschied sich von den anderen *S. Marina*-Stämmen lediglich in der Unfähigkeit Sorbitol zu verstoffwechseln. Es wurden jedoch keine Unterschiede in den Stoffwechselleistungen des SL1344 Wildtyp-Stammes und seiner isogenen SL1344 Δ *ompW*-Mutante festgestellt. Der komplementierte Stamm SL1344 Δ *ompW-C* zeigte eine geringfügig schwächere Verstoffwechslung von Arginin und Arabinose. Eine weitere Beobachtung in Bezug auf die Stoffwechseleigenschaften konnte bei der Anzucht der *S. Marina*-Stämme auf Schafblutagar-Nährböden gemacht werden, denn Kolonien des Stammes SARC9 waren von einem Hämolysehof umgeben, während die vier anderen Stämme des Serovars *S. Marina* keine hämolytischen Eigenschaften aufwiesen. Die isogenen SL1344-Stämme liefern jedoch keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen von OmpW und den Hämolyseigenschaften, denn keiner der drei Stämme ist zur Hämolyse befähigt.

Tabelle 23: Charakterisierung biochemischer Stoffwechselleistungen von Salmonellen-Stämmen mittels api-20E®-Testsystem

Substrat	S. Tm. SL1344			S. Marina				
	WT	$\Delta ompW$	$\Delta ompW-C$	SARC9	3019/01	319/02	P6638/01	P1056/96
ONPG/IPTG	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginin	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Lysin	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithin	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrat	-	-	-	+	+	+	+	+
Thiosulfat	+	+	+	+	+	-	+	+
Harnstoff	-	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophan	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvat	-	-	-	-	-	-	-	+
Gelantine	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-/+
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	-	+	+
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-/+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	-	+	+
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinose	+	+	(+)	+	+	+	+	+
Sicherheit der Identifikation als <i>Salmonella</i> sp. [%]	93	93	93	99	98	97	98	99

Erläuterungen: WT, SL1344-Wildtyp; **ONPG**, Ortho-nitro-phenyl- β -D-Galaktopyranosid; **IPTG**, Isopropylthiogalaktopyranosid; **grau hinterlegt**, *OmpW*-defizient.

4.3.2.2 Fitness unter verschiedenen *in vitro*-Wachstumsbedingungen

In weiteren Versuchen, der Bedeutung von OmpW auf die Spur zu kommen, wurde untersucht, wie sich das Fehlen von OmpW auf die Vermehrungseigenschaften der Salmonellen in verschiedenen Nährmedien auswirkte.

Zunächst wurden die Stämme hinsichtlich ihrer Motilität auf Schwärmpplatten untersucht, um zu überprüfen, inwieweit das Fehlen von OmpW einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Salmonellen ausübt. Innerhalb des Serovars *S. Marina* war die Beweglichkeit sehr heterogen ausgeprägt (**Abbildung 29**). Der OmpW-defiziente Stamm SARC9 war zusammen mit dem Stamm 319/02 hoch signifikant weniger beweglich als die übrigen drei *S. Marina*-Stämme (t-Test, $p \leq 0,001$). Des Weiteren konnten für den Stamm SARC9 deutlich zwei Wachstumszonen unterschieden werden. Der Stamm SARC9 liegt demnach in einer stärker und in einer weniger beweglichen Phase vor. Die SL1344 Δ ompW-Mutante zeigte dieses Phänomen nicht. Sie wies gegenüber dem SL1344 Wildtyp-Stamm und dem komplementierten Stamm eine schwach signifikant (t-Test, $p \leq 0,05$) stärkere Beweglichkeit auf.

Die Salmonellen-Stämme wurden in weiteren Versuchsreihen unter verschiedenen Einflüssen in LBM angezüchtet und in ihren Wachstumseigenschaften gegeneinander verglichen. Dabei wurde das Wachstum in saurem pH, unter Einfluss hoher Osmolarität (hohe NaCl-Konzentrationen) sowie unter oxidativem Stress (Zusatz von Methylviologen) gemessen. Bei anderen Bakterien ist es vermutet oder bereits nachgewiesen worden, dass diese Faktoren einen Einfluss auf die Expression von OmpW-strukturhomologen Proteinen hatten. Ziel war es, zu untersuchen, ob das Fehlen von OmpW das Wachstum von Salmonellen unter diesen Milieubedingungen maßgeblich beeinflusst. Als zusätzliche Vergleichsstämme wurden die *E. coli* K12-Stämme BL21(DE3), BL21(DE3, pBR322) und BL21(DE3, pHIT-VI-46) mitgeführt.

Unter Standard-Anzuchtbedingungen in LBM (37 °C, 180 rpm) vermehrten sich die *S. Tm.*-Stämme, die *S. Marina*-Stämme und auch die *E. coli*-Stämme sehr ähnlich. Lediglich die Stämme, die mit einem rekombinanten Plasmid transformiert worden waren, wuchsen etwas langsamer. SARC9 vermehrte sich geringfügig langsamer und erreichte geringere Keimdichten als die anderen *S. Marina*-Stämme.

Nach Ansäuerung (pH 5, pH 4,5, pH 4 oder pH 3,5), Zusatz unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen (0,5 %, 2,5 %, 5 % oder 7,5 %) oder nach Zugabe von Methylviologen (50 μ M, 100 μ M oder 500 μ M) vergrößerten sich die Unterschiede im Wachstumsverhalten. **Abbildung 30** zeigt die Wachstumskurven der Teststämme unter Standardanzuchtbedingungen in LBM sowie exemplarisch nach Ansäuerung auf pH 3,5, unter Zusatz von 5 % NaCl oder von 500 μ M Methylviologen, da unter diesen Bedingungen die Wachstumsunterschiede zwischen den Stämmen am deutlichsten ausgeprägt waren. Allgemein konnte festgestellt werden, dass die *E. coli* K12-Stämme im Vergleich zu den Salmonellen unter extremen Milieubedingungen im Wachstum stark beeinträchtigt waren. Die plasmidtragenden *E. coli*-Stämme waren dabei stets empfind-

licher als der ursprüngliche Stamm BL21(DE3). Bei den *S. Marina*-Stämmen wuchs der OmpW-defiziente Stamm SARC9 in allen Medien deutlich schlechter als die vier OmpW-exprimierenden Stämme. Dies äußerte sich derart, dass SARC9 sowohl unter dem Einfluss hoher NaCl-Konzentrationen als auch nach Methylviologen-Zusatz einen deutlich verzögerten Wachstumsbeginn und zu allen Messzeitpunkten deutlich niedrigere Keimdichten aufwies als die anderen *S. Marina*-Stämme. Besonders stark war die Wachstumsbeeinträchtigung von SARC9 bei pH 3,5, denn nach 50 Stunden Inkubationszeit war kein messbares Wachstum festzustellen, während die anderen *S. Marina*-Stämme bereits nach etwa 24 Stunden in die stationäre Wachstumsphase eingetreten waren. Die OmpW-exprimierenden *S. Marina*-Stämme hatten gegenüber dem SL1344-Wildtyp eine etwas höhere Toleranz gegenüber der hohen NaCl-Konzentration und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite unter dem Einfluss von Methylviologen. Dies lässt sich schlussfolgern aus dem früheren Wachstumsbeginn der *S. Marina*-Stämme, der besseren Vermehrung in der exponentiellen Wachstumsphase und den höheren erreichten Keimdichten am Ende der Inkubationszeit. Trotz gewisser Unterschiede zwischen SARC9 und den OmpW-positiven *S. Marina*-Stämmen waren zwischen dem SL1344-Wildtypstamm und der SL1344 Δ ompW-Mutante jedoch in allen Medien nahezu deckungsgleiche Wachstumsverläufe zu beobachten. Der mit dem Plasmid komplementierte Stamm SL1344 Δ ompW-C zeigte stets ein zunächst langsames Wachstum, welches später kompensiert und zum Teil auch überkompensiert wurde.

Weitere Untersuchungen zu den *in vitro*-Wachstumseigenschaften wurden mit Casaminsäure-supplementiertem- (M9-Ca-) Mangelmedium durchgeführt. Verschiedene Supplemente, die bereits in der Literatur mit der Expressionsmodulation von OmpW-homologen Proteinen in Verbindung gebracht worden waren, wurden dem M9-Ca-Mangelmedium. Die Hochregulation der OmpW-Expression unter erhöhten Eisenionenkonzentrationen im Umgebungsmilieu konnte für *Salmonella enterica*, aber auch für einige andere Bakteriengenera, festgestellt werden. Aus diesem Grund sollte anhand der OmpW-defizienten Teststämme überprüft werden, ob das Fehlen von OmpW einen Einfluss auf das Wachstum der Salmonellen bei unterschiedlicher Eisenionenverfügbarkeit hat. Zu diesem Zwecke wurden die Wachstumseigenschaften in Glukose-supplementiertem M9-Ca-Mangelmedium (M9-Glu) mit Eisenionenzusatz (100 μ M) sowie in M9-Ca-Mangelmedium mit Zusatz des Eisenionenchelatbildners 2,2-Dipyridil (100 μ M) untersucht (**Abbildung 31**). Im Vergleich zum Wachstum in LBM unter Standard-Anzuchtbedingungen war allgemein festzustellen, dass der Wachstumsbeginn im M9-Glu-Mangelmedium um etwa vier Stunden verzögert war und die Bakterienstämme auch entsprechend später in die stationäre Wachstumsphase eintraten. Die erreichten Keimdichten in der stationären Wachstumsphase waren im M9-Glu-Mangelmedium etwas niedriger als in LBM. Unter den *S. Marina*-Stämmen zeigte der ompW-defiziente Stamm SARC9 das deutlich schlechteste Wachstum im M9-Glu-Mangelmedium. Nahezu identische Wachstumsverläufe waren im Eisenionensupplementierten Medium zu beobachten, wohingegen der Zusatz des Dipyridils zu einem schlechteren Wachstum (um etwa 65 % reduziert) von SARC9 führte. Ein

Einfluss des Eisenionengehaltes im Medium auf das Wachstum konnte für die vier *OmpW*-exprimierenden Stämme nicht festgestellt werden. Die Wachstumseigenschaften der isogenen SL1344-Stämme waren durch die Eisenionenverfügbarkeit nicht beeinflusst. Die Wachstumskinetiken von SL1344 und der isogenen SL1344 Δ *ompW*-Mutante waren stets annähernd deckungsgleich, lediglich der komplementierte Stamm vermehrte sich etwas schlechter. Eine deutliche Beeinflussung der Wachstumseigenschaften durch die Eisenionenverfügbarkeit konnte bei den *E. coli*-Kontrollstämmen beobachtet werden. Hier war das Wachstum im Eisenionen-supplementierten M9-Glu-Mangelmedium deutlich besser als im Eisenmangelmedium. Wie bei den Salmonellen-Stämmen wuchsen die plasmidtragenden *E. coli*-Stämme schlechter als der Ursprungsstamm BL21(DE3) (**Abbildung 31**).

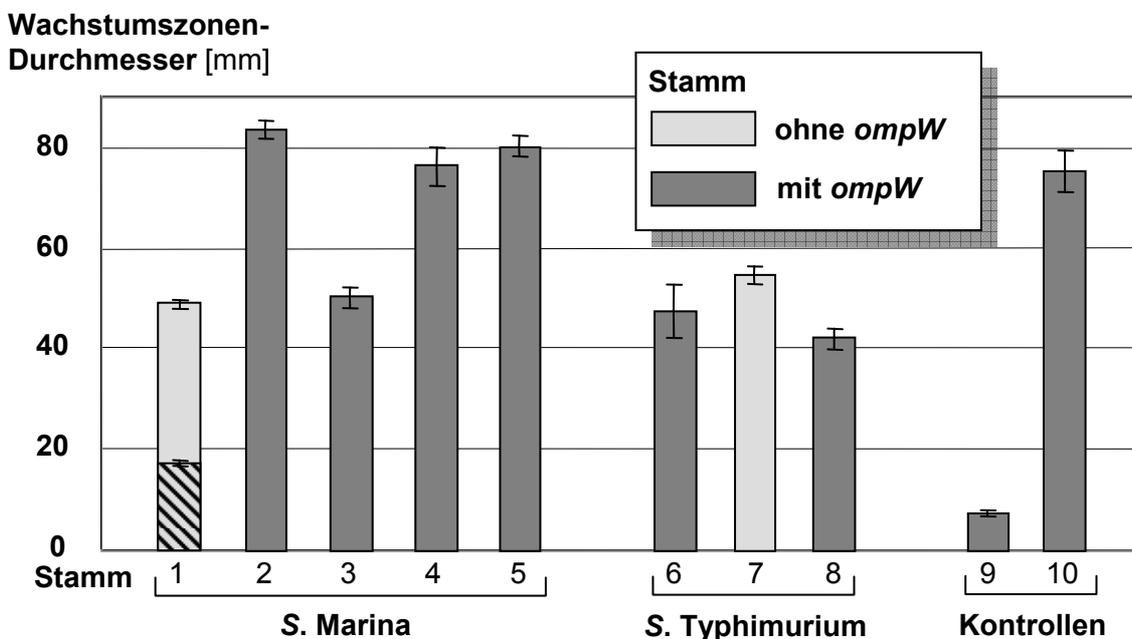
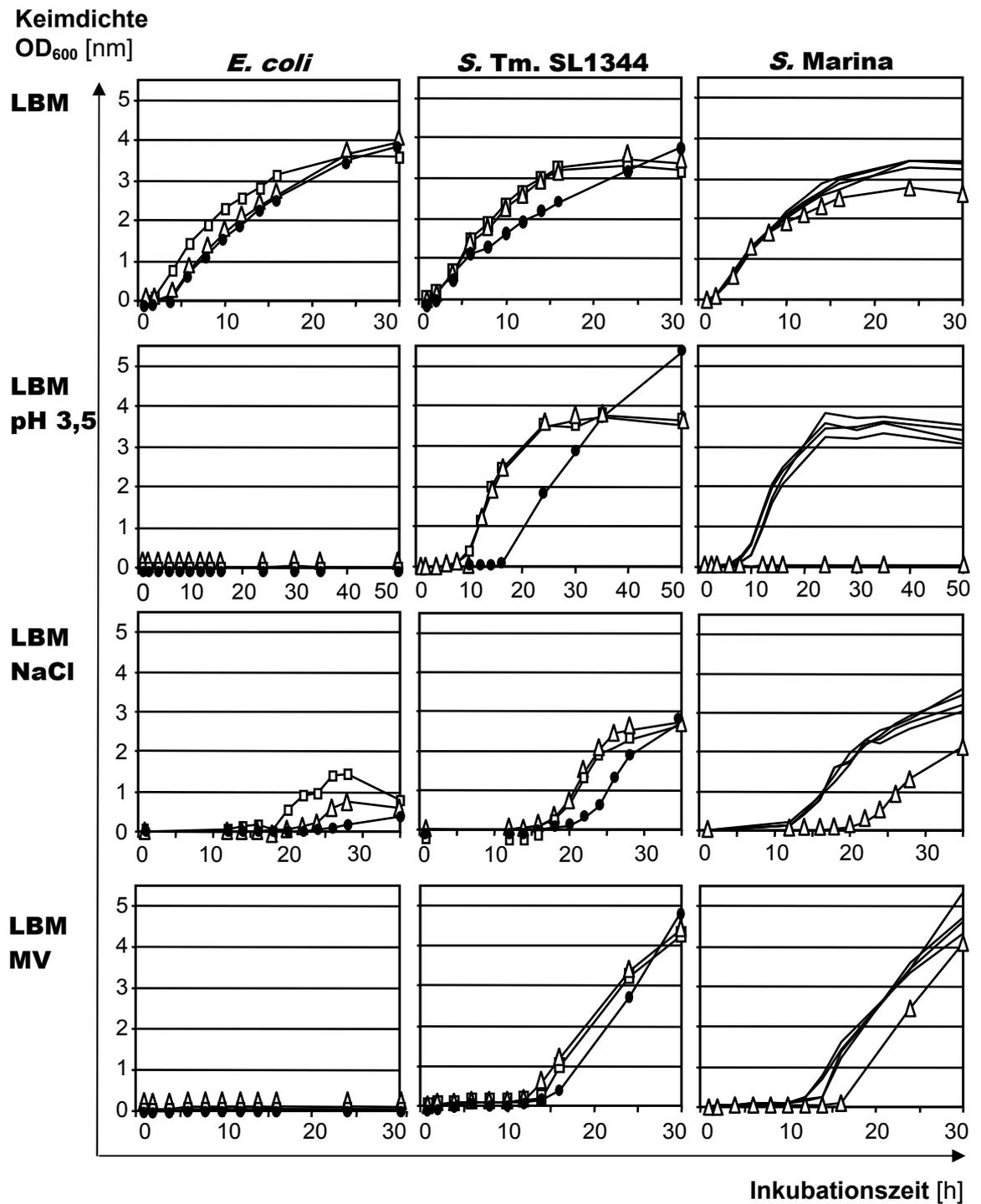


Abbildung 29: Untersuchung des Einflusses von *OmpW* auf die *in vitro*-Motilität von Salmonellen (Durchmesser der Wachstumszonen auf Schwärmplatten; Standardabweichungen und Mittelwerte aus drei Versuchen.)

schraffiert, Wachstumszone der weniger beweglichen Phase von SARC9.

- 1, *S. Marina* SARC9;
- 2, *S. Marina* 3019/01;
- 3, *S. Marina* 319/02;
- 4, *S. Marina* P6638/01;
- 5, *S. Marina* P1056/96;

- 6, *S. Typhimurium* SL1344;
- 7, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*;
- 8, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*-C;
- 9, *E. coli* C600;
- 10, *S. Tm.* ATCC19585.



<u><i>E. coli</i>-Stämme</u>	<u>SL1344-Stämme</u>	<u><i>S. Marina</i>-Stämme</u>
□ BLR(DE3)	□ Wildtyp	△ SARC9
△ BLR(DE3,pBR322)	△ $\Delta ompW$	— vier <i>ompW</i> -positive Feldisolate
● BLR(DE3,pHIT-IV-46)	● $\Delta ompW-C$	

Abbildung 30: *In vitro*-Wachstumseigenschaften von *E. coli* und Salmonellen-Stämmen in Luria-Bertani-Medium unter verschiedenen Stressbedingungen

LBM, Luria-Bertani-Medium; **NaCl**, Natriumchlorid (5 %);
MV, Methylviologen (500 μ M).

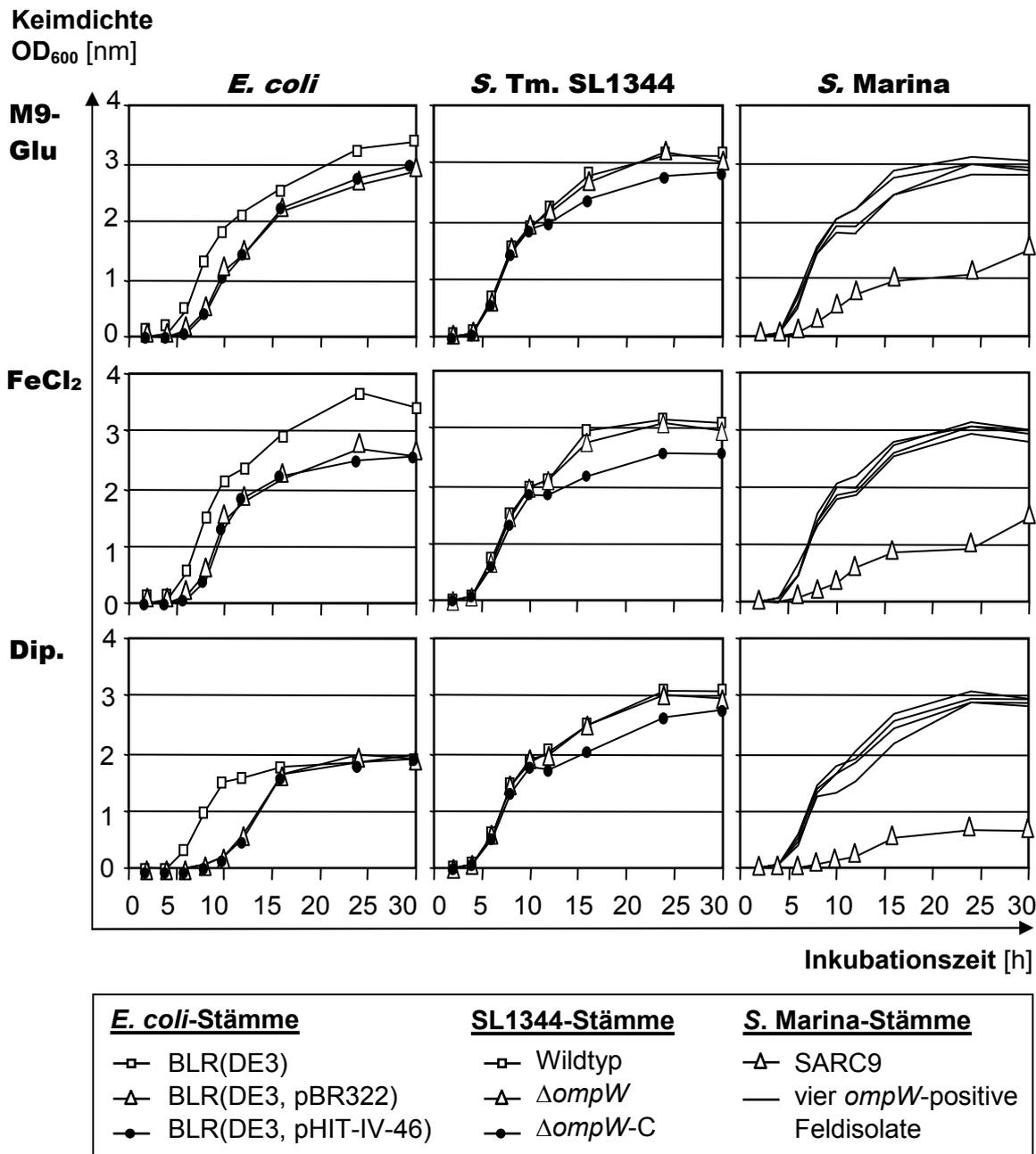


Abbildung 31: *In vitro*-Wachstumseigenschaften von *E. coli* und Salmonellen-Stämmen in Abhängigkeit von der Eisenionenverfügbarkeit (Ergebnisse der Anzuchtversuche in M9-Glu-Mangelmedium)

M9-Glu, M9-Ca-Mangelmedium mit 0,2 % Glukose;
FeCl₂, M9-Glu mit Zusatz von Eisen-II-chlorid (100 µm);
Dip., M9-Glu mit Zusatz von 2,2-Dipyridil (100 µm).

Ein weiteres Ziel war, die mögliche Funktion von OmpW als Porin bei der Aufnahme von kleineren organischen Molekülen, die aufgrund der Strukturanalysen von OmpW bei *E. coli* als mögliches Substrat vermutet werden, zu beleuchten. Dazu wurde Glukose-freies M9-Ca-Mangelmedium mit verschiedenen niedermolekularen Kohlenstoffverbindungen supplementiert und die Vermehrung der Teststämme unter diesen Bedingungen ermittelt. Die Auswahl an Substraten orientierte sich an vorherigen Untersuchungen zu OmpW-homologen Proteinen anderer Bakterien. Aufgrund des Vorhandenseins einer potentiellen Glycerin-/Pentosen-Bindungstelle im OmpW-Protein wurden insbesondere unterschiedliche Monosaccharide und Glycerin als Substrat eingesetzt (**Abbildung 32**).

Die isogenen Salmonellen-Stämme zeigten im M9-Ca-Mangelmedium ohne Glukose (M9-Ca) aufgrund der limitierten Kohlenhydrat-Verfügbarkeit wie zu erwarten ein deutlich verlangsamtes Wachstum. Nach 24 h Inkubation erreichten die Stämme im Medium ohne Glukose weniger als halb so große Keimdichten im Vergleich zum Glukose-supplementierten M9-Ca-Mangelmedium (M9-Glu). Unterschiede zwischen den isogenen Stämmen waren jedoch nicht festzustellen. Bei Zusatz von Fruktose und Ribose war ein schwach signifikant (t-Test, $p \leq 0,05$) schlechteres Wachstum der SL1344 Δ ompW-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Für den komplementierten Stamm zeigten sich ebenfalls schwach signifikante Effekte für Ribose und auch für Glycerin. Dabei war das relative Wachstum im Vergleich zum Wildtyp-Stamm im Glycerin-haltigen Medium verstärkt, im Ribose-haltigen M9-Ca-Mangelmedium gehemmt. Ein hochsignifikant (t-Test, $p \leq 0,001$) verlangsamtes Wachstum des komplementierten Stammes erfolgte unter Zusatz von 0,1 % Naphthalin (in 2 % Ethanol gelöst) und Ethanol (2 %). Der Zusatz von organischen Säuren oder deren Salzen führte nur bei Succinat oder Essigsäure zu Wachstumsunterschieden zwischen den isogenen Salmonellen-Stämmen. Succinat-Zusatz zum M9-Ca-Mangelmedium resultierte in einem hochsignifikanten Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und Knockout-Mutante. Die Knockout-Mutante wies in zwei unabhängigen Versuchen ein um etwa 40 % schlechteres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp auf. Der komplementierte Knockout-Stamm wuchs in einem Wachstumsversuch vergleichbar gut wie der Wildtyp, in einem zweiten Versuch ähnlich schlecht wie die Knockout-Mutante. Nach Zusatz von Essigsäure wuchs die SL1344 Δ ompW-Mutante signifikant (t-Test, $p \leq 0,01$) schlechter als ihr Wildtyp und der komplementierte Stamm. Für das Natrium-Salz der Essigsäure (Natriumazetat) war dieser Effekt jedoch nicht festzustellen (**Abbildung 32**).

Um die gefundenen Effekte beim Zusatz von Essigsäure zu verifizieren, wurden Wachstumskinetiken unter dem Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Essigsäure oder Natriumazetat bestimmt (**Abbildung 33**). Dabei wurde dem M9-Mangelmedium mit Casaminosäuren (M9-Ca) Essigsäure in den Konzentrationen 0,1 % (pH 6,8), 0,2 % (pH 6,5) und 0,4 % (pH 5,6) bzw. Natriumazetat in den Konzentrationen 0,5 %, 1 % und 2 % (jeweils pH 7,2) zugesetzt. Bei Zusatz von Essigsäure war bei den Konzentrationen 0,1 % und 0,2 % kein signifikanter Unterschied zwischen den

Keimdichten von SL1344 und seiner isogenen SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante festzustellen. Tendenzen, die den Beobachtungen aus den Screening-Versuchen entsprachen, ließen sich für den Zusatz von 0,2 % Essigsäure nach 48-stündiger Inkubation erkennen, die Unterschiede waren statistisch jedoch nicht abzusichern. Bei höherer Essigsäure-Konzentration im M9-Ca-Mangelmedium (0,4 %-iger Zusatz) erfolgte kein Wachstum der Salmonellen mehr. Zahlreiche signifikante (t-Test, $p \leq 0,01$) und hoch signifikante (t-Test, $p \leq 0,001$) Unterschiede der Keimdichten ergaben sich für den komplementierten Stamm (**Abbildung 33**). Mit zunehmender Inkubationsdauer erreichte der komplementierte Stamm nach zunächst identischem oder verzögertem Wachstum höhere Keimdichten, während der Stamm SL1344 und seine SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante in die Plateauphase eintraten. Vergleichbare Beobachtungen, dass der komplementierte Stamm die stationäre Wachstumsphase auf höherem Niveau erreichte, wurden bereits im Rahmen der Versuche zur Wachstumskinetik in LB-Medium gemacht.

Die Anzucht der isogenen SL1344-Stämme in Anwesenheit von Natriumazetat erbrachte bei hohen Konzentrationen (2 %-iger Zusatz) und 48-stündiger Inkubation signifikante Unterschiede zwischen den Keimdichten des SL1344-Wildtyp-Stammes und seiner SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante. Für den komplementierten Stamm SL1344 $\Delta ompW$ -C zeigten sich bei 0,5 %-igem Zusatz niedrigere mittlere Keimdichten, bei 2 %-igem Zusatz jedoch höhere Keimdichten (hoch signifikant für alle Inkubationszeiten; t-Test, $p \leq 0,001$) im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen. Natriumazetat, in hohen Konzentrationen (2 %) dem M9-Ca-Mangelmedium zugesetzt, beeinflusst das Wachstum der SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante negativ im Vergleich zum Wildtyp und zum komplementierten Stamm (**Abbildung 33**).

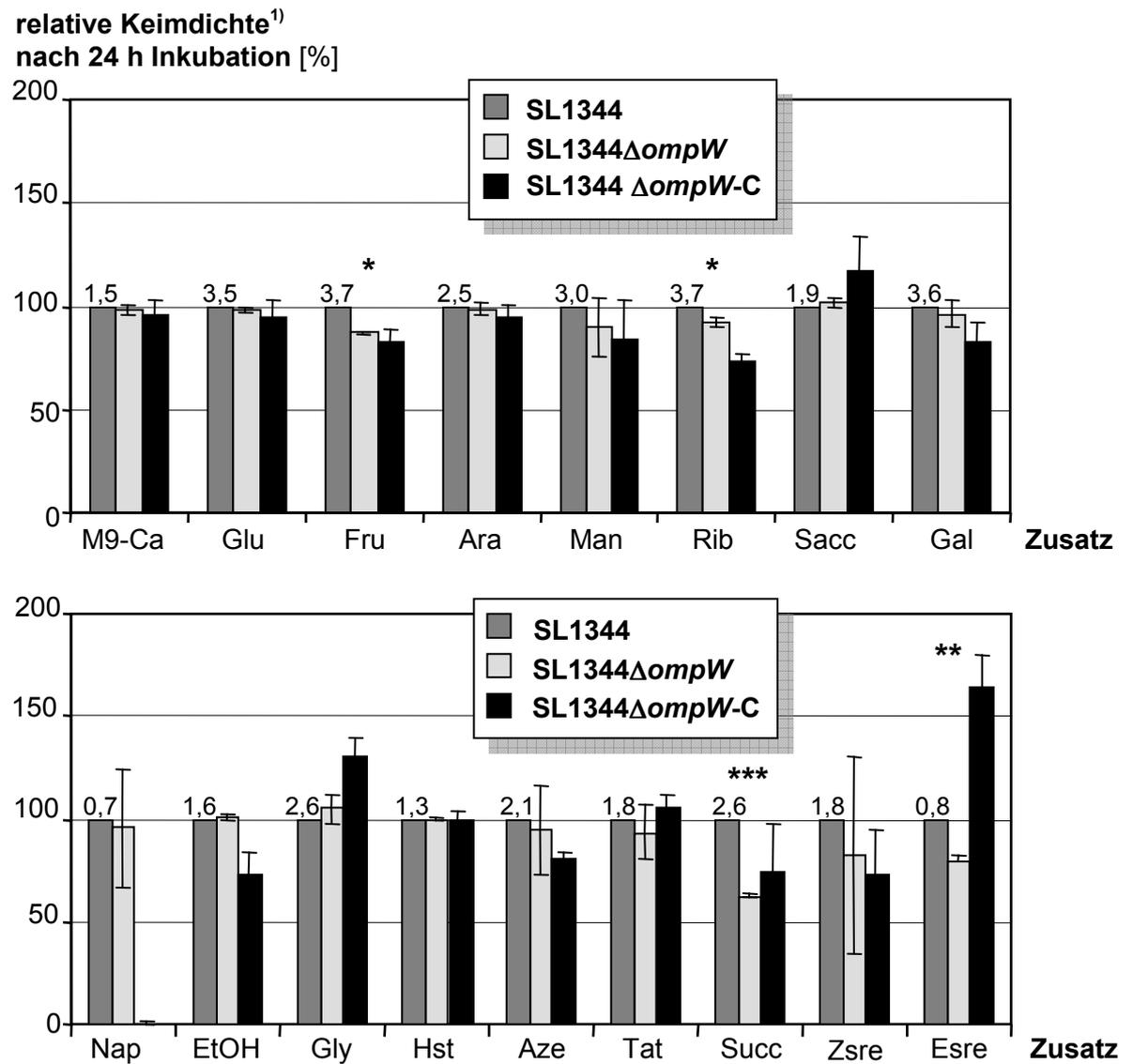


Abbildung 32: Einfluss von verschiedenen Kohlenstoff-Zusätzen auf die Vermehrung der isogenen Varianten des *S. Tm.*-Stammes SL1344 in M9-Ca-Mangelmedium (Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen)

1) relative Keimdichte nach 24 h Inkubation bezogen auf SL1344;
Zahl, absolute Keimdichte ($OD_{600[nm]}$) von SL1344;
M9-Ca, M9-Mangelmedium mit Casaminosäuren;

Eingesetzte Kohlenstoffquellen: **Ara**, Arabinose (0,2 %); **Aze**, Azetat (0,6 %); **Succ**, Succinat (0,6 %); **Esre**, Essigsäure (0,2 %); **EtOH**, Ethanol (2 %); **Fru**, Fruktose (0,2 %); **Gal**, Galaktose (0,2 %); **Glu**, Glukose (0,2 %); **Gly**, Glycerin (0,2 %); **Hst**, Harnstoff; **Man**, Mannose (0,2 %); **Naph**, Naphthalin (0,1 %); **Rib**, Ribose (0,2 %); **Sacch**, Saccharose (0,2 %); **Tat**, Taträt (0,6 %); **Zsre**, Zitronensäure (0,6 %);

Signifikanzen bezogen auf die Unterschiede in den relativen Keimdichten zwischen SL1344 und SL1344ΔompW (t-Test): * schwach signifikant ($p \leq 0,05$); ** signifikant ($p \leq 0,01$); ***, hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

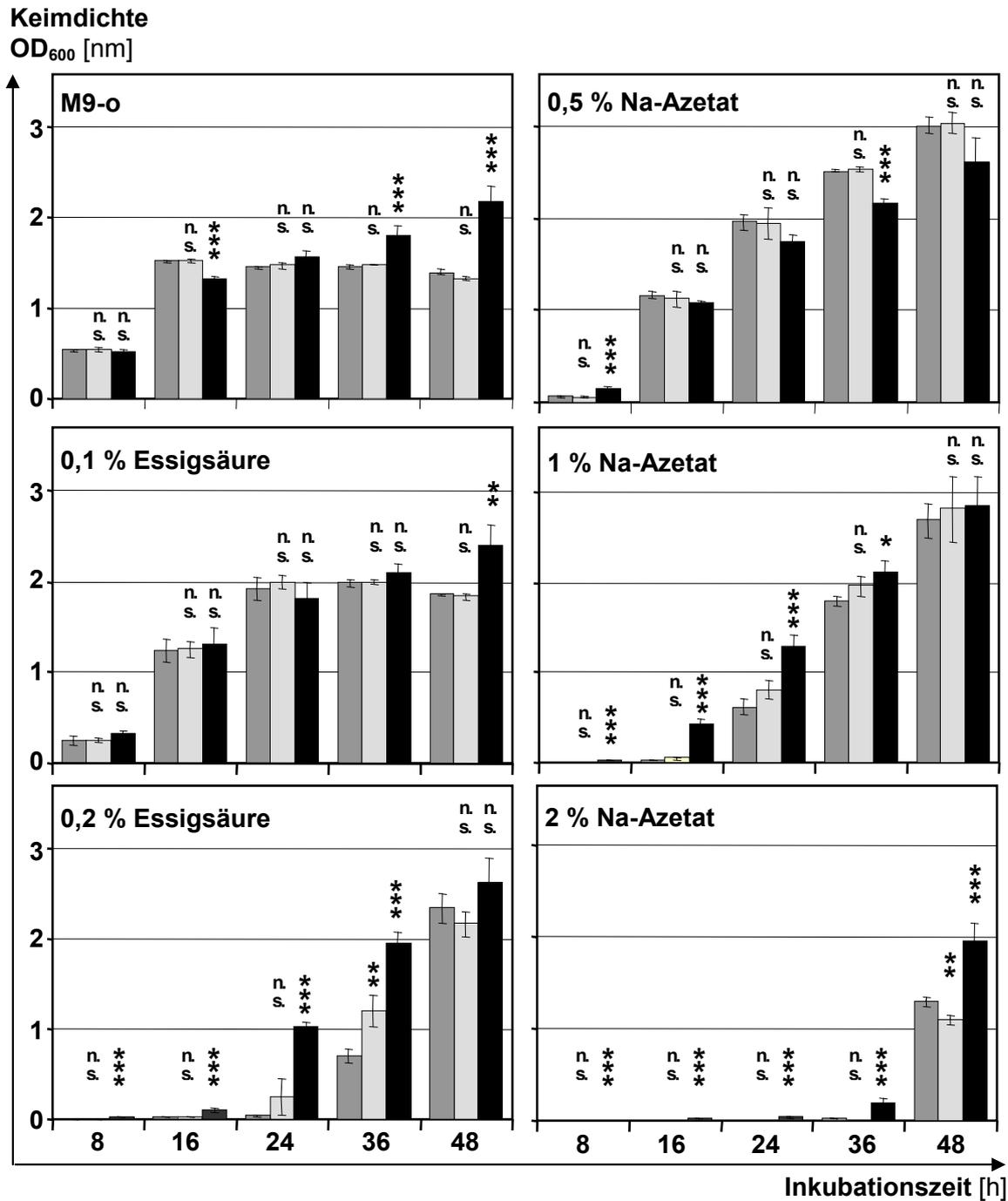


Abbildung 33: Einfluss von verschiedenen Essigsäure- oder Natriumazetat-Konzentrationen auf die Vermehrung der isogenen Varianten des *S. Tm.*-Stammes SL1344 in M9-Ca-Mangelmedium (Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Testansätzen)

■ = SL1344; □ = SL1344ΔompW; ■ = SL1344ΔompW-C;
M9-Ca, M9-Mangelmedium mit Casaminosäuren;

Signifikanzen bezogen auf die Unterschiede in den absoluten Keimdichten von SL1344ΔompW und SL1344ΔompW-C im Vergleich zu SL1344: n. s., nicht signifikant ($p > 0,05$); *, schwach signifikant ($p \leq 0,05$); **, signifikant ($p \leq 0,01$); ***, hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

4.3.2.3 Widerstandsfähigkeit gegen Chemotherapeutika und Detergentien

Widerstandsfähigkeit gegen Chemotherapeutika

Die Chemosensitivitätstests verfolgten im Wesentlichen zwei Ziele: Zum einen sollten mögliche Eigenschaften von OmpW als Porin über ein verändertes Aufnahmeverhalten intrazellulär wirksamer Substanzen untersucht werden, zum anderen sollte überprüft werden, ob das Fehlen von OmpW einen Einfluss auf die Stabilität der äußeren Membran gegenüber zellwandaktiven Chemotherapeutika (wie zum Beispiel Beta-Laktame oder Polypeptidantibiotika) hat (**Tabelle 24** und **Tabelle 25**). Zunächst wurde ein Substanz-Screening durchgeführt, um einen Überblick zu bekommen, ob und bei welchen Substanzen oder sogar Substanzgruppen OmpW möglicherweise die Chemosensitivität der Salmonellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden 26 verschiedene Chemotherapeutika im Agardiffusionstest-Verfahren auf ihre Wirksamkeit gegenüber den Teststämmen untersucht und die Hemmhofdurchmesser miteinander verglichen.

Bei den *S. Marina*-Stämmen erwies sich der OmpW-defiziente Stamm SARC9 in den Agardiffusionstests bezogen auf die vier anderen *S. Marina*-Stämme als hoch signifikant (t-Test, $p \leq 0,001$) empfindlicher gegen Chloramphenicol und Florfenicol, gegen acht von neun Beta-Laktam-Antibiotika (Resistenz aller Stämme gegen Cloxacillin), gegen Clindamycin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim und Enrofloxacin. Ein Einfluss auf die Resistenzprofile bestand aber nur für drei der getesteten Cephalosporine (Ceftiofur, Cefalexin und Cefalothin), denn hier führte die erhöhte Empfindlichkeit zur Einstufung als „sensibel“, während die anderen Stämme des Serovars als „intermediär“ eingestuft wurden. Die bei den *S. Marina*-Stämmen beobachteten Effekte ließen sich bei den isogenen SL1344-Stämmen nur eingeschränkt bestätigen. Die SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante war (wie SARC9) hoch signifikant (t-Test, $p \leq 0,001$) empfindlicher gegen Ceftiofur, jedoch signifikant (t-Test, $p \leq 0,01$) weniger empfindlich gegen die zwei Cephalosporine Cefquinom und Cefalexin, was mit den Ergebnissen für das Serovar *S. Marina* nicht in Einklang steht. Schwach signifikant (t-Test, $p \leq 0,05$) sensibler war die SL1344 $\Delta ompW$ -Mutante gegen Chloramphenicol und Amoxicillin mit Clavulansäure als der SL1344-Wildtyp-Stamm und der komplementierte Stamm SL1344 $\Delta ompW$ -C. Im Serovar *S. Marina* waren hoch signifikante Unterschiede (t-Test, $p \leq 0,001$) für diese zwei Substanzen beobachtet worden. Unterschiede der Hemmhofdurchmesser für Florfenicol, mehrere Beta-Laktame und weitere Substanzen, die bei den Stämmen des Serovars *S. Marina* beobachtet wurden, konnten mittels der isogenen SL1344-Stämme nicht nachvollzogen werden (**Tabelle 24**). Die bei den Stämmen SL1344 $\Delta ompW$ und SL1344 $\Delta ompW$ -C zu beobachtende Kanamycin-Resistenz ist die Folge der im Zuge der Elimination von *ompW* integrierten *kan*-Resistenzkassette.

In einem zweiten Schritt wurden die Chemosensitivitäten der Teststämmen gegenüber Ceftriaxon, Tetrazyklin und Ampicillin einer näheren Untersuchung unterzogen, da aus der Literatur Hinweise vorlagen, dass OmpW bzw. OmpW-homologe Proteine bei diesen drei Substanzen die Chemosensitivität beeinflussen (Kapitel 2.3.6.1). Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Agardiffusionstests auch Mikrobouillon-

dilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) durchgeführt. Ziel der MHK-Bestimmung war die Überprüfung der Ergebnisse aus den Agardiffusionstests sowie eine genauere Quantifizierung der Effekte. Die **Tabelle 25** zeigt die Hemmhofdurchmesser (HD) aus den Agardiffusionstests und die MHK-Werte aus den Mikrobouillondilutionstests für die drei Chemotherapeutika Ceftriaxon, Tetrazyklin und Ampicillin im Vergleich. Für den Stamm SARC9 zeigte sich für alle drei Substanzen eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich zu den anderen Stämmen des Serovars. Die MHK war um etwa zwei bis drei Log₂-Verdünnungsstufen niedriger. Diese Daten stehen im Einklang mit den zuvor ermittelten Hemmhofdurchmessern. Für die SL1344-Stämme konnten keine Unterschiede bezüglich der MHK-Werte ermittelt werden, lediglich im Falle von Ceftriaxon wies die SL1344 Δ *ompW*-Mutante einen um eine Log₂-Verdünnungsstufe kleineren MHK-Wert auf. Die Tetrazyklinresistenz (MHK = 128 μ g/ml) des komplementierten Stammes SL1344 Δ *ompW*-C ist technisch bedingt und auf dem Komplementierungsplasmid (pHIT-VI-46) kodiert. Auch für die SL1344-Stämme entsprechen die MHK-Werte den beobachteten Hemmhofdurchmessern der Agardiffusionstests.

Widerstandsfähigkeit gegen Detergentien

Neben dem Einfluss von *OmpW* auf die Stabilität der äußeren Membran gegenüber membranaktiven Chemotherapeutika wurde die Membranstabilität auch über die Widerstandsfähigkeit gegenüber Detergentien getestet. Dazu wurden zwei Detergentien mit unterschiedlichem Wirkprinzip ausgewählt. Zum einen das nicht-ionische Detergenz Triton X-100, zum anderen das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Widerstandsfähigkeit der Teststämme gegenüber den Detergentien wurde bestimmt über den Vergleich der Wachstumseigenschaften der Salmonellen in LBM unter Standardanzuchtbedingungen und bei verschiedenen Detergenzkonzentrationen. (0,5 %, 1 %, 2 % und 5 %) (**Abbildung 34**).

Die Widerstandsfähigkeit gegen Triton X-100 stellte sich sowohl bei den Stämmen des Serovars *S. Marina* als auch bei den drei isogenen SL1344-Stämmen als sehr einheitlich dar. Zwischen den Stämmen waren bezüglich ihrer relativen Keimdichten unter Einfluss von Triton X-100 (Mittelwerte aus drei Versuchen) keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Für das Detergenz SDS war die Widerstandsfähigkeit der Stämme hingegen sehr heterogen ausgeprägt. Innerhalb des Serovars *S. Marina* erwiesen sich die Stämme P6638/01 und P1056/96 als sehr widerstandsfähig, wogegen die Stämme 3019/01 und 319/02 bereits bei 1%-igem Zusatz von SDS eine Reduktion um mehr als 50 % aufwiesen und damit als sensibel einzustufen waren. Der Stamm SARC9 verhielt sich seiner Widerstandsfähigkeit nach intermediär. Bei den isogenen SL1344-Stämmen waren keine Unterschiede in der Empfindlichkeit gegen die Detergentien festzustellen, lediglich der komplementierte Stamm zeigte bei 5 % SDS-Zusatz eine signifikant erniedrigte Widerstandsfähigkeit (t-Test, $p \leq 0,05$).

Tabelle 24: Hemmhofdurchmesser¹⁾ und Resistenzprofile zur Charakterisierung der Widerstandsfähigkeit von OmpW-positiven und OmpW-defizienten Salmonellen gegen verschiedene Chemotherapeutika

Gruppe	Chemotherapeutikum						S. Marina			S. Typhimurium SL1344		
	Name	Dosis [µg/disc]	SARC9	3019/01	319/02	P6638/01	P1056/96	Wildtyp	ΔompW	ΔompW-C		
Amino- glykoside	Gentamicin	10	19,7	19,7	18,3**	18,0**	18,3**	19,0	18,0	18,7		
	Kanamycin	30	20,3	18,3	18,0**	19,7	18,7**	20,0	n. a.	n. a.		
	Streptomycin	25	15,0	15,0	16,3**	14,7	14,7	7,0	7,0	7,0		
Beta- Laktame	Amoxicillin/Clav.	30	30,0	26,3***	26,7***	25,0***	26,7***	25,0*	26,7	25,7*		
	Ampicillin	10	25,5	20,0***	20,3***	20,3***	22,8***	22,8	22,8	22,3**		
	Ceftiofur	30	25,0	20,0***	18,3***	20,0***	19,0***	20,0**	23,0	23,3		
	Cefquinom	10	25,0	20,0***	19,0***	18,0***	17,7***	25,0**	23,0	21,0**		
	Cefalexin	30	23,7	20,0***	19,0***	19,3***	18,7***	25,0**	23,3	23,3		
	Cefalotin	30	27,3	22,3***	20,0***	19,7***	19,3***	25,0*	24,7	23,7*		
Ceftriaxon	Ceftriaxon	30	29,3	24,0***	22,0***	22,0***	21,3***	28,0	27,8	27,8		
	Cloxacillin	5	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0		
	Penicillin G	10	22,3	15,0***	15,0***	13,7***	14,3***	16,3	17,0	17,0		
Fenicole	Chloramphenicol	30	30,0	25,3***	25,0***	25,0***	26,0***	25,0*	27,6	25,7*		
	Florfenicol	30	29,0	25,0***	24,0***	21,0***	20,7***	25,3	26,3	26,0		
Lincosamide	Clindamycin	10	12,0	7,0***	7,0***	7,0***	7,0***	7,0	7,0	7,0		
	Lincomycin	15	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0		
Polypeptide	Colistin	25	13,3	13,0	13,7	13,7	14,3	13,0	14,0	13,0		
	Polymyxin B	300	13,7	13,0	12,7	13,0	13,0	13,0	12,3	12,3		
Sulfonamide	Sulfamethoxazol/T.	25	30,0	28,7***	28,0***	26,0***	28,7***	21,3	21,7	20,3		
	Triple Sulfa	25	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0		
Tetrazykline	Doxyzyklin	30	23,3	21,0	20,0**	18,3**	19,7**	19,0	19,0	n. a.		
	Tetrazyklin	30	25,0	21,0***	20,8***	21,3***	20,0***	20,8	20,5	n. a.		
Weitere Substanzen	Enrofloxacin	5	30,0	27,3***	25,7***	25,0***	27,0***	25,3	26,0	27,0		
	Erythromycin	15	7,0	7,7*	7,0	8,0*	7,7	7,0	7,0	7,0		
	Fusidinsäure	10	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0		
	Nitrofurantoin	100	20,0	20,3	20,0	20,0	19,7	17,7	18,3	17,3		

Erläuterungen: 1) Mittelwerte aus drei Ansätzen [mm]; **Clav.**, Clavulansäure; **T.**, Trimethoprim; , sensibel; , intermediär; , resistent; [n. a.], nicht auswertbar, gentechnisch bedingte Resistenz; Signifikanz bezogen auf den ompW-defizienten Stamm des selben Serovars (t-Test): ***, hoch signifikant ($p \leq 0,001$); **, signifikant ($p \leq 0,01$); *, schwach signifikant ($p \leq 0,05$).

Tabelle 25: Widerstandsfähigkeit von OmpW-positiven und OmpW-defizienten Salmonellen gegen die Chemotherapeutika Ceftriaxon, Tetrazyklin und Ampicillin

Bakterien-Stamm	Ceftriaxon			Tetrazyklin			Ampicillin		
	Hemmhofdurchmesser [mm] ¹⁾		MHK [µg/ml] ²⁾	Hemmhofdurchmesser [mm] ¹⁾		MHK [µg/ml] ²⁾	Hemmhofdurchmesser [mm] ¹⁾		MHK [µg/ml] ²⁾
	MW	SD		MW	SD		MW	SD	
S. Marina 3019/01	24,0	0	0,13	21,0	0,8	1	20,0	0	1
S. Marina 319/02	22,0	0	0,13	20,8	0,5	1	20,3	0,5	1
S. Marina P6638/01	22,0	0,8	0,13	21,3	0,5	1	20,3	0,5	1
S. Marina P1056/56	21,3	1,0	0,13	20,0	0	2	20,0	0	1
S. Marina SARC9	29,3	0,5	0,03	25,0	0	0,25	25,5	0,6	0,13
S. Tm. SL1344	28,0	0,8	0,13	20,8	0,5	2	22,8	0,5	1
S. Tm. SL1344ΔompW	27,8	0,5	0,06	20,5	0,6	2	22,8	0,5	1
S. Tm. SL1344ΔompW-C	27,8	0,5	0,13	9,0 ³⁾	0	128 ³⁾	22,3	0,5	1

Erläuterungen: 1) **Agardiffusionstest**, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) aus vier Ansätzen;
 2) **Mikrobouillon-dilutionstest**, Mittelwerte der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) aus drei Ansätzen;
 3) gentechnisch bedingte Tetrazyklin-Resistenz durch das Komplementierungsplasmid pHIT-VI-46.
grau hinterlegt, OmpW-defiziente Stämme.

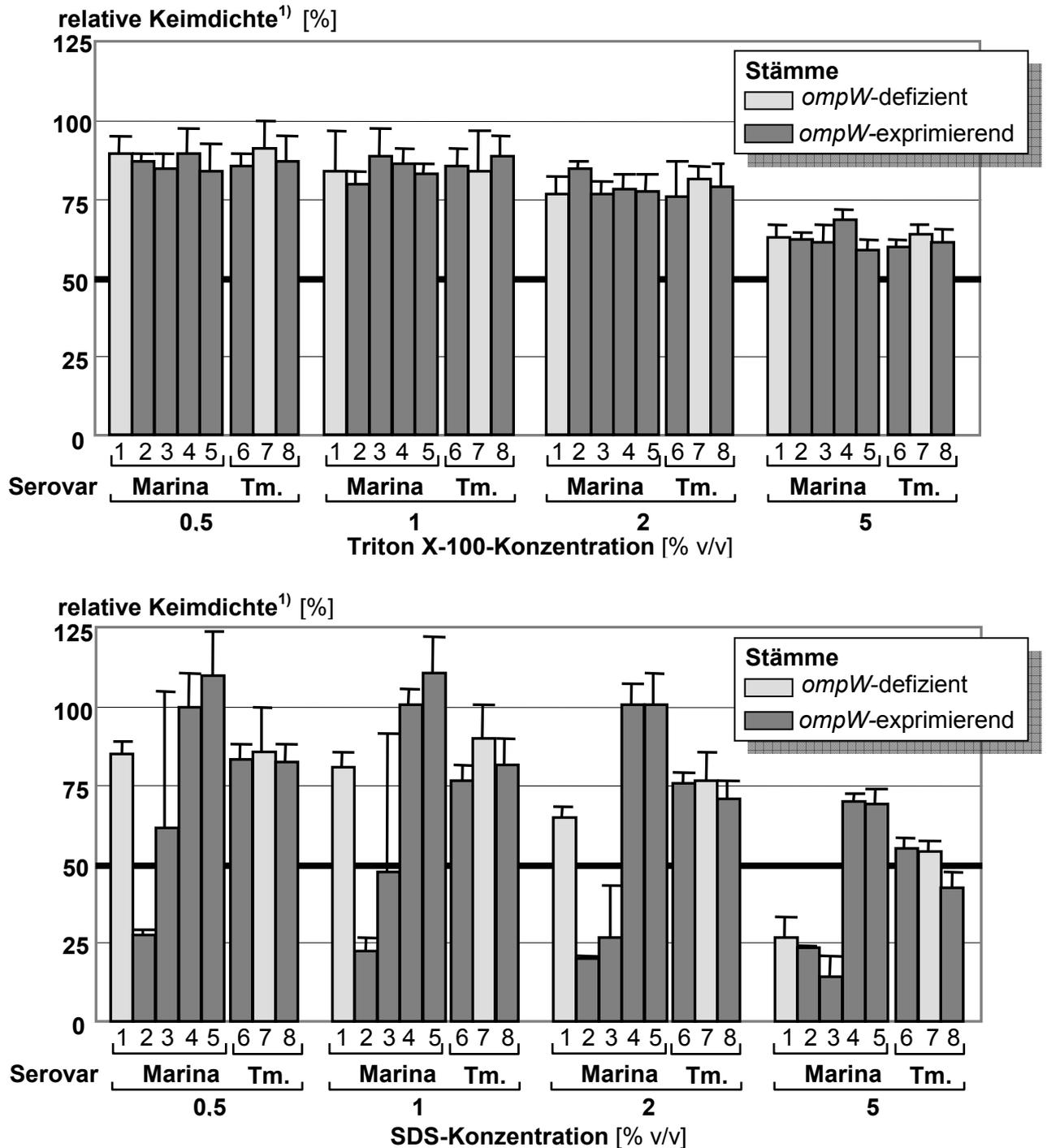


Abbildung 34: Vermehrung *OmpW*-positiver und *OmpW*-defizienter *Salmonellen* in Anwesenheit von dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 und dem anionischen Detergenz SDS (Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Testansätzen.)

1) bezogen auf das Wachstum in LBM (= 100 %)

1, *S. Marina* SARC9;

2, *S. Marina* 3019/01;

3, *S. Marina* 319/02;

4, *S. Marina* P6638/01;

5, *S. Marina* P1056/96;

6, *S. Tm.* SL1344;

7, *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*;

8: *S. Tm.* SL1344 Δ *ompW*-C.

4.3.2.4 Invasionsfähigkeit und intrazelluläres Überleben von Salmonellen

Insbesondere Studien zu OmpW bei *Vibrio* spp. führten zu der Annahme, dass es sich bei OmpW um einen Virulenzfaktor handeln könnte oder dieses Protein zumindest an der Ausprägung von Virulenzmerkmalen beteiligt ist. Inwieweit das Fehlen von OmpW einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit in humane LoVo-Epithelzellen bzw. auf die Fähigkeit des intrazellulären Überlebens innerhalb von murinen Makrophagen der Zellkulturlinie J774A.1 hat, sollte mittels Gentamicin-Protektionsassay ermittelt werden.

Die Zugabe von Gentamicin zum Zellkulturmedium führte zu einer Abtötung von extrazellulär lokalisierten Salmonellen, nicht aber von Salmonellen, die in die Wirtszelle eingedrungen waren. Eine Quantifizierung der Salmonellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 4 h und 24 h) ermöglichte Aussagen über die Invasionsfähigkeit und die Vermehrungsfähigkeit in den Wirtszellen. Die frühe Phase der Invasion wurde durch die Keimzahlbestimmung nach einer Stunde untersucht und ist ein geeigneter Parameter zur Erfassung der Adhäsionsfähigkeit des Erregers. Die Quantifizierung der Salmonellen nach 4 h und 24 h diente der Messung von intrazellulär in den Wirtszellen überlebenden Salmonellen. Als Maß für die Invasionsfähigkeit und das intrazelluläre Überleben diente der Anteil der intrazellulär nachweisbaren, lebenden Salmonellen, bezogen auf die für die Infektion der Zellkultur verwendete Anzahl von Bakterien.

Insgesamt war festzustellen, dass eine Stunde nach Infektion etwa doppelt so viele lebende Salmonellen in den Makrophagen nachweisbar waren wie in den Epithelzellen. Auch vier Stunden nach Infektion waren noch deutlich mehr lebende Salmonellen in den Makrophagen im Vergleich zu den Epithelzellen messbar. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellkulturen hatten sich die Salmonellen in den Epithelzellen allerdings auf etwa 900 % der für die Inokulation verwendete Anzahl an Salmonellen vermehrt, wohingegen sich die Zahl an Salmonellen in den Makrophagen im gleichen Zeitraum lediglich verdoppelte. Weder in den humanen Lovo-Epithelzellen noch in den murinen Makrophagen der Zellkulturlinie J774A.1 waren signifikante Unterschiede in der Vermehrung von SL1344 und der SL1344 Δ ompW-Mutante festzustellen (**Abbildung 35**).

Relative Anzahl¹⁾ intrazellulärer Salmonellen

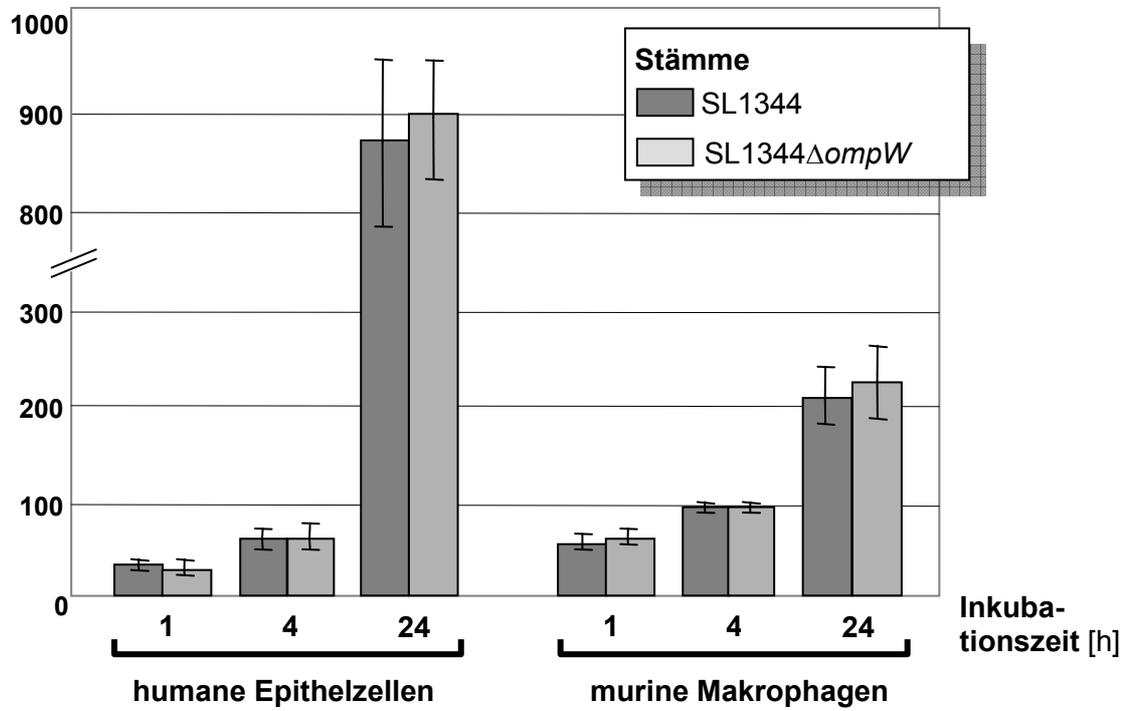


Abbildung 35: Invasionsfähigkeit bzw. Fähigkeit zum intrazellulärem Überleben von OmpW-defizienten und -exprimierenden Salmonellen (Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei Gentamicin-Protektionsassays mit humanen LoVo-Epithelzellen und murinen Makrophagen der Zellkulturlinie J774A.1)

1) Anteil intrazellulärer, vermehrungsfähiger Salmonellen bezogen auf die zur Infektion verwendete Anzahl an Salmonellen.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das äußere-Membran-Protein OmpW von *Salmonella enterica* untersucht. Vor dem Hintergrund einer Nutzung als mögliches Zielmolekül für die Entwicklung neuer Diagnostika, Therapeutika oder Impfstoffe erfolgten erstmals systematische Untersuchungen über die Verbreitung von OmpW bei Salmonellen und zur biologischen Funktion von OmpW für die „Fitness“ von *Salmonella* sp. unter verschiedenen Milieubedingungen.

Herstellung OmpW-spezifischer Antiseren

Zur Herstellung eines OmpW-spezifischen Hyperimmunserums, welches für den Nachweis der OmpW-Expression in Salmonellen dienen sollte, musste zunächst hochreines OmpW in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Da zu erwarten war, dass nur relativ geringe Mengen von OmpW aus Membran-Präparationen von Salmonellen-Kulturen zu gewinnen sind (Alpermann, 2000; Bauerfeind, 1999; Sampathkumar *et al.*, 2004) und die Aufreinigung und Konzentrierung von OmpW deshalb recht aufwendig sind, wurde der Weg der rekombinanten OmpW-Expression eingeschlagen. Die Klonierung des *ompW*-Gens erfolgte in den Plasmidvektor pET-24b(+), da der T7/*lac*-Promotor in Kombination mit dem *lac*-Repressor eine stringente Transkriptionskontrolle gewährleistete und so eine mögliche negative Beeinflussung der *E. coli* K12-Wirtszelle durch eine ungewollte Basalexpression effektiv verhinderte. Ein weiterer Vorteil dieses Vektors war, dass das rekombinante OmpW an seinem C-Terminus mit einem Histidin-Marker fusioniert wurde. Der Histidin-Marker ermöglichte die Isolierung und die hochreine Darstellung des Proteins aus dem Bakterienzellysat. Um für zukünftige Untersuchungen zu den in dieser Arbeit nicht näher charakterisierten Genprodukten der *ompW*-flankierenden Leserahmen *katN* und *stm1733* ebenfalls geeignete Antiseren zur Verfügung zu haben, wurde eine analoge Strategie zur Klonierung und Expression dieser Gene verfolgt.

Die Kontrolluntersuchungen zeigten, dass die eingeschlagene Klonierungs- und Expressionsstrategie sehr erfolgreich war, denn es konnten für OmpW, Stm1733 und KatN jeweils rekombinante *E. coli*-Transformanten etabliert werden, die keine Basalexpression der Zielproteine aufwiesen und nach Induktion durch IPTG ein entsprechendes Histidin-markiertes Fusionsprotein in großen Mengen bildeten. Der Leserahmen *stm1733* wurde nach aktuellem Kenntnisstand der Literatur erstmals kloniert und rekombinant exprimiert. Die Identität der Genprodukte wurde durch eine Sequenzanalyse der inserierten Gensequenzen, den Nachweis des C-terminalen Histidin-Markers im Western-Blot und die molekulare Masse der Expressionsprodukte in der SDS-PAGE für alle drei rekombinanten Fusionsproteine bestätigt. Durchschnittliche Proteinausbeuten von 4,9 mg für rStm1733-His und 7,2 mg für rOmpW-His sind vergleichbar mit den Resultaten von anderen Studien, in denen ebenfalls rekombinant in *E. coli* exprimierte Histidin-markierte Fusionsproteine von Salmonellen erzeugt und

Proteinausbeuten von 6-10 mg Protein/Liter Bakterienkultur erzielt wurden (Barth, 2003; Bauerfeind, 1999; Sinclair *et al.*, 1998). Abweichend davon ist die Ausbeute von 48,0 mg für rKatN-His als sehr hoch einzustufen und auf die starke Expression von rKatN durch den *E. coli*-Stamm zurückzuführen. Die Induktion des OmpW-exprimierenden *E. coli*-Klons führte mit zunehmender IPTG-Konzentration zu einer zweiten um etwa 1-2 kDa größeren Bande, bei der im Western-Blot ebenfalls der C-terminale Histidin-Marker nachgewiesen werden konnte. Eine sogenannte „Doppelbande“ wurde auch bei dem heterolog in *E. coli* exprimiertem rOmp21-His von *Comamonas acidovorans* beobachtet (Baldermann & Engelhardt, 2000). Bei *C. acidovorans* wiesen beide Banden (21 kDa und 24 kDa) ebenfalls den C-terminalen Histidin-Marker auf und konnten darüber hinaus über Aminosäure-Sequenzierung als Omp21 bestätigt werden. Baldermann (2000) führt die Doppelbande auf das Phänomen der HitzeModifizierbarkeit zurück, einer typischen Eigenschaft von „langsamen“ Porinen. Die größere Bande stellt hierbei die vollständig denaturierte Form des OmpW-Proteins mit reduzierter Motilität dar, während die kleinere Bande die gefaltete bzw. unvollständig denaturierte Protein-Variante repräsentiert (Nikaido, 2003). Das mit zunehmender IPTG-Konzentration deutlichere Auftreten der größeren Bande würde demnach bedeuten, dass eine korrekte Faltung von OmpW bei dessen Überexpression nur noch eingeschränkt möglich ist. Dies kann eine Folge der Überexpression und einer daraus resultierenden Überlastung von Faltungsmechanismen im heterologen *E. coli*-Expressionssystem sein. Im Umkehrschluss könnte diese Beobachtung bedeuten, dass OmpW sogar unter denaturierenden Bedingungen sehr stabil ist und ein Teil des heterolog exprimierten OmpW in gefalteter Form vorliegt. Eine weitere Erklärung für das Auftreten einer zweiten, um ca. 1-2 kDa größeren Bande wäre eine unvollständige Abspaltung des Signalpeptids. Das nicht-mature Protein mit dem 21 Aminosäuren langen Signalpeptid ist etwa 1 kDa größer als das mature OmpW und könnte demnach die Ursache der IPTG-abhängigen Doppelbande sein. Möglicherweise bringt es die Überexpression mit sich, dass das rekombinante OmpW in unlöslicher Form präzipitiert, sich in zytoplasmatischen Einschlusskörperchen anreichert und so der Abspaltung seines Signalpeptids entgeht.

Die drei affinitätschromatographisch hoch aufgereinigten und dialysierten Fusionsproteine rStm1733-His, rOmpW-His und rKatN-His waren im Immunisierungsversuch am Kaninchen in der Lage, nach mehrmaliger subkutaner Applikation eine spezifische Antikörperbildung zu stimulieren. Das mit rOmpW-His erzeugte Hyperimmunserum wurde im Immuno-Blot auf seine Spezifität überprüft. Die Untersuchung ergab, dass es einen hohen Anteil an OmpW-spezifischen Immunglobulinen enthielt. Allerdings wies die Impfantigencharge von rOmpW-His im Immuno-Blot neben der dominanten Doppelbande von ca. 23 kDa eine weitere schwache Nebenbande bei etwa 32 kDa auf. Die Bande trat jedoch in den getesteten *E. coli* und *Salmonella*-Ganzzelllysaten nicht auf. Das Serum detektierte hier demnach eine Komponente, die bei der Affinitätschromatographie mit aufgereinigt wurde und entweder unter Kulturbedingungen nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wurde oder nur sehr schwach mit dem Serum reagierte. Aufgrund der im Immuno-Blot eingesetzten Protein-Menge von ca. 2 µg konnte diese

Substanz detektiert werden, während seine Menge in den getesteten Kulturlysaten für die Detektion nicht ausreichte. Eine weitere schwache Bande wurde bei allen getesteten Stämmen bei etwa 25 kDa detektiert, unabhängig davon, ob der Stamm *ompW*-positiv war oder nicht. Dies spricht dafür, dass dieses Signal nicht im Zusammenhang mit OmpW steht und es sich um ein anderes *E. coli*-Produkt handelte, das mit dem Serum kreuzreagierte. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass das OmpW-spezifische Serum R-1258/00, das mit OmpW aus *S. Typhimurium* hergestellt wurde, diese Bande nicht erkannte. Die Ausbildung von OmpW-Dimeren, wie Baldermann und Engelhardt (2000) sie für das OmpW-homologe Protein Omp21 von *Comamonas* sp. in der denaturierenden SDS-PAGE beobachteten, konnte für OmpW von *Salmonella* und *E. coli* nicht festgestellt werden. Auch bei OmpW von *V. cholerae* konnte keine Dimerbildung nachgewiesen werden (Nandi *et al.*, 2005).

Ein schwaches Signal im Immuno-Blot, das bei allen *E. coli*-Lysaten auftauchte und etwa die gleiche Größe wie rOmpW-His (ca. 22 kDa) besaß, stellte wahrscheinlich das natürliche OmpW-Protein des *E. coli*-Wirtsstammes BLR(DE3) dar. OmpW von *E. coli* und *S. Tm.* sind gleichgroß (212 Aminosäuren) und unterscheiden sich lediglich geringfügig in ihrer Aminosäure-Sequenz und ihrem isoelektrischen Punkt. Die SDS-Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, so dass lediglich eine Auftrennung nach der Molekülgröße zu erwarten war (Lottspeich, 1998). Das natürliche OmpW von *E. coli* sollte 13 Aminosäuren (1,52 kDa) kleiner sein als das Histidin-fusionierte rOmpW von *S. Tm.* Die fragliche Bande stellte sich im Immuno-Blot jedoch nicht kleiner, sondern etwas größer als das rOmpW-His dar (ca. 1-2 kDa). Die korrekte Nukleotid-Sequenz und der Nachweis des C-terminalen His-Tags im rekombinanten Translationsprodukt schlossen die Expression eines trunkierten rOmpW-His als Erklärung für die Größenunterschiede in den Proteinbanden aus. Entweder (a) handelte es sich bei dem 22 kDa-Produkt um ein anderes Protein ähnlicher Größe, das Kreuzreaktivität mit dem Hyperimmunserum zeigte oder (b) das OmpW von *E. coli* und das OmpW von *S. Tm.* laufen in der SDS-PAGE unterschiedlich oder (c) Faktoren, wie die hohe Menge an Protein oder der Histidin-Marker mit dem Linkerpeptid verbesserten die Laufeigenschaften von rOmpW-His im SDS-Gel. Für eine Kreuzreaktion mit einem Protein ähnlicher Größe gibt es keine Hinweise. Eine Klärung der Identität dieses Proteins der *E. coli*-Stämme könnte nach Exzision und Elution der Bande mittels Aminosäure-Sequenzierung erfolgen. Des Weiteren ergab die Immuno-Blot-Analyse, dass die elektrophoretischen Mobilitäten der natürlichen OmpW-Moleküle von *E. coli* und *S. enterica* gleich groß waren. Es ist daher unwahrscheinlich, dass punktuelle Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen und eine daraus resultierende veränderte Hitze-Modifizierbarkeit für die Unterschiede im Laufverhalten als Erklärung in Frage kommen. Die Ursache der beobachteten Größendiskrepanz zwischen OmpW und dem heterolog in *E. coli* exprimierten rOmpW-His bleibt daher unklar.

Vorkommen und Verbreitung von OmpW

Über Vorkommen und Verbreitung von OmpW bei Salmonellen lagen bislang keine Untersuchungen vor. Die vorliegende Arbeit sollte daher eine Datengrundlage über das

geno- und phänotypische Vorkommen von OmpW im Genus *Salmonella* und bei anderen Bakteriengenera liefern.

Es zeigte sich, dass das *ompW*-Gen bei beiden Salmonellen-Spezies, bei allen Subspezies und bei allen untersuchten Serovaren vorkommt. Das Fehlen von *ompW* bei dem Stamm *S. Marina* SARC9 beruhte offensichtlich auf einer „spontanen“ Deletion, also einem zufälligen Ereignis, denn vier weitere Stämme desselben Serovars besaßen das *ompW*-Gen. Der Stamm SARC9 ist nach derzeitigem Wissensstand die einzige bisher beschriebene natürliche *ompW*-Deletionsmutante. Repräsentative Daten zur Verbreitung von *ompW* liegen lediglich von der Bakterienspezies *Vibrio cholerae* vor. Das *ompW*-Gen ist in dieser Spezies ebenfalls hoch konserviert und wird als diagnostischer Marker in PCR- und Mikroarray-Analysen eingesetzt (Nandi *et al.*, 2000; Sharma & Chaturvedi, 2006; Singh *et al.*, 2002; Singh, 2003; Tamrakar *et al.*, 2006; Vora *et al.*, 2005). Deletionen von *ompW* bei *Vibrio cholerae* wurden bislang nicht beschrieben. Dies passt zu der Beobachtung, dass Deletionen von Poringenen selten anzutreffen sind, da Porine häufig essentielle Funktionen innehaben und ihr Fehlen für die Vitalität der Bakterien von Nachteil ist. Aus diesem Grund sind Gene für Porine wie z. B. *ompC* oder *ompD* geeignete Erkennungsmerkmale bei diagnostischen Anwendungen (Adriaensen *et al.*, 2007; Amavisit *et al.*, 2001; Selke *et al.*, 2007). Neben *ompW* waren auch die *ompW*-flankierenden Leserahmen *stm1733* und *katN* bei allen getesteten Salmonellen-Stämmen vorhanden. Mit Hilfe der durchgeführten Lokalisations-PCRs, bei denen jeweils ein Forward-Primer aus einer genspezifischen PCR mit dem Reverse-Primer aus einer zweiten genspezifischen PCR kombiniert wurden, wurde offensichtlich, dass Lokalisation und Orientierung der Gene *stm1733*, *ompW* und *katN* im Genom bei allen *Salmonella enterica*-Stämmen konserviert sind. Southern-Blot-Analysen von *Asel*-Fragmenten der Salmonellen-Genome mit der *ompW*-spezifischen Gensonde bestätigten dieses Ergebnis. So reagierten bei allen getesteten *S. enterica*-Stämmen einheitliche Fragmente von etwa 1.200 bp positiv für *ompW*. Bei den zehn getesteten *S. bongori*-Stämmen lagen dagegen zwei Fragmente von ca. 600 bp und 3.000 bp vor. Die Lokalisations-PCRs konnten jedoch zeigen, dass *ompW* trotz des abweichenden *Asel*-Restriktionsmusters auch bei den *S. bongori*-Stämmen zwischen *stm1733* und *katN* lokalisiert war.

Der Nachweis der OmpW-Expression konnte im Immuno-Blot mit dem generierten Hyperimmunserum für alle genetisch positiven *Salmonella*-Stämme erbracht werden. Interessanterweise variierten die Immuno-Blot-Signale in ihrer Intensität von Stamm zu Stamm um etwa den Faktor 10, obwohl die hierzu eingesetzten Übernachtskulturen in LB-Medium über ihre Keimdichte standardisiert worden waren. Mögliche Erklärungen hierfür könnten Unterschiede in der OmpW-Expression, in der Zugänglichkeit der Epitope für das Serum oder in der Antigenität aufgrund von Strukturunterschieden zwischen den Stämmen sein. Letztere Erklärungsmöglichkeit scheint aufgrund bisher bekannter OmpW-Sequenzen auszuschließen, da die Aminosäure-Sequenzen von OmpW zwischen verschiedenen Serovaren nur eine geringe Variabilität aufweisen. So stimmten die OmpW-Aminosäure-Sequenzen von drei *S. Tm.*-Stämmen vollständig überein, ihre Signalstärke im Immuno-Blot schwankte jedoch erheblich (etwa um den

Faktor 3,5). Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Signalstärken im Immuno-Blot könnten Konformationsänderungen sein, die mit einer veränderten Zugänglichkeit der detektierbaren Epitope einhergehen. Aufgrund der mutmaßlich monomeren Konformation und der niedrigen Kanalaktivität besitzt OmpW gewisse Merkmale von „langsamen“ Porinen. „Langsame Porine“ sind in der Lage, zwei verschiedene Konformere zu bilden, die eine sehr unterschiedliche Antigenität aufweisen. Für OmpA und OprF ist bekannt, dass ihre immundominanten Epitope in der C-terminalen Domäne lokalisiert sind (Arora *et al.*, 2000; Brinkman *et al.*, 2000; El Hamel *et al.*, 2000). Die Zugänglichkeit von Epitopen der C-terminalen Hälfte des Proteins ist aber auf das „Minority“-Konformer beschränkt, so dass eine deutlich schlechtere Antigenität zu beobachten ist als für die N-terminale Hälfte des Proteins, die in beiden Konformeren für Antikörper zugänglich ist (Wong *et al.*, 1995). Die beobachtete unterschiedliche Antigenität für OmpW innerhalb eines Serovars ist über konformationelle Änderungen gut zu erklären. Bislang gibt es allerdings keine stichhaltigen Beweise für verschiedene Konformere von OmpW. Die plausibelste Erklärung für die unterschiedliche Signalstärke im Immuno-Blot wäre daher ein unterschiedliches Expressionsniveau von OmpW. Die sehr komplexe Regulation von OmpW-homologen Proteinen anderer Bakterien-Genera konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden. Insbesondere die Regulation von OmpW durch übergeordnete Zweikomponentensysteme wie BaeRS bei *Salmonella* und ToxRS bei *Vibrio* zeigen, dass die OmpW-Expression in Abhängigkeit vom Umgebungsmilieu sehr komplex reguliert wird (Bina *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005). Zu dieser Feststellung passt die Beobachtung, dass auch bei *Vibrio cholerae* das Phänomen einer stark unterschiedlichen Seroreaktivität gegen OmpW-spezifische Seren auftrat und ebenfalls auf Expressionsunterschiede zurückgeführt wurde. Insbesondere *Vibrio cholerae* O1-Stämme exprimierten nur wenig OmpW und reagierten mit OmpW-spezifischen Antiseren nur schwach (Manning *et al.*, 1985; Nandi *et al.*, 2005; Sengupta *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung dafür, dass insbesondere das O1-Serovar von *Vibrio cholerae* eine schwache OmpW-Expression aufwies, geben die Autoren nicht. Ein Zusammenhang zwischen Serovar-Zugehörigkeit und Reaktivität mit dem OmpW-spezifischen Serum konnte für *Salmonella* spp. nicht festgestellt werden.

Während das *ompW*-Gen innerhalb des Genus *Salmonella* aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als weit verbreitet und der Genort *stm1733-ompW-katN* als konserviert anzusehen ist, besaßen die getesteten *E. coli*-Stämme lediglich das *ompW*-Gen und in keinem Fall die Gene *stm1733* oder *katN*. Die Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung spiegelten bei *E. coli* darüber hinaus eine hohe Variabilität des *yciD*- (*ompW*)-Genlokus wider. Die *ompW*-Sonde erkannte bei den O111-Stämmen und dem O157:H7-Stamm ein Restriktionsfragment von etwa 6.100 bp. Bei dem getesteten *E. coli* O157:H7-Stamm konnte darüber hinaus in der *ompW*-spezifischen PCR eine Doppelbande beobachtet werden, was auf das Vorhandensein von zwei *ompW*-Genen mit unterschiedlicher Größe hindeuten könnte. Allerdings lieferte die Southern-Blot-Hybridisierung keinen Hinweis auf zwei Gene, denn die *ompW*-Sonde detektierte nur ein Restriktionsfragment. Ursache für die heterogenen *ompW*-Hybridisierungsergeb-

nisse bei *E. coli* ist vermutlich eine von Bakteriophagen besonders bevorzugte Integrationsstelle unmittelbar stromabwärts von *yciD*. In diesem Bereich finden sich bei STEC-Stämmen mehrere Kilobasen große Insertionen, die unter anderem für Virulenzfaktoren kodieren und möglicherweise auf die Entstehung einer neuen Pathogenitätsinsel hindeuten (Batisson *et al.*, 2003).

Neben den *E. coli*-Stämmen konnte ein *ompW*-Nachweis mittels PCR nur für *Shigella* erbracht werden. Trotz negativer Ergebnisse in der PCR wurden *ompW*-homologe Sequenzen bei den phylogenetisch enger verwandten Genera *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Serratia* mittels DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesen. Ein Nachweis gelang darüber hinaus für *Clostridium sporogenes* NCTC532. Mit Ausnahme von *Clostridium sporogenes* sind für diese Genera in der Literatur bereits OmpW-Homologa beschrieben, Gensequenzen lagen jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht vor. Bei *Serratia proteamaculans* ist seit November 2006 eine Gensequenz (#NZ_AAUN01000025) eines 672 bp großen *ompW*-Homologs bekannt, die das Hybridisierungsergebnis bestätigt (**Tabelle 3**). Der enge Zusammenhang zwischen der 16S-rRNS-Phylogenie und der Detektierbarkeit der *ompW*-Sequenzen mit der Gensequenz weisen darauf hin, dass es sich bei *ompW* um ein phylogenetisch recht altes Gen der Gram-negativen Bakterien handelt. Die Existenz von OmpW-homologen Proteinen bei Vertretern aus insgesamt 70 Genera innerhalb der Gram-negativen Bakterien ist andererseits ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Vorhandensein von OmpW von biologischer Relevanz sein muss. Interessant ist in diesem Zusammenhang das schwach positive Hybridisierungsergebnis des *Clostridium sporogenes* Stammes NCTC532, da aufgrund der großen phylogenetischen Distanz ein *ompW*-homologes Gen nicht zu erwarten war. Eine Kontamination der verwendeten *Clostridium sporogenes*-DNS zum Beispiel mit *E. coli*-DNS konnte durch die Verwendung einer Reinkultur von *Clostridium sporogenes* und durch das negative Ergebnis der *ompW*-spezifischen PCR ausgeschlossen werden. Diskrepanzen zwischen der 16S-rRNS-Phylogenie und dem Vorhandensein von OmpW könnten aber die Folge von horizontalen Gentransfers zwischen distinkten Bakterien-Genera oder -Spezies sein (Jackson & Dugas, 2003). Möglicherweise hat der *Clostridium sporogenes* Stamm NCTC532 ein *ompW*-homologes Gen durch horizontalen Gentransfer von einem Gram-negativen Bakterium erhalten. Horizontaler Gentransfer ist ein bedeutender Mechanismus für die Evolution von Eubakterien und kann über Bakteriophagen, konjugative Plasmide oder mobile Elemente wie Transposons oder Integrons erfolgen (de la Cruz & Davies, 2000; Gogarten *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000). Der horizontale Gentransfer zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ist für zahlreiche Genera beschrieben und erfolgt wahrscheinlich primär über mobile Elemente und Konjugation (Bolotin *et al.*, 2004; Doucet-Populaire *et al.*, 1991; Trieu-Cuot *et al.*, 1985; Trieu-Cuot & Courvalin, 1986). Horizontaler Gentransfer durch Konjugation zwischen *E. coli* und *Clostridium* sp. ist ebenfalls experimentell bestätigt (Kennedy *et al.*, 2005). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise für den horizontalen Gentransfer zwischen *E. coli* bzw. *Salmonella* sp. und *Clostridium* sp. *in vivo* (Hoyer *et al.*, 1992; Stabler *et al.*, 2006). OmpW-homologe Genprodukte sind bei *Clostridium* spp.

derzeit jedoch nicht bekannt. Der Nutzen eines *ompW*-Gens für *C. sporogenes* scheint zumindest fraglich vor dem Hintergrund, dass es sich bei OmpW um eine porinartige Struktur handelt und Porine bei Gram-positiven Bakterien wegen des Fehlens einer äußeren Membran nicht auftreten. Aufgrund dieser Überlegungen erscheint es am wahrscheinlichsten, dass es sich um eine unspezifische Bindung der Sonde an ein Gen mit ähnlichen Sequenzmotiven handelt. Eine DNS-Sequenzierung des detektierten Gen-Fragmentes könnte hier Aufschluss geben.

Charakterisierung OmpW-exprimierender und OmpW-defizienter Stämme

Die Untersuchungen zur Verbreitung von OmpW bei Salmonellen führten zu der Entdeckung der natürlichen *ompW*-Deletionsmutante *S. Marina* Stamm SARC9. Aufgrund der 614 bp großen Deletion besteht das trunkierte OmpW von SARC9 theoretisch aus nur 32 unveränderten Aminosäuren, so dass mutmaßlich nur eine von acht Transmembrandomänen erhalten bleibt. Die Ausbildung eines Beta-Faltblatt-Fasses und die Expression eines funktionellen OmpW sind folglich nicht möglich. Dementsprechend gelang der OmpW-Nachweis mittels Immuno-Blot-Analyse bei diesem Salmonellenstamm nicht. Die vier anderen untersuchten *S. Marina*-Stämme hingegen exprimierten OmpW *in vitro* auf hohem Niveau (Faktor 2,6-4,2 höhere Expression als *S. Tm.* SL1344). Vor diesem Hintergrund erschien der phänotypische Vergleich der OmpW-exprimierenden *S. Marina*-Stämme mit dem OmpW-defizienten Stamm SARC9 als geeignetes Konzept, um nach der Funktion von OmpW zu suchen. Allerdings darf nicht außer acht gelassen werden, dass SARC9 aufgrund der identifizierten Deletion die Non-Haem-Katalase KatN ebenfalls nicht im ursprünglichen Zustand exprimieren kann. Mögliche phänotypische Eigenschaften müssen also nicht auf das alleinige Fehlen von OmpW zurückzuführen sein. Darüber hinaus handelt es sich bei den fünf *S. Marina*-Stämmen eben nicht um isogene Stämme. Die Zugehörigkeit zu dem Serovar *S. Marina* bedeutet also nicht, dass die Stämme ein einheitliches Repertoire an Genen oder Proteinen besitzen. Die in dieser Arbeit durchgeführte biochemische Charakterisierung zeigte dann auch, dass die vier OmpW-exprimierenden *S. Marina*-Stämme über unterschiedliche Stoffwechseleigenschaften verfügen. Die Diversität von Genomen und Proteomen innerhalb einzelner Salmonellen-Serovare ist lange bekannt und mittels moderner molekularbiologischer Methoden bei den für die in der Human- und Tiermedizin bedeutendsten Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* gut untersucht (Hu *et al.*, 2006; Porwollik *et al.*, 2002; Porwollik *et al.*, 2005; Reen *et al.*, 2005). Trotz der eingeschränkten Aussagekraft bei der Verwendung von Feldstämmen sind die phänotypischen Analysen von natürlichen Deletionsmutanten in der Vergangenheit ein wichtiges Werkzeug für die Entschlüsselung von Porinfunktionen z. B. bei der Vermittlung von Resistenzeigenschaften gewesen (Armand-Lefevre *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 1987; Toro *et al.*, 1990; Trias & Nikaido, 1990).

Mit der Technik der gezielten chromosomalen Deletion („Knockout“) von Genen über homologe Rekombination ist es seit wenigen Jahren möglich, Bakterienstämme zu

generieren, die einen identischen genetischen Hintergrund besitzen (isogene Stämme). Die Methode des Einzelgen-Knockouts ist zu einem wichtigen Werkzeug in der Molekularbiologie geworden (Baudin *et al.*, 1993; Cherepanov & Wackernagel, 1995; Datsenko & Wanner, 2000; Merlin *et al.*, 2002; Murphy, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Aufgrund der enormen Fortschritte bei der Aufklärung von Proteinfunktionen mittels isogener Knockout-Mutanten gibt es mit der Keio-Stammsammlung seit 2006 für alle nicht-essentiellen 3.985 Gene von *E. coli* K12 (von insgesamt 4.288) kommerziell erhältliche Knockout-Mutanten (Baba *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund sollte die Funktion von OmpW im Rahmen der hier beschriebenen Doktorarbeit auch mit isogenen Salmonellen-Teststämmen untersucht werden. Für die Herstellung der isogenen *ompW*-Knockout-Mutante wurde aus mehreren Gründen das Serovar S. Tm. ausgewählt und nicht S. Marina. Das Serovar S. Marina ist bislang wenig untersucht und es liegen kaum Informationen zur Biologie und Pathogenität vor. Reptilien, insbesondere Leguane, Schlangen und Schildkröten scheinen ein Reservoir für S. Marina-Stämme zu sein, die von dort auch auf Menschen übertragen werden können (Mermin *et al.*, 1997; Robert Koch-Institut, 1997; Schroter *et al.*, 2004; Woodward *et al.*, 1997). Allerdings sind humane S. Marina-Infektionen selten und wurden bisher ausschließlich bei Kindern, alten oder immunsupprimierten Menschen beobachtet, was dafür spricht, dass S. Marina, verglichen mit anderen *Salmonella*-Serovaren, schlechter an den Menschen angepasst ist. Ein kontinuierlicher Anstieg der durch S. Marina verursachten humanen Salmonellosen in den vergangenen Jahren ist vermutlich auf die verstärkte Haltung von Reptilien zurückzuführen (Mermin *et al.*, 1997; Robert Koch-Institut, 1997; Schroter *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu S. Marina nimmt das Serovar S. Tm. epidemiologisch nicht nur in Deutschland, sondern weltweit eine dominierende Stellung sowohl im human- wie auch im veterinärmedizinischen Bereich ein. Demzufolge liegen zahlreiche Kenntnisse über die Biologie und Pathobiologie dieses Serovars vor (Santos *et al.*, 2003). Das Serovar Typhimurium gehört zu den nicht wirtsadaptierten Salmonellen und löst in Mäusen Typhus-ähnliche klinische Erscheinungen aus, weshalb die Infektion als Modell für Typhuserkrankungen des Menschen dient (Santos *et al.*, 2001). Die Verwendung eines S. Tm.-Stammes für die Herstellung einer *ompW*-Knockout-Mutante hält die Option offen, bei weiterführenden Studien im Mausinfektionsmodell die Bedeutung von OmpW für die Virulenz zu untersuchen.

Die Bemühungen zur Herstellung einer *ompW*-Knockout-Mutante von S. Tm. SL1344 nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) waren erfolgreich. Die erzeugte Rekombinante zeigte die erwartete gentechnisch bedingte Kanamycin-Resistenz und konnte über die genetische Charakterisierung mittels PCR, Southern-Blot-Hybridisierung und Pulsfeld-Gelelektrophorese als isogene *ompW*-Knockout-Mutante bestätigt werden. Die zur Substitution des *ompW*-Gens verwendete Kanamycin-Resistenzkassette ließ sich nur am gewünschten Ort nachweisen, eine zusätzliche unerwünschte Integration an einem weiteren Genort hatte nicht stattgefunden. Zur Ergänzung des isogenen S. Tm.-Paares bestehend aus Wildtypstamm und *ompW*-Knockout-Mutante sollte für die phänotypischen Untersuchungen zusätzlich eine mit *ompW* komplementierte Knockout-Mutante erzeugt werden. Die Komplementierung von Knockout-

Mutanten mit dem entsprechenden Gen über Plasmide kann zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führen. Eine Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps dient dem Nachweis, dass die Funktionalität unabhängig von der Lokalisation des Gens in *cis* oder in *trans* erhalten ist. Gleichzeitig ist die erfolgreiche Rekonstitution des Wildtyp-Phänotyps nach Wiedereinführung des Gens Beweis für einen genspezifischen Effekt. Die angestrebte Komplementierung des *ompW*-Knockout-Stammes war erfolgreich und es konnte mittels PCR und Pulsfeldgelelektrophorese gezeigt werden, dass der resultierende Stamm SL1344 Δ *ompW*-C mit dem Knockout-Stamm genetisch identisch war und sich nur durch das Komplementierungsplasmid unterschied. Das Komplementierungsplasmid trug das *ompW*-Gen inklusive des stromaufwärts gelegenen intergenischen Bereiches, um *ompW* unter der Kontrolle seines natürlichen, bisher nicht identifizierten Promotors zu belassen. Die Untersuchung der OmpW-Expression mittels der OmpW-spezifischen Hyperimmunseren zeigte, dass der *ompW*-Knockout-Stamm die im Immuno-Blot dominante Bande nicht mehr besaß, der komplementierte Stamm dagegen ein verstärktes Signal lieferte. Die Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung war, dass der komplementierte Knockout-Stamm OmpW wieder exprimiert. Der Promotor von *ompW* befindet sich demnach im intergenischen Bereich oberhalb des Gens und die Expression findet unabhängig von der Lokalisation des Gens in *cis* oder in *trans* statt. Das starke Signal im Immuno-Blot deutete darauf hin, dass die komplementierte Knockout-Mutante mehr OmpW bildete, als der Wildtyp-Stamm. Dies wäre dadurch zu erklären, dass das *ompW*-tragende „low copy“-Plasmid mit etwa 15-20 Kopien in der Bakterienzelle vorliegt, während das *ompW*-Gen nach den Ergebnissen aus der Southern-Blot-Hybridisierung im Wildtypstamm als Einzelkopie vorhanden ist.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus den Immuno-Blot-Versuchen blieb der Versuch, mit dem erzeugten OmpW-spezifischen Hyperimmunserum die OmpW-Lokalisation an der Oberfläche nativer Salmonellen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen, leider erfolglos. Wenig wahrscheinlich erscheint die Erklärung, dass OmpW gar nicht an der Oberfläche lokalisiert ist, da bereits mehrere Arbeitsgruppen für *in vitro*-Kulturen von Salmonellen das Vorhandensein von OmpW in OMP-Präparationen nachweisen konnten (Bauerfeind, 1999; Hu *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 1997; Qi *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die im Immuno-Blot erkannten Epitope in nativer Form und Lage nicht zugänglich waren, denn wenn sich das native OmpW in der Zellwand der intakten *Salmonella*-Zelle befindet, könnten eigentlich nur die nach außen gerichteten Peptidschleifen des Proteins für Antikörper zugänglich sein. Möglicherweise enthielt das verwendete Hyperimmunserum keine oder nur wenige solcher Antikörper, so dass entsprechende Signale bei der durchflusszytometrischen Analyse einfach nicht zu messen waren. Aufgrund der engen Assoziation von OmpW mit dem Lipopolysaccharidanteil (LPS) der Membran ist es auch denkbar, dass lange LPS-Seitenketten die OmpW-Epitope überragen und diese gegenüber den Antikörpern maskieren (Baldermann *et al.*, 1998; Hancock & Carey, 1979; Hancock *et al.*, 1981a; Hancock *et al.*, 1990; Nandi *et al.*, 2005). Eine solche Maskierung ist zuvor für die Porine OmpC und OmpD von Salmonellen beschrieben worden (Singh *et al.*, 2000).

Bereits eine partielle oder Serogruppen-spezifische Maskierung von OmpW-Epitopen durch das LPS hätte Auswirkungen auf die Bildung spezifischer Antikörper und die Immunogenität von OmpW *in vivo*. Daher wäre eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Immunogenität von OmpW *in vivo* und O-Gruppen-Zugehörigkeit des Salmonellen-Isolats von praktischer Relevanz. Um festzustellen, ob LPS-Anteile die Oberflächen-lokalisierten Epitope maskieren, sollte man versuchen, die *ompW*-Deletionsstelle mittels P22-Transduktion in einen Salmonellenstamm mit verkürzten LPS-Seitenketten (sog. R-Mutanten) zu transduzieren und die Detektion von nativem OmpW in der äußeren Membran erneut zu untersuchen. In einer anderen Studie konnte eine verbesserte immunologische Detektion der Porine OmpC und OmpD durch die Verwendung der R-Mutante *S. Tm.* SH5014 erreicht werden (Singh *et al.*, 2000). Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlgeschlagene Detektion von nativem OmpW an der Oberfläche von Salmonellen wäre, dass es sich bei den im Immuno-Blot erkannten Epitopen um lineare Epitope handelte, welche nur im denaturierten OmpW zugänglich sind und vom verwendeten Serum in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins nicht erkannt werden.

Fitness unter verschiedenen *in vitro*-Wachstumsbedingungen

Die den Versuchen zugrunde liegende Arbeitshypothese war, dass es sich bei OmpW um ein Porin oder Porin-ähnliches Protein handelt. Der *S. Tm.* Stamm SL1344, seine isogene *ompW*-Knockout-Mutante und die komplementierte Knockout-Mutante stellten das primäre Testsystem dar, mit dem die biologische Relevanz von OmpW für das *in vitro*-Wachstum einerseits und für die Stabilität gegen äußere Milieueinflüsse andererseits beleuchtet werden sollten. Ergänzend wurden phänotypische Untersuchungen des OmpW-defizienten *S. Marina* Stammes SARC9 und der vier OmpW-exprimierenden *S. Marina* Stämme durchgeführt.

Der Vergleich der biochemischen **StoffwechsellLeistungen** zwischen dem SL1344-Wildtypstamm und der isogenen *ompW*-Knockout-Mutante mittels api20E[®]-Test erbrachte keine wesentlichen Unterschiede in den grundlegenden Stoffwechselwegen. Das Unvermögen der natürlichen *ompW*-Deletionsmutante *S. Marina* SARC9 Sorbitol umzusetzen konnte mit den isogenen SL1344-Stämmen nicht als OmpW-vermittelter Effekt nachvollzogen werden. Eine Auxotrophie für die zwanzig getesteten Substrate konnte nicht festgestellt werden.

Das in den Motilitätsassays untersuchte **Schwärmverhalten** beschreibt nicht nur die bakterielle Fähigkeit zur Beweglichkeit auf der Oberfläche halbfester Labornährböden, sondern gibt Hinweise auf zahlreiche Eigenschaften, die mit der Differenzierung in den langen, hyperflagellierten Schwärmtyp koreguliert sind (Fraser & Hughes, 1999). Dazu gehören Virulenz- und Resistenzeigenschaften und eine Umschaltung von katabolischen auf anabolische Stoffwechselvorgänge einhergehend mit der Herunterregulation der Membranpermeabilität (Kim *et al.*, 2003; Kim & Surette, 2003, 2004, 2005, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte fehlende Fähigkeit von SARC9 Schwärmverhalten zu zeigen, wurde bereits durch eine andere Arbeitsgruppe

beschrieben (Kim & Surette, 2005). Mögliche Ursachen für fehlendes Schwärmverhalten sind Störungen im Flagellarapparat oder Motorprotein sowie die fehlende Verfügbarkeit leicht zu verstoffwechselnder Kohlenhydrate hervorgerufen zum Beispiel durch Störungen in den Phosphotransferase-abhängigen und -unabhängigen Kohlenhydrat-Translokationssystemen der inneren Membran (Kim & Surette, 2005). Leicht zu verstoffwechselnde Kohlenhydrate sind bei *S. Tm.* notwendig zur Stimulation des Schwärmverhaltens (Harshey & Matsuyama, 1994; Kim & Surette, 2004). Es wurde gezeigt, dass die Schwärmfähigkeit von SARC9 abhängig ist von der verfügbaren Kohlenstoffquelle (Kim & Surette, 2005). Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführten Motilitätstests lieferten keinen Hinweis darauf, dass das fehlende Schwärmverhalten von SARC9 durch das Fehlen von OmpW verursacht wird, denn anhand der isogenen *S. Tm.*-Stämme konnte kein Einfluss von OmpW auf das Schwärmverhalten nachgewiesen werden und damit auch keine Beteiligung an der Bereitstellung von Phosphotransferasesystem-abhängigen und -unabhängigen Kohlenhydraten.

Die *in vitro*-Anzuchtversuche in LBM hatten zum Ziel, die Wachstumseigenschaften OmpW-exprimierender und -defizienter Salmonellen unter Milieubedingungen zu testen, mit denen die Salmonellen auch unter natürlichen Bedingungen konfrontiert werden. Der *S. Marina*-Stamm SARC9 war in stark saurem Milieu (pH 3,5), bei hohen Osmolaritäten (5 % Natriumchlorid) oder unter oxidativem Stress (500 μ M Methylviologen) gegenüber den vier OmpW-exprimierenden *S. Marina* Stämmen stark im Wachstum beeinträchtigt. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass SARC9 *in vivo* ein hochgradig attenuierter Stamm ist. Für diese Annahme gibt es mehrere Gründe. So ist **Säureresistenz** als Teil der „Acid Tolerance Response“-Antwort mit anderen Virulenzfaktoren ko-reguliert (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993; Riesenberg-Wilmes *et al.*, 1996). Ferner ist die Fähigkeit, sich an niedrige pH-Werte zu adaptieren, nicht nur für die Magenpassage der Salmonellen essentiell, sondern schützt auch gegen andere Milieueinflüsse (Leyer & Johnson, 1993). Die bei den *S. Marina*-Stämmen beobachteten milieubedingten Vermehrungsunterschiede ließen sich anhand der isogenen *S. Tm.*-Stämme nicht nachvollziehen. Die Beobachtung, dass sich der komplementierte *ompW*-Knockout-Stamm unter extremen Milieubedingungen nur verzögert vermehrte, ist wahrscheinlich ein plasmidbedingter Effekt, der nicht auf OmpW zurückzuführen ist. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass auch die *E. coli* BLR(DE3)-Stämme, die das Komplementierungsplasmid und das „leere“ Plasmid pBR322 trugen, im Vergleich zu ihrem Wildtypstamm schlechter wuchsen. Eine plasmidbedingte Wachstumsverzögerung kann bei „high-copy“ Plasmiden dadurch bedingt sein, dass ein erheblicher Teil des Metabolismus für die Replikation der Plasmid-DNS oder die Synthese plasmidkodierter Proteine aufgewendet werden muss. Bei der Wachstumsreduktion durch das hier verwendete „low-copy“ Plasmid pBR322 handelte es sich wahrscheinlich um einen Effekt, der auf den Zusatz von Tetrazyklin in die Nährmedien für die rekombinanten Teststämme zurückzuführen ist. Die durch das Plasmid pBR322 vermittelte Tetrazyklinresistenz ist bedingt durch Expression des Transportproteins TetA in der inneren Membran. Das TetA-Protein bindet intrazelluläres Tetrazyklin und

transportiert es im Austausch gegen ein Proton in den periplasmatischen Spalt. Treibende Kraft dieses Antiports ist der Protonengradient über die innere Membran (Yamaguchi *et al.*, 1991). Der Zusammenbruch des Protonengradienten unter den extremen Milieubedingungen kann zu einer verminderten Tetrazyklin-Effluxrate geführt haben und so zu einer Tetrazyklin-bedingten Wachstumsbeeinträchtigung der pBR322-komplementierten Bakterienstämme.

Die Adaptationsfähigkeit an hohe Osmolaritäten in wässriger Umgebung, hervorgerufen durch hohe **Natriumchlorid**-Konzentrationen, wurde in mehreren Untersuchungen bei marinen Pathogenen der Genera *Vibrio* und *Photobacterium* mit der Hochregulation von OmpW in Verbindung gebracht (Wu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004; 2005). Die Beobachtung, dass bei *Vibrio cholerae* keine Alteration der OmpW-Expression festzustellen ist (Nandi *et al.*, 2005), könnte auf eine speziesspezifische Funktion von OmpW innerhalb des Genus *Vibrio* oder auf eine spezifische Funktion von OmpW bei Bakterien mit Spezialisierung auf aquatische Habitate unterschiedlicher Salinitäten hindeuten. In Konsens zu der Hypothese, dass OmpW die Adaptation an hohe Osmolaritäten ermöglicht, steht die Beobachtung, dass *S. Marina* SARC9 im Vergleich zu den OmpW-positiven Stämmen dieses Serovars hochgradig sensibel auf hohe Natriumchloridkonzentrationen reagierte. Ein Einfluss von OmpW auf die Natriumchloridtoleranz bei *S. Tm.* konnte mittels der isogenen SL1344-Stämme jedoch nicht gezeigt werden. Entweder ist der Unterschied in der Natriumchloridtoleranz zwischen SARC9 und den vier OmpW-positiven *S. Marina*-Stämmen nicht OmpW-bedingt und es gibt bei *Salmonella*, anders als bei *Vibrio* und *Photobacterium*, keinen Zusammenhang zwischen der Expression von OmpW und einer erhöhten Natriumchloridtoleranz oder es gibt serovarspezifische Unterschiede in der Funktion von OmpW. Die im Vergleich zu den *S. Tm.*-Stämmen beobachtete schnellere Adaptationsfähigkeit und das Erreichen höherer Keimdichten der OmpW-positiven *S. Marina*-Stämme bei hohen Natriumchloridkonzentrationen im Umgebungsmilieu könnten auch auf serovarspezifische Unterschiede der Natriumchloridtoleranz hinweisen. Eine Klärung, ob OmpW für die Natriumchloridtoleranz von *S. Marina* eine Rolle spielt, wäre nur durch die Herstellung einer isogenen *ompW*-Knockout-Mutante eines *S. Marina*-Stammes zu erbringen. Eine serovarspezifische Funktion würde jedoch die Frage nach der Funktion von OmpW bei anderen Serovaren aufwerfen, denn, wie gezeigt, ist OmpW im gesamten Genus *Salmonella* spp. vorhanden.

Wie die Natriumchloridtoleranz hat die Resistenz gegen **Methylviologen** physiologische Bedeutung, da durch die Methylviologen-induzierte Freisetzung von Sauerstoffmetaboliten reaktive Bedingungen im Phagolysosom von Makrophagen simuliert werden (Buchmeier *et al.*, 1997; Farr & Kogoma, 1991). Die Elimination von Methylviologen aus den Bakterien erfolgt über verschiedene Effluxsysteme, wobei bei Salmonellen insbesondere das Porin OmpD von Bedeutung ist (Saier, 2006; 2001; Santiviago *et al.*, 2002). Dieselbe Arbeitsgruppe vermutet eine mögliche Beteiligung von OmpW am Methylviologen-Efflux und vielleicht sogar eine generelle Funktion von OmpW bei der Elimination toxischer Komponenten, ohne die in Frage kommenden Substanzen näher zu benennen. Auf welcher Datengrundlage diese Vermutungen

beruhen, bleibt unklar. Trifft diese Arbeitshypothese jedoch zu, könnte es bedeuten, dass OmpW die äußere-Membran-Komponente eines Effluxsystems ist, vergleichbar mit dem OmpD/YddG-Effluxsystem (Santiviago *et al.*, 2002). In der vorliegenden Studie konnte jedoch anhand des *in vitro*-Wachstums in LB-Medium kein Effekt von OmpW auf die Methylviologen-Resistenz nachgewiesen werden. Da es wahrscheinlich mindestens drei unabhängige Methylviologen-Effluxsysteme gibt, sind kompensatorische Mechanismen bei Ausfall eines Systems anzunehmen (Santiviago *et al.*, 2002). Interessant wäre in diesem Zusammenhang, zusätzlich zu OmpW auch das Porin OmpD auszuschalten oder die *ompW*-Deletion mittels P22-Transduktion in einen *S. Typhi*-Stamm zu transduzieren, da dieses Serovar *ompD* nicht besitzt (Santiviago *et al.*, 2001). Auch die Ausschaltung weiterer Komponenten von mutmaßlichen Methylviologen-Effluxsystemen, wie zum Beispiel *smvA* und *yddG* könnte Hinweise auf einen OmpW-abhängigen Methylviologen-Efflux liefern (Santiviago *et al.*, 2002). Bislang wurden keine Ko-Faktoren für ein OmpW-abhängiges Effluxsystem identifiziert.

Die *in vitro*-Anzuchtversuche in M9-Ca-Mangelmedien sollten den Einfluss von OmpW auf die Verwertbarkeit von verschiedenen **Kohlenstoffquellen** durch *S. Tm.* beleuchten. **Glukose** ist für *S. Tm.* die am leichtesten zu verstoffwechselnde Kohlenstoff- und Energiequelle und stellt daher eine primäre Kohlenstoffquelle dar (Kenyon *et al.*, 2005). Während des Wachstums in glukosereichem Milieu wird die Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffverbindungen unterdrückt (Moat *et al.*, 2002; Notley & Ferenci, 1995). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie das Wachstum in glukosefreiem M9-Ca-Mangelmedium untersucht. Die im M9-Ca-Mangelmedium enthaltenen Casaminosäuren sind saure Casein-Hydrolysate und daher nur eingeschränkt als Kohlenstoffquelle für die Salmonellen nutzbar. Die Casaminosäuren sind dem Medium als Stickstoffquelle zugesetzt, denn der Gehalt an Peptiden liegt nach Herstellerangaben bei etwa 50 % der Trockenmasse (Fa. Difco, Lawrence, USA). Diese Peptide können jedoch nur unter Energieaufwendung im Rahmen der Glukoneogenese auch als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Kohlenhydratverbindungen sind nur zu etwa 0,1 % in den Casaminosäuren enthalten, so dass insgesamt im M9-Ca-Mangelmedium eine Kohlenhydrat-Mangelsituation bei gleichzeitigem Überschuss von verfügbarem Stickstoff entsteht. Dem glukosefreien M9-Ca-Mangelmedium wurden unterschiedliche alternative Kohlenstoffverbindungen zugesetzt. Die Erschöpfung an verfügbarer Glukose resultiert in einer Umschaltung auf den Metabolismus sekundärer Kohlenstoffquellen. Das Umschalten des Stoffwechsels von Glukose auf beispielsweise Maltose, Zitronensäure oder Bernsteinsäure, die für ihre Aufnahme Rezeptorbindungsproteine und/oder Porine benötigen, resultiert in einer anhaltenden Erhöhung der Expression des alternativen Sigmafaktors RpoE (Kenyon *et al.*, 2005). Andere sekundäre Kohlenstoffverbindungen ohne bekannte Transportsysteme mit einer periplasmatischen oder äußeren-Membran-Komponente führen zu keiner Erhöhung der RpoE-Expression, unabhängig davon, ob sie das Phosphotransferase-Transportsystem der inneren Membran benötigen (z. B. Trehalose, Mannose, Mannitol und Fruktose) oder nicht (z. B. Glycerin, Arabinose, Galactose und Melibiose). RpoE von *S. Tm.* reguliert nach neuesten Erkenntnissen damit offensichtlich nicht nur die Elimination und Reparatur

beschädigter extrazytoplasmatischer Proteine, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Adaptation an veränderte Umweltbedingungen und der Verfügbarmachung sekundärer Kohlenstoffquellen (Kenyon *et al.*, 2005). Die Regulation der OmpW-Expression durch RpoE bei *E. coli* (Johansen *et al.*, 2006) und die Kohlenhydrat-abhängigkeit der Expression von OmpW bei *Vibrio cholerae* (Hancock *et al.*, 1990; Nandi *et al.*, 2005) passen gut zusammen und können Hinweise einer möglichen Beteiligung von OmpW-homologen Proteinen an der Aufnahme sekundärer Kohlenstoffverbindungen sein.

Die Supplementierung des Mediums mit dem aromatischen Kohlenstoffsubstrat **Naphthalin** unter Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel bewirkte keine Unterschiede im Wachstum von *ompW*-Knockout-Mutante und Wildtyp. Hinweise für eine Beteiligung von OmpW bei der Aufnahme von Naphthalin, wie sie für die Homologa NahE bzw. DoxH von *Pseudomonas* angenommen wird, konnten anhand der Wachstumseigenschaften der beiden isogenen SL1344-Stämme nicht festgestellt werden (Eaton, 1994; Hong *et al.*, 2006; van Beilen *et al.*, 1992). Dabei ist zu vermuten, dass das schlechtere Wachstum des komplementierten Stammes nach Zugabe der alkoholischen Naphthalin-Lösung ein plasmidbedingter Effekt war, wie er auch unter anderen extremen Milieubedingungen beobachtet wurde.

Glycerinzusatz im Mangelmedium führte zu einem besseren Wachstum des komplementierten Stammes. Glycerin ist eine Phosphotransferase-Transportsystem-unabhängige sekundäre Kohlenstoffquelle für *Salmonella* und *E. coli* und kann über den Zitratzyklus verstoffwechselt werden (Kenyon *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 1964). Aus diesem Grund wäre ein besseres Wachstum bei gesteigerter Verfügbarkeit von Glycerin als Folge einer Überexpression von OmpW denkbar. Leider ergaben sich aber keine Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Stamm, was die Hypothese über eine Rolle von OmpW bei der Aufnahme von Glycerin unterstützt hätte.

Bei den Anzuchtversuchen mit Zusatz von **Monosacchariden** in das M9-Ca-Mangelmedium konnten für **Ribose** und **Fruktose** ein reduziertes Wachstum der *ompW*-Knockout-Mutante gegenüber dem SL1344-Wildtyp festgestellt werden. Diese Effekte waren allerdings mit einer mittleren Reduktion um 7 % bzw. 13 % sehr schwach ausgeprägt, so dass eine biologische Relevanz fraglich ist. Zudem konnte der Phänotyp des Wildtyp-Stammes durch die Komplementierung der Knockout-Mutante mit dem plasmidkodierten *ompW* nicht rekonstituiert werden.

Die Supplementierung von M9-Ca-Mangelmedium mit **Di-Natrium-Succinat** führte zu einem um etwa 40 % stärkeren Wachstum des Wildtypstammes gegenüber der *ompW*-Knockout-Mutante, wobei sich dieser Effekt durch das Komplementierungsplasmid in einem von zwei unabhängigen Versuchen rekonstituieren ließ. Die unsichere Komplementierung dieses Phänotyps über das Plasmid kann ein Hinweis sein, dass die Lokalisation von *ompW* im Salmonellen-Genom für die Regulation der Expression von Bedeutung ist und das Gen in *trans* nur eingeschränkt in der Lage ist, den Genverlust in *cis* zu kompensieren. Ursachen hierfür können Interaktionen mit

Regulatorgenen sein, die eine räumliche Nähe des *ompW*-Gens erfordern oder aber eine Ko-Expression mit anderen Genprodukten des Genortes, die für die Funktionalität von OmpW essentiell sind. Der Wildtypstamm wies im Succinat-supplementierten M9-Ca-Mangelmedium nach 24-stündiger Inkubation etwa doppelt so hohe absolute Keimdichten auf, wie im nicht supplementierten M9-Ca-Mangelmedium. Dies deutet darauf hin, dass Succinat unter aeroben Wachstumsbedingungen von SL1344 als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Der *ompW*-Knockout-Stamm erreichte hingegen lediglich Keimdichten, die den Keimdichten im nicht supplementierten Medium entsprachen, was zeigt, dass der *ompW*-Knockout-Stamm nicht in der Lage war, Succinat als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Succinat ist Bestandteil des Krebszyklus und kann unter aeroben Bedingungen durch die Succinatdehydrogenase zu Fumarat oxidiert und als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Die reverse Reaktion spielt eine bedeutende Rolle bei der Fermentation unter anaeroben Bedingungen und wird katalysiert durch die Fumaratreduktase (Van Hellemond & Tielens, 1994). Die Verstoffwechslung von Succinat zu Fumarat und umgekehrt ist für fakultativ anaerobe Bakterien wie Salmonellen metabolisch bedeutend. Dabei sind Succinatdehydrogenase und Fumaratreduktase in der Lage, auch die jeweils reverse Reaktion zu katalysieren, jedoch bei herabgesetzter Affinität zum Substrat (Cecchini *et al.*, 2002). Die mangelhafte Fähigkeit der *ompW*-Knockout-Mutante, Succinat als Kohlenhydratquelle zu nutzen, ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass bei *E. coli* kürzlich die Ausbildung von Proteinkomplexen zwischen OmpW und der Fumaratreduktase (FrdB) nachgewiesen werden konnte (Huang *et al.*, 2006). Diese Komplexbildung ist vermittelt durch die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Fumaratreduktase, die eine von vier Untereinheiten (FrdABCD) darstellt (Cecchini *et al.*, 2002). Möglicherweise sind die Proteine Slp, Odp1, YdgA und YbjP ebenfalls Bestandteile des OmpW-Fumaratreduktase-Proteinkomplexes (Huang *et al.*, 2006). YdgA und YbjP sind Proteine mit unbekannter Funktion, alle anderen Proteine des Komplexes können mit Funktionen im Kohlenhydratstoffwechsel in Verbindung gebracht werden. Slp ist ein Lipoprotein der äußeren Membran und stabilisiert die Membran in Kohlenhydratmangelsituationen (Alexander & John, 1994; Kabir *et al.*, 2004; Price & St John, 2000). Odp1 katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und ist somit ebenfalls am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt (Huang *et al.*, 2006). Resultierend aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die Vermutung, dass OmpW die Porinkomponente eines komplexen Stoffwechselsystems für den Metabolismus von Succinat darstellt und damit ein wichtiger Effektor für die fakultativ anaerobe Lebensweise von *Salmonella* und *E. coli* ist. Diese These würde unterstützt, wenn sich analog zum aeroben Wachstum mit Succinat als Kohlenstoffquelle auch bei anaerobem Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Fumarat vergleichbare phänotypische Unterschiede zeigen würden.

Eine mögliche Beteiligung von OmpW bei der Nutzung von **Azetat** als Substrat für den Zitronensäurezyklus und die damit verbundene Erzeugung von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) passt auch zu der Beobachtung, dass sich die OmpW-exprimierenden Stämme nach 48-stündiger Inkubation besser an hohe Azetatkonzentrationen adaptieren konnten. Ein Erschöpfen von Glukose oder anderer leicht zu assimilierender

azetogener Kohlenstoffquellen führt zu einer metabolischen Nutzung von Azetat durch Umschalten von Azetat-Dissimilation auf Azetat-Assimilation („Azetat-Switch“) (Wolfe, 2005). Azetat wird als Stoffwechselprodukt bei der Fermentation organischer Säuren oder der Assimilation leicht zu metabolisierender Zucker als Folge einer inhibierten Respiration („Crabtree-Effekt“) in großen Mengen durch Enterobakterien gebildet und freigesetzt (Crabtree, 1929; Luli & Strohl, 1990). Darmpathogene Bakterien wie *Salmonellen* müssen sich somit an hohe Konzentrationen adaptieren können, um den Wirt erfolgreich zu besiedeln. Hohe Azetatkonzentrationen wirken toxisch auf Bakterien aufgrund der Beeinflussung des transmembranären pH-Gradienten und des hyperosmotischen Stresses (Kwon & Ricke, 1998; Luli & Strohl, 1990; Sainz *et al.*, 2005; Salmond *et al.*, 1984). Die Verstoffwechslung von Azetat führt zu einer Erniedrigung der Azetatkonzentration und damit zu einer Detoxifikation des Umgebungmilieus (Wolfe, 2005). Ausdruck des toxischen Einflusses von hohen Azetatkonzentrationen auf die Teststämme ist das reduzierte Wachstum gegenüber dem Wachstum in nicht mit Azetat supplementiertem M9-Ca-Mangelmedium. Der *ompW*-Knockout-Stamm wies darüber hinaus bei hohen Azetatkonzentrationen gegenüber dem Wildtyp eine niedrigere Azetattoleranz auf. Die Beobachtung, dass sich die *OmpW*-exprimierenden Stämme nach 48-stündiger Inkubation besser an das Medium adaptieren konnten, kann entweder Ausdruck einer verbesserten Stressantwort auf hohe Azetatkonzentrationen sein oder auf die erfolgreiche Umschaltung der metabolischen Nutzung von Azetat hinweisen. Dass die unterschiedliche Wirkung von Azetat auf die isogenen Teststämme kein pH-bedingter Effekt war, sondern auf einen veränderten Azetat-Metabolismus zurückzuführen war, lässt sich aus der Tatsache schlussfolgern, dass der Zusatz von 2 % Natriumazetat keinen maßgeblichen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums hatte (pH = 7,1). Die durchgeführten Wachstumskinetiken zeigten, dass das alleinige Vorhandensein von Azetat im Medium das Wachstum von *S. Tm.* zunächst hemmt, nach dem erfolgten Umschalten auf Azetat-Assimilation aber ein Wachstum ermöglicht. Auch wenn die Assimilation von Azetat energetisch nicht ergiebig ist, ermöglicht sie den *Salmonellen* dennoch sich nach der Erschöpfung von leicht zu assimilierenden Kohlenstoffen weiterhin gut zu vermehren und in Bouillonkulturen hohe Keimdichten zu erreichen (El-Mansi, 2004; Holms, 1996; 1986). Die Aufnahme von Azetat erfolgt frei über Diffusion durch die äußere Membran und über spezifische Transportsysteme der inneren Membran wie z. B. die Azetatpermease *YjcG* (Gimenez *et al.*, 2003; Salmond *et al.*, 1984). Vor der Metabolisierung von Azetat ist eine Aktivierung durch Umwandlung in Acetyl-CoA notwendig. Acetyl-CoA ist zentraler Bestandteil des Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels mit Beteiligung am Zitronensäurezyklus, der Glukoneogenese und der Fettsäuresynthese (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Wolfe, 2005). Die Entdeckung der Ausbildung von Protein-Komplexen zwischen *OmpW* und der Pyruvatdehydrogenase sowie der Fumaratreduktase, also Enzymen des Kohlenhydrat-Stoffwechsels, unterstützt die Hypothese, dass *OmpW* für den zentralen Metabolismus von Kohlenstoffverbindungen von Bedeutung sein könnte (Huang *et al.*, 2006). Zukünftige Untersuchungen sollten überprüfen, ob sich *OmpW*-bedingte Wachstumsunterschiede neben Azetat auch für andere kurzkettige Fettsäuren zeigen lassen. Zu bedenken ist, dass Azetat möglicherweise nicht das eigent-

liche Substrat für OmpW ist, sondern dass auch andere kurzkettige Fettsäuren wie Propionat und Butyrat, die ebenfalls über den Zitratzyklus verstoffwechselt werden, in Frage kommen. Weitere Untersuchungen sollten darüber hinaus höhermolekulare Fettsäuren als Substrate für OmpW berücksichtigen. Hong (2006) vermutet aufgrund seiner strukturellen Analysen von OmpW bei *E. coli*, dass eine Beteiligung von OmpW auch bei der Aufnahme von langkettigen Kohlenstoffverbindungen wie z. B. Fettsäuren, möglich ist. Die Tatsache, dass das OmpW-homologe AlkL von Pseudomonaden der Aufnahme von Alkanen dient, also von linearen Kohlenstoffverbindungen mit vergleichbarem Molekulargewicht, unterstützt diese Hypothese. Möglicherweise sind nicht Alkane sondern Fettsäuren das eigentliche Substrat von AlkL, da die Verstoffwechslung von Fettsäuren für die Pseudomonaden physiologisch bedeutender sein dürfte als die Verstoffwechslung von Alkanen (Hong *et al.*, 2006). Vor dem Hintergrund einer möglichen Funktion von OmpW als Porin für Fettsäuren oder andere organische Säuren könnte das Herstellen einer kombinierten *ompW/fadL*-Doppelmutante interessante Einblicke in die Funktion von OmpW liefern, denn FadL ist bisher das einzige bekannte Transportsystem für Fettsäuren bei *E. coli* (Hong *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2004; van den Berg, 2005). Das Ausschalten von FadL würde mögliche kompensatorische Mechanismen von FadL in der *ompW*-Knockout-Mutante verhindern. Hong (2006) stellt die Arbeitshypothese auf, dass OmpW aufgrund bisheriger Kenntnisse möglicherweise einerseits als Porin für kleine anorganische Salze, andererseits aber auch als Transporter für Fettsäuren dienen kann und diese über die laterale Öffnung des Porenlumens in die äußere Membran transportiert („lateral exit“-Modell), wo sie zur Zellwandsynthese genutzt werden könnten.

Die **Eisenionen**-abhängige Expression von OmpW wurde bei verschiedenen Bakterien-Genera nachgewiesen (Bauerfeind, 1999; Boyce *et al.*, 2006; Hancock *et al.*, 1990; McHugh *et al.*, 2003; Paustian *et al.*, 2001; Paustian *et al.*, 2002a; Paustian *et al.*, 2002b). Bemerkenswert ist, dass bei allen bisher untersuchten Bakteriengenera eine Hochregulation von OmpW bei hoher Eisenionen-Verfügbarkeit erfolgt und nur bei dem Metall-reduzierenden Bakterium *Shewanella oneidensis* eine erhöhte OmpW-Expression unter Eisenmangel zu beobachten ist (Thompson *et al.*, 2002). Damit verhält sich OmpW bei den meisten Bakteriengenera nicht wie ein typisches Eisen-Aquisitionssystem, da Eisenmangelproteine bei hoher Eisenverfügbarkeit in der Regel herunterreguliert und nur bei Eisenmangel vermehrt exprimiert werden (Lengeler, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus weder im Eisenmangel-Medium noch bei hoher Eisenverfügbarkeit ein OmpW-bedingter Effekt auf das Wachstum beobachtet werden. Die verschiedenen Arbeiten zur Expression von OmpW-homologen Proteinen unter Eisenionen-Einfluss und die eigenen Ergebnisse aus den Wachstumskinetiken lassen deshalb die Schlussfolgerung zu, dass OmpW kein Bestandteil eines Eisenaquisitionssystemes darstellt. Möglicherweise ist die beobachtete eiseninduzierte Hochregulation der OmpW-Expression Folge einer Eisen-abhängigen Ko-Regulation für die Synthese der FrdB-Unterheit der Fumaratreduktase mit ihren drei Eisen-Schwefelclustern ([2Fe-2S], [4Fe-4S] sowie [3Fe-4S]) (Cecchini *et al.*, 2002; Niehaus *et al.*, 1991). Solche Eisen-Schwefel-Kluster dienen in großen, zum

Teil membranassoziierten Redoxsystemen dem Elektronentransport über größere Distanzen (mehr als 30 Å) (Hudson *et al.*, 2005). Vor diesem Hintergrund ist zudem eine funktionelle Bedeutung des mutmaßlichen Ferredoxins *Stm1733* am Elektronentransport denkbar. Auch bei Ferredoxinen erfolgt die Fixation der Elektronen in Eisen-Schwefel-Klustern. Die Ko-Lokalisation von *stm1733* und *ompW*, die in beiden *Salmonellen*-Spezies, in allen Subspezies und Serovar-übergreifend nachgewiesen werden konnte, könnte demnach eine funktionelle Bedeutung haben. Eine gemeinsame Regulation von *stm1733* und *ompW* ist trotz entgegengesetzter Orientierung der Gene im Genom über bidirektionale Promotoren denkbar. Eine solche divergente Organisation von Promotoren führt zu einer Regulation auf Ebene der Transkription infolge von Interaktionen zwischen der DNS-abhängigen RNS-Polymerase und den jeweiligen Promotoren. Insbesondere bei Genen, deren Translationsprodukte in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander exprimiert werden müssen, spielen bidirektionale Promotoren eine Rolle (Beck & Warren, 1988). Bedeutung haben derartige Promotoren daher zum Beispiel bei Fur-regulierten, eisenabhängig-exprimierten Proteinen (Christoffersen *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 1994; Tsolis *et al.*, 1995). Unter den Porinen sind bidirektionale Promotoren für die Gene *ompC* und *micF* sowie *malEFG-K* und *lamB* beschrieben (Bedouelle, 1983; Mizuno *et al.*, 1984; Silhavy *et al.*, 1979). Die Transkriptionsstartpunkte der Gene liegen hier 172 bzw. 270 Nukleotide voneinander entfernt (Beck & Warren, 1988). Bei *E. coli* konnten jedoch bidirektionale Promotoren identifiziert werden, deren Transkriptionsstarts bis zu 513 Nukleotide und deren Translationsstarts bis zu 611 Nukleotide voneinander entfernt lagen (Beck & Warren, 1988). Die Transkriptionsstarts von *ompW* und *stm1733* liegen im Chromosom von *S. Tm. LT2* jedoch nur 316 Nukleotide auseinander. Vor diesem Hintergrund ist das Vorhandensein von bidirektionalen Promotoren im *stm1733-ompW-katN*-Lokus ein möglicher Mechanismus für eine gemeinsame Regulation dieser Gene.

Widerstandsfähigkeit gegen Chemotherapeutika

Resistenzen von *Salmonella*-Feldisolaten gegen unterschiedliche Chemotherapeutika konnten in der Vergangenheit über Proteinanalysen mehrfach auf den Verlust klassischer Porine zurückgeführt werden (Armand-Lefevre *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 1987; Toro *et al.*, 1990). Chemotherapeutika wie Beta-Laktame, Tetracykline, Chloramphenicol und Fluoroquinolone können aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Ladungsverteilungen klassische Porine zur Überwindung der äußeren Membran nutzen (Nikaido, 2003). In einem *Pseudomonas*-Isolat resultierte die Herunterregulation des *OmpW*-Homologs *OprG* und der Verlust eines nicht identifizierten 40 kDa OMPs in einer erhöhten Resistenz gegen Fluoroquinolone, Beta-Laktam-Antibiotika, Tetracyclin und Chloramphenicol (Chamberland *et al.*, 1989). Interessanterweise zeigte der *OmpW*-defiziente Stamm SARC9 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika aus genau denselben Substanzklassen. Die Beobachtung, dass der Verlust von *OmpW* aber zu einer erhöhten Sensibilität und nicht zu einer Resistenz führte (wie bei Verlust von Porinen sonst zu beobachten), passt zu Beobachtungen bei anderen Bakteriengenera, dass die Hochregulation und nicht die Herunterregulation

der Expression von OmpW-homologen Proteinen mit einem resistenten Phänotyp verbunden war (Peng *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Diese Tatsache könnte bedeuten, dass OmpW möglicherweise keine einfache Diffusionspore, sondern Bestandteil eines Effluxsystemes ist, oder aber, dass die beobachtete Veränderung der Sensibilität kein direkter OmpW-vermittelter Effekt, sondern ein indirekter Effekt über einen ko-regulierten Effektor ist. Eine reziproke Ko-Regulation erfolgt bei *S. Tm.* über das Zwei-Komponentensystem BaeSR zwischen OmpW und dem OmpX-ähnlichen Protein Stm3031, allerdings sind für Stm3031 keine Porineigenschaften bekannt (Hu *et al.*, 2005). Die erhöhte Empfindlichkeit von SARC9 gegen eine Vielzahl der getesteten Chemotherapeutika kann aber nach den bisherigen Untersuchungen nicht auf das alleinige Fehlen von OmpW zurückzuführen sein, da *S. Tm.* SL1344 und seine *ompW*-Knockout-Mutante lediglich für einige Cephalosporine signifikante Unterschiede in ihrer Chemosensitivität aufwiesen. Cephalosporine und andere Beta-Laktam-Antibiotika werden ausschließlich durch klassische Porine in das Bakterium aufgenommen, weshalb ein Porinverlust zu einer gesteigerten Resistenz führen kann (Bakken *et al.*, 1987; Medeiros *et al.*, 1987; Nikaido, 2001, 2003; Raimondi *et al.*, 2001). Für *E. coli* ist dieser Mechanismus zur Erlangung von Cephalosporin-Resistenzen sehr bedeutend (Bakken *et al.*, 1987). In der vorliegenden Arbeit konnte der in einer anderen Studie vermutete Zusammenhang zwischen spezifischer Resistenz gegen das Cephalosporin Ceftriaxon und verminderter OmpW-Expression von *S. Tm.* nicht bestätigt werden (Hu *et al.*, 2005). Hierbei ist zu beachten, dass das Fehlen einzelner Porine häufig nur geringe Effekte auf die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika hat (Änderungen der minimalen Hemmkonzentration um weniger als Faktor zwei), selbst wenn die Aufnahme der Wirkstoffe über Porine der einzige Aufnahmemechanismus ist (Harder *et al.*, 1981). Der Grund dafür ist, dass die Gesamtheit der durch Porine und energieabhängige Effluxsysteme vermittelten Effekte die Sensibilität bzw. die Widerstandsfähigkeit eines Keimes bestimmt (Nikaido, 2001). Deshalb wäre es bei weiteren Untersuchungen zum Einfluss von OmpW auf die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika sinnvoll, zunächst die Effluxmechanismen zu blocken, um dann OmpW- bzw. Porin-spezifische Effekte besser detektieren zu können. Eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und damit eine Blockade von aktiven Transportern kann über Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) oder Phenylalanyl-Arginin-β-Naphtylamid (PAβN) erfolgen (George, 1996; Hasdemir *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1997; Nikaido, 2001; Thanassi *et al.*, 1997). Darüber hinaus könnten kombinierte Knockout-Mutanten, die für OmpW und eines oder mehrere der Hauptporine OmpC, OmpD, OmpF und PhoE defizient sind, weiteren Aufschluss über die Rolle von OmpW bei der Antibiotikaresistenz geben. Eine zumindest teilweise Blockade von Porinen kann auch durch die Zugabe von Polyaminen wie Putrescin, Spermidin, Spermin oder Cadaverin im Nährmedium erfolgen (Basle & Delcour, 2001; Dela Vega & Delcour, 1995, 1996; Iyer & Delcour, 1997; Iyer *et al.*, 2000; Samartzidou & Delcour, 1999a, 1999b). Derartige Porinblocker sind allerdings nicht selektiv, weshalb eine spezifische Blockade einzelner Porine nicht möglich ist.

Eigenschaften der Membranstabilität

Die Sensitivitätstests gegen Chemotherapeutika verfolgten nicht nur das Ziel, Porineigenschaften von OmpW nachzuweisen, sondern sie dienten auch zur Charakterisierung der Membranstabilität gegenüber membranaktiven Chemotherapeutika. Kationische Peptide wie Polymyxin B und Colistin interagieren mit den polyanionischen Anteilen des LPS. Die zwischen den LPS-Molekülen befindlichen divalenten Magnesium- und Kalziumionen werden durch polykationische Peptidantibiotika, aber auch durch Aminoglykoside gebunden und dem LPS-Gerüst entzogen. Da diese divalenten Anionen das LPS-Gerüst über ionische Bindungen stabilisieren, führt der Einfluss polykationischer Wirkstoffe zu lokalen Störungen in der LPS-Struktur und somit zur Destabilisierung der äußeren Membran (Hancock, 1981; Hancock *et al.*, 1981b; Hancock *et al.*, 1991). Auch während des Infektionszyklus sehen sich Salmonellen ähnlichen Bedingungen ausgesetzt, denn die niedrigen Molaritäten von divalenten Anionen in phagozytären Vakuolen führen zu einem Verlust von Anionen aus dem LPS-Layer, so dass sich dieses Milieu ebenfalls membrandestabilisierend auswirkt (Bader *et al.*, 2003; Garcia-del Portillo *et al.*, 1992). Alterationen in der LPS-Zusammensetzung durch Substitutionen linearer Kohlenstoffketten in Form von Acylierungen oder Palmitoylierungen kompensieren diesen Stabilitätsverlust, indem sie van-der-Waals-Bindungskräfte stärken. Diese Veränderungen der LPS-Zusammensetzung führen darüber hinaus zu einer herabgesetzten Membranpermeabilität und einer erhöhten Resistenz gegen kationische Peptid-Antibiotika wie Polymyxin B oder Colistin (Kawasaki *et al.*, 2007; Merighi *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2006; Perez & Groisman, 2007). Die Palmitoyltransferase PagP von *Salmonella* ist eines der an Modifikationen des LPS beteiligten Enzyme (Bishop, 2005). PagP teilt sich mit OmpW zahlreiche strukturelle Gemeinsamkeiten wie z. B. den Aufbau als 8-strängiges Beta-Faltblatt-Fass, eine durch Prolinreste stabilisierte laterale Diskontinuität in der Porenwand, die für klassische Porine untypische Ladungsverteilung im Porenlumen sowie eine Detergenzbindungsstelle, die physiologischer Weise eine Acylbindungstasche darstellt (Bishop, 2005). Trotz gewisser struktureller Gemeinsamkeiten von OmpW mit PagP konnte ein Zusammenhang zwischen der Membranstabilität gegenüber kationischen Peptiden und dem Vorhandensein von OmpW in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Neben den kationischen Peptiden ist auch die Substanzklasse der Aminoglykoside den polykationischen Verbindungen zuzurechnen. Aminoglykoside führen durch Membran-Destabilisierung zu einer selbst induzierten Aufnahme in die Bakterienzelle (1981a; 1981b; Hancock *et al.*, 1991). Die getesteten Aminoglykoside zeigten in den durchgeführten Versuchen keine unterschiedliche Wirksamkeit bei Stämmen bzw. Mutanten mit *ompW* und solchen ohne. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen von OmpW die LPS-LPS-Interaktion und die damit verbundene Stabilität der äußeren Membran nicht beeinträchtigt.

Eine zweite Möglichkeit zur Messung der Membranintegrität ist die Überprüfung der Empfindlichkeit gegenüber Detergentien (Alakomi *et al.*, 2000; Cascales *et al.*, 2002; Sha *et al.*, 2004). Detergenzmoleküle sind ähnlich den Phospholipiden biologischer Membranen aus einem polaren und einem lipophilen Anteil zusammengesetzt. Detergenzien neigen daher zur Bildung von Micellen, d. h. Aggregaten geordneter Detergenzmoleküle, in denen die hydrophilen Anteile nach außen und die hydrophoben Anteile nach innen gerichtet sind. Detergenzmicellen sind in ihren Eigenschaften denen biologischer Membranen sehr ähnlich (Lottspeich, 1998). Unter dem Einfluss von Detergenzmicellen kommt es zu einer Solubilisierung von Membranproteinen und Phospholipiden aus der äußeren Membran und so zu einem Integritätsverlust. Sensitivitätsassays gegen das anionische Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 dienten der Überprüfung, inwieweit das Fehlen von OmpW die Membranstabilität beeinflusst. Die in den durchgeführten Tests für die *S. Tm.*-Stämme ermittelten SDS- bzw. Triton X-100-Konzentrationen, die nötig waren, um die Keimdichte um die Hälfte zu senken, entsprachen den Werten aus einer vergleichbaren Studie an *S. Tm.* Stamm 14028 (Sha *et al.*, 2004). Die Untersuchungen zeigten, dass die äußeren Membranen von *S. Tm.* SL1344 und seiner isogenen *ompW*-Knockout-Mutante in gleichem Maße hochgradig stabil gegen die beiden Detergentien waren. Der *S. Marina*-Stamm SARC9 verhielt sich im Vergleich zu den OmpW-exprimierenden *S. Marina*-Stämmen intermediär. Die beobachtete erhöhte Empfindlichkeit von SARC9 gegenüber saurem pH, hoher Osmolarität und reaktiven Sauerstoffmetaboliten ist demnach nicht auf eine erhöhte Instabilität der äußeren Membran zurückzuführen.

Adhäsion, Invasion und intrazelluläres Überleben

Die große Anzahl an acht-strängigen Beta-Faltblatt-Proteinen, für die eine Funktion als Adhäsions- oder Virulenzfaktor beschrieben ist, legt die Vermutung nahe, dass auch OmpW ein virulenzassoziiertes Protein sein könnte (Kapitel 2.3.3). Aber auch Porine, die primär Funktionen von Diffusionsporen innehaben, sind oft wichtige Strukturen für die Adhärenz an und die Invasion in Wirtszellen sowie das intrazelluläre Überleben in Fresszellen des Wirtsorganismus. Klassische Porine wie zum Beispiel OmpC und OmpD vermitteln bei *S. Tm.* Adhärenz an Epithelzellen und humane Makrophagen (Hara-Kaonga & Pistole, 2004; Negm & Pistole, 1998, 1999). OmpD vermittelt bei *Salmonella* spp. die Fähigkeit nicht-menschliche Wirte zu infizieren, so dass das Fehlen von OmpD im Serovar *S. Typhi* mit einer Wirtsspezifität für den Menschen einhergeht (Santiviago *et al.*, 2001; 2003). Für das Gen des klassischen Porins *phoE* von *S. Tm.* konnte eine Aktivierung des Promotors im Zuge der Invasion nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von PhoE hatte aber trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu OmpC und OmpD keinen Einfluss auf Adhäsion, Invasion und intrazelluläres Überleben in Hep-2 Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen J744-Zellen (Janssen *et al.*, 1995). Auch das langsame Porin OmpA von *E. coli* spielt bei der Adhärenz an Epithelzellen, aber auch bei der Aufnahme in murine und humane Makrophagen und bei der intrazellulären Replikation eine Schlüsselrolle (Sukumaran *et al.*, 2003). Um eine mögliche Beteiligung von OmpW an der Vermittlung von Virulenzeigenschaften

beschreiben zu können, sind Versuche im Mausinfektionsmodell nötig. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Serovar *S. Tm.* löst in Mäusen Typhus-ähnliche Erscheinungen aus und ist daher für solche Infektionsversuche geeignet (Santos *et al.*, 2001). Im Vorfeld zur Messung der Infektiosität in Mäusen sollten zunächst Eigenschaften wie Adhäsion, Invasion und intrazelluläres Überleben im Zellkulturmodell charakterisiert werden. Die in der vorliegenden Studie durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen humaner LoVo-Epithelzellen brachten jedoch keinen Hinweis auf eine Rolle von OmpW als Adhäsion. Diese Ergebnisse passen zu der Beobachtung, dass aufgereinigtes OmpW von *E. coli* nicht an humane Ileocaecal-Zellen zu binden vermochte (Mammarappallil & Elsinghorst, 2000). Die Ergebnisse der Zellkulturassays zum intrazellulären Überleben in murinen Makrophagen der Linie J.774A.1 zeigten ebenfalls keine Beeinflussung durch OmpW und stimmten mit den Ergebnissen der *in vitro*-Wachstumsversuche unter dem reaktiven Einfluss von Methylviologen überein. Die Tatsache, dass OmpW-homologe Proteine unter dem Einfluss der verschiedensten Stressfaktoren hochreguliert werden, scheint für das Überleben im Phagosom von Makrophagen demnach ohne Bedeutung zu sein.

Bei *Vibrio cholerae*, einem Pathogen, bei dem OmpW als Virulenzfaktor angesehen wird, ist eine stark unterschiedliche Expression von OmpW verbunden mit einer unterschiedlichen Kolonisationsfähigkeit im Maus-Infektionsmodell. Die OmpW-abhängige Kolonisationsfähigkeit in den Mäusen war dabei abhängig vom verwendeten Serovar (Nandi *et al.*, 2005). Daten zur Adhäsion und Invasion im Zellkulturmodell liegen für *Vibrio cholerae* derzeit leider nicht vor. Vor dem Hintergrund, dass auch bei Salmonellen starke Unterschiede in der OmpW-Expression festzustellen waren, ist es möglich, dass hier ebenfalls eine serovarabhängige Beteiligung von OmpW an Adhäsion und Invasion besteht. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass das OmpW-Expressionslevel von *S. Tm.* SL1344 im Vergleich zu den anderen Salmonellen-Stämmen auf einem mittleren Niveau lag, so dass sich fehlende phänotypische Unterschiede zwischen OmpW-positiven und OmpW-negativen Stämmen nicht auf ein niedriges OmpW-Expressionsniveau von *S. Tm.* SL1344 zurückführen lassen. Anhand der vorliegenden Daten aus den Zellkulturversuchen lässt sich keine Beteiligung von OmpW an Adhäsions- und Invasionsmechanismen ableiten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die komplexen Bedingungen im Wirtsorganismus Maus durch die Zellkulturtests nur partiell widerspiegelt werden können und damit Infektionsversuche nicht ersetzen können. Zur Messung der Virulenz sollten Monoinfektionen mit der *ompW*-Knockout-Mutante sowie kompetitive Infektionsversuche unternommen werden, in denen der SL1344-Wildtyp und seine *ompW*-Knockout-Mutante zusammen verabreicht werden, wodurch sie in ihrer Vermehrungsfähigkeit *in vivo* direkt miteinander verglichen werden können (Nandi *et al.*, 2005).

Schlussfolgerungen

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass OmpW aufgrund der weiten Verbreitung im Genus *Salmonella* eine wichtige Funktion für Salmonellen zu haben scheint, aber kein essentieller Vitalfaktor ist. Mehrere Untersuchungen bezüglich Struktur, Expression und Funktion von OmpW-homologen Proteinen und die eigenen Ergebnisse zur Funktion von OmpW bei Salmonellen legen die Vermutung nahe, dass OmpW die äußere-Membran-Komponente eines Fumarat-/Succinat-Redoxsystemes sein könnte. Diese These stützt sich auf folgende Befunde: OmpW besitzt die strukturellen Voraussetzungen für ein Kohlenhydrat-spezifisches Porin. OmpW unterliegt der Regulation durch RpoE, wie sie für den Kohlenhydratstoffwechsel sekundärer Kohlenstoffquellen von Salmonellen bekannt ist (Kenyon *et al.*, 2005). OmpW bildet Proteinkomplexe mit Proteinen des Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsels (Huang *et al.*, 2006). Die Eisenabhängigkeit der OmpW-Expression ist eine mögliche Folge der Ko-Expression mit der Fumaratreduktase, die aufgrund des hohen Gehaltes an Eisen-Schwefelclustern eisenabhängig exprimiert wird (Hudson *et al.*, 2005; Niehaus *et al.*, 1991). Eine Nutzung von Succinat als sekundäre Kohlenstoffquelle ist der *ompW*-Knockout-Mutante von *S. Tm.* SL1344 nicht möglich und es besteht gleichzeitig eine verminderte Toleranz dieser Mutante gegenüber hohen Azetatkonzentrationen im Vergleich zum OmpW exprimierenden SL1344-Stamm.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteine der äußeren Membran von Salmonellen sind geeignete Targetstrukturen für diagnostische, therapeutische oder immunprophylaktische Anwendungen. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, das Vorkommen des äußeren-Membran-Proteins W (OmpW) von *Salmonella* spp. erstmals systematisch zu untersuchen. Des Weiteren sollte mittels einer isogenen *ompW*-Knockout-Mutante beleuchtet werden, inwieweit OmpW ein essentieller Vitalfaktor für Salmonellen ist. Im Einzelnen sollte nach Hinweisen gesucht werden, welche biologische Bedeutung OmpW für Salmonellen hat und welchen Einfluss das Fehlen von OmpW auf die Fitness der Salmonellen unter verschiedenen Milieueinflüssen ausübt.

Eine repräsentative Auswahl an 100 Salmonellen-Stämmen aus beiden Spezies, allen Subspezies und 19 verschiedenen O-Gruppen sowie 60 Bakterienstämmen aus 24 anderen Bakteriengenera wurden auf das Vorhandensein des Gens *ompW* mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung untersucht. Das *ompW*-Gen ließ sich bei allen untersuchten *Salmonella*-Serovaren nachweisen. Es war bei allen untersuchten Stämmen chromosomal lokalisiert und stets im gleichen Genlokus zwischen den Genen *stm1733* und *katN* organisiert. Immuno-Blot-Analysen mit einem eigens hergestellten OmpW-spezifischen Hyperimmunserum zeigten, dass OmpW *in vitro* von allen Salmonellen exprimiert wurde, allerdings schwankte das Expressionsniveau etwa um den Faktor zehn. Als einziger Salmonellen-Stamm konnte *S. Marina* SARC9 als natürliche *ompW*-Deletionsmutante identifiziert werden, die aufgrund einer 614 bp großen Deletion das OmpW-Protein nicht bilden kann. *ompW*-homologe Nukleotid-Sequenzen konnten auch in anderen Enterobakterien der Genera *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Serratia* detektiert werden. Die Hybridisierung der *ompW*-Gensonde mit chromosomaler DNS von *Clostridium sporogenes* NCTC532 in Dot-Blot- und Southern-Blot-Analysen deutet erstmals auf eine *ompW*-homologe Gensequenz bei einem Gram-positiven Bakterium hin. Nur bei den Salmonellen flankierten die Gene *stm1733* und *katN* das *ompW*-Gen, so dass diese Anordnung nach bisherigen Analysen für Salmonellen spezifisch ist.

Die Existenz der natürlichen *ompW*-Deletionsmutante SARC9 und die erfolgreiche Herstellung der *ompW*-Knockout-Mutante von *Salmonella* Typhimurium Stamm SL1344 zeigten, dass das Fehlen von OmpW für Salmonellen kein Letalfaktor ist. Der SL1344-Stamm und seine isogene *ompW*-Knockout-Mutante sowie die Deletionsmutante SARC9 und vier OmpW-positive *S. Marina*-Stämme wurden phänotypisch bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften charakterisiert, um Hinweise auf die biologische Funktion von OmpW zu erhalten. Eine Bedeutung von OmpW für die Vitalität von *S. Tm.* konnte bei Anzuchtverfahren in Nährmedien mit hoher Osmolarität, niedrigem pH, limitiertem Eisenangebot oder oxidativem Stress nicht festgestellt werden. Ebenso war weder eine veränderte Sensitivität gegenüber den membrandestabilisierenden Detergentien Triton X-100 und Natrium-Dodecylsulfat noch gegenüber 24 verschie-

denen Chemotherapeutika in Abhängigkeit von der OmpW-Expression festzustellen. Insbesondere konnte ein Einfluss von OmpW auf die Sensitivität der Salmonellen gegenüber Ampicillin, Tetrazyklin und Ceftriaxon mittels Agardiffusionstests und Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen im Mikrobouillondilutionstest widerlegt werden, obwohl derartige Eigenschaften für OmpW von *S. Typhimurium* beziehungsweise für OmpW-homologe Proteine anderer Bakterien vermutet worden waren. Anzuchtversuche mit den isogenen Salmonellen-Stämmen in M9-Ca-Mangelmedien lieferten erstmals Hinweise für einen Einfluss von OmpW auf das Wachstumsverhalten in Kohlenhydratmangelsituationen. Die Supplementierung von 2 % Natriumazetat führte zu einem leicht gesteigerten, der Zusatz von 0,6 % Di-Natrium-Succinat sogar zu einem etwa 40 % stärkeren Wachstum von SL1344 gegenüber seiner *ompW*-Knock-out-Mutante. Hinweise auf eine Bedeutung von OmpW als bakterielles Adhäsion konnten anhand von Zellkulturversuchen nicht gefunden werden, wenngleich eine Funktion bei der Ausbildung von Virulenzeigenschaften für das OmpW-Homolog von *Vibrio cholerae* vermutet wird.

Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass OmpW Eigenschaften eines Porins besitzt und ein Fehlen von OmpW die Bereitstellung und damit die Metabolisierung der sekundären Kohlenstoffquellen Azetat und Succinat beeinträchtigt. OmpW könnte die äußere-Membran-Komponente eines Redoxsystems im Kohlenhydratstoffwechsel von Salmonellen sein. Eine derartige Funktion von OmpW würde auch gut die bei *E. coli* beobachtete Ausbildung von Proteinkomplexen zwischen OmpW, der Fumaratreduktase und weiteren Proteinen des Kohlenhydratstoffwechsels erklären.

7 SUMMARY

Proteins of the outer membrane of *Salmonella* spp. are promising target structures for diagnostic applications, therapeutic treatment and development of new vaccines. The objective of the present study was to investigate systematically to what extent the outer membrane protein W (OmpW) is present among salmonellae. Furtheron, an isogenic *ompW* knockout mutant should elucidate the influence of OmpW on the vitality of salmonellae. In particular, we searched for hints about the biological role of OmpW and what influence the loss of OmpW has on the survival and fitness of salmonellae in different environmental conditions.

A representative collection of 100 different *Salmonella* strains representing both species, all subspecies and 19 distinct O-groups as well as 60 other Gram-negative and Gram-positive strains belonging to 24 different bacterial genera were analysed for the presence of the *ompW*-gene by PCR and DNA-DNA hybridization. The *ompW*-gene was detected in all but one *Salmonella* strains independently on their belonging to a serovar. In all examined *Salmonella* strains the *ompW* gene was localized on the chromosome between the genes *stm1733* and *katN*. Immuno-Blot assays with a generated OmpW-specific hyperimmune serum revealed that OmpW was expressed by all *ompW* positive strains *in vitro*. However, expression levels differed from strain to strain up to the factor ten. Nucleotid sequencing proved the only *ompW* negative *Salmonella* strain, *S. Marina* strain SARC9, as a natural *ompW* deletion mutant which carried a 614 bp deletion at the *ompW*-*katN*-locus. These results show that OmpW is present among salmonellae independently from the serovar. *OmpW* homologous sequences were detected also in other enterobacteria like *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* and *Serratia*. Hybridization of the *ompW*-probe with chromosomal DNA of *Clostridium sporogenes* NCTC532 performed as Dot-Blot- and Southern-Blot assays detected for the first time an *ompW* homologous sequence in Gram-positive bacteria. However, only in salmonellae the *ompW* gene was flanked by the genes *stm1733* and *katN*. Therefore, this genetic arrangement seems to be unique in salmonellae.

The existence of a natural *ompW* deletion mutant and the successful generation of an *ompW* knockout mutant of *Salmonella* Typhimurium strain SL1344 demonstrated that the loss of OmpW is not lethal for salmonellae. The strain SL1344, its isogenic *ompW* knockout mutant as well as the natural *ompW* deletion mutant SARC9 and four OmpW expressing *S. Marina* strains were compared for their growth characteristics in order to elucidate the biological function of OmpW. These experiments revealed that OmpW had no significant effect on growth of *Salmonella* at high osmolarity, low pH-values, limited iron availability and under oxidative stress. Sensitivity of the strains against the membrane destabilizing detergents Triton X-100 and sodium-dodecylsulfate or against 24 different antibiotics did not change with the absence/presence of *ompW*. In particular, we vitiated a relationship between the OmpW expression and change in sensitivity of salmonellae against ampicillin, tetracycline and ceftriaxone by agar-

diffusion assays and by bouillondilution assays. Such a relationship was suspected for OmpW of *S. Typhimurium* and OmpW homologues of other bacteria, respectively. Furthermore, tissue culture assays could not demonstrate OmpW being a bacterial adhesin or intracellular survival factor which is in contrast to suggestions by other investigators who observed a positive effect of OmpW on the virulence of *Vibrio cholerae*. However, we observed for the first time that OmpW had an effect on the growth of *S. Tm.* SL1344 in M9-Ca minimal medium under carbohydrate limited conditions. Thus, supplementation of the medium with of 2 % sodium acetate resulted in a slightly better growth and addition of 0.6 % di-sodium succinate even in an about 40 % increased growth of the SL1344 wildtype strain in comparison to its *ompW* knockout mutant.

These observations support the hypothesis that the OmpW is a porin and that the loss of OmpW constricts the uptake and the metabolism of secondary carbon sources like acetate or succinate. OmpW could be the outer membrane component of a redox system in the carbohydrate metabolism of salmonellae. Such a function of OmpW in *Salmonella* would correspond to the observation that the OmpW of *E. coli* associates with fumarate reductase and some other proteins of the carbohydrate metabolism to form protein complexes.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ACHOUAK, W., HEULIN, T. & PAGES, J. M. 2001. Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* (199), 1-7.
- ACIMOVIC, Y. & COE, I. R. 2002. Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* (19), 2199-2210.
- ACKERLEY, D. F., BARAK, Y., LYNCH, S. V., CURTIN, J. & MATIN, A. 2006. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* (188), 3371-3381.
- ADRIAENSEN, C., DE GREVE, H., TIAN, J. Q., DE CRAEYE, S., GUBBELS, E., EECKHAUT, V., VAN IMMERSEEL, F., DUCATELLE, R., KUMAR, M. & HERNALSTEENS, J. P. 2007. Live *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine allowing serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Infect. Immun.* (ahead of print).
- AHN, V. E., LO, E. I., ENGEL, C. K., CHEN, L., HWANG, P. M., KAY, L. E., BISHOP, R. E. & PRIVE, G. G. 2004. A hydrocarbon ruler measures palmitate in the enzymatic acylation of endotoxin. *Embo. J.* (23), 2931-2941.
- ALAKOMI, H. L., SKYTТА, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K. & HELANDER, I. M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* (66), 2001-2005.
- ALBRECHT, R., ZETH, K., SODING, J., LUPAS, A. & LINKE, D. 2006. Expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the outer membrane protein OmpW from *Escherichia coli*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* (62), 415-418.
- ALEXANDER, D. M. & JOHN, A. C. 1994. Characterization of the carbon starvation-inducible and stationary phase-inducible gene *slp* encoding an outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (11), 1059-1071.
- ALPERMANN, I. (2000). Bestimmung der serologischen Kreuzreaktivität von LPS und Äussere-Membran-Proteinen der Serovare Gallinarum, Enteritidis und Typhimurium von *Salmonella enterica* Subspezies *enterica*. Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen.
- ALURKAR, V. & KAMAT, R. 1997. Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* (65), 2382-2388.
- AMAVISIT, P., BROWNING, G. F., LIGHTFOOT, D., CHURCH, S., ANDERSON, G. A., WHITHEAR, K. G. & MARKHAM, P. F. 2001. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. *Vet. Microbiol.* (79), 63-74.
- ANDERSEN, C., CSEH, R., SCHULEIN, K. & BENZ, R. 1998. Study of sugar binding to the sucrose-specific ScrY channel of enteric bacteria using current noise analysis. *J. Membr. Biol.* (164), 263-274.
- ARMAND-LEFEVRE, L., LEFLON-GUIBOUT, V., BREDIN, J., BARGUELLIL, F., AMOR, A., PAGES, J. M. & NICOLAS-CHANOINE, M. H. 2003. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* (47), 1165-1168.
- ARORA, A., RINEHART, D., SZABO, G. & TAMM, L. K. 2000. Refolded OmpA of *Escherichia coli* forms ion channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* (275), 1594-1600.

- BABA, T., ARA, T., HASEGAWA, M., TAKAI, Y., OKUMURA, Y., BABA, M., DATSENKO, K. A., TOMITA, M., WANNER, B. L. & MORI, H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* (2), 2006-2008.
- BADER, M. W., NAVARRE, W. W., SHIAU, W., NIKAIDO, H., FRYE, J. G., MCCLELLAND, M., FANG, F. C. & MILLER, S. I. 2003. Regulation of *Salmonella* Typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* (50), 219-230.
- BAKKEN, J. S., SANDERS, C. C. & THOMSON, K. S. 1987. Selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*: association with changes in outer membrane protein. *J. Infect. Dis.* (155), 1220-1225.
- BALDERMANN, C., LUPAS, A., LUBIENIECKI, J. & ENGELHARDT, H. 1998. The regulated outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded beta-sheet proteins by its sequence and properties. *J. Bacteriol.* (180), 3741-3749.
- BALDERMANN, C. & ENGELHARDT, H. 2000. Expression, two-dimensional crystallization, and three-dimensional reconstruction of the beta8 outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans*. *J. Struct. Biol.* (131), 96-107.
- BARANOVA, N. & NIKAIDO, H. 2002. The *baeSR* two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* (184), 4168-4176.
- BARONDESS, J. J. & BECKWITH, J. 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage *lambda*. *Nature* (346), 871-874.
- BARTH, S. (2003). Untersuchungen zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica*. Dissertationsschrift. Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen.
- BASLE, A. & DELCOUR, A. H. 2001. Effect of two polyamine toxins on the bacterial porin OmpF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (285), 550-554.
- BATISSON, I., GUIMOND, M. P., GIRARD, F., AN, H., ZHU, C., OSWALD, E., FAIRBROTHER, J. M., JACQUES, M. & HAREL, J. 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (71), 4516-4525.
- BAUDIN, A., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., DENOUEL, A., LACROUTE, F. & CULLIN, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* (21), 3329-3330.
- BAUERFEIND, R. (1999). Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des Lipopolysaccharids bei der Immunabwehr und beim Nachweis von *Salmonella enterica*-Infektionen. Dissertationsschrift. Fachbereich Veterinärmedizin, Gießen.
- BECK, C. F. & WARREN, R. A. 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* (52), 318-326.
- BEDOUELLE, H. 1983. Mutations in the promoter regions of the *malEFG* and *malK-lamB* operons of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology* (170), 861-882.
- BEHLAU, M., MILLS, D. J., QUADER, H., KUHLEBRANDT, W. & VONCK, J. 2001. Projection structure of the monomeric porin OmpG at 6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* (305), 71-77.
- BELLIDO, F., MARTIN, N. L., SIEHNEL, R. J. & HANCOCK, R. E. 1992. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* (174), 5196-5203.

- BENZ, R. & BAUER, K. 1988. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. Eur. J. Biochem. (176), 1-19.
- BENZ, R., SCHMID, A., MAIER, C. & BREMER, E. 1988. Characterization of the nucleoside-binding site inside the Tsx channel of *Escherichia coli* outer membrane. Reconstitution experiments with lipid bilayer membranes. Eur. J. Biochem. (176), 699-705.
- BENZ, R. 1994. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. Biochim. Biophys. Acta (1197), 167-196.
- BINA, J., ZHU, J., DZIEJMAN, M., FARUQUE, S., CALDERWOOD, S. & MEKALANOS, J. 2003. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (100), 2801-2806.
- BISHOP, R. E. 2005. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. Mol. Microbiol. (57), 900-912.
- BJARNASON, J., SOUTHWARD, C. M. & SURETTE, M. G. 2003. Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. J. Bacteriol. (185), 4973-4982.
- BLACK, P. N., SAID, B., GHOSH, C. R., BEACH, J. V. & NUNN, W. D. 1987. Purification and characterization of an outer membrane-bound protein involved in long-chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. (262), 1412-1419.
- BLACK, P. N. 1991. Primary sequence of the *Escherichia coli* *fadL* gene encoding an outer membrane protein required for long-chain fatty acid transport. J. Bacteriol. (173), 435-442.
- BOLOTIN, A., QUINQUIS, B., SOROKIN, A. & EHRlich, D. S. 2004. Recent genetic transfer between *Lactococcus lactis* and enterobacteria. J. Bacteriol. (186), 6671-6677.
- BOLTER, B. & SOLL, J. 2001. Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? Embo. J. (20), 935-940.
- BOND, P. J., FARALDO-GOMEZ, J. D. & SANSOM, M. S. 2002. OmpA: a pore or not a pore? Simulation and modeling studies. Biophys. J. (83), 763-775.
- BOND, P. J., FARALDO-GOMEZ, J. D., DEOL, S. S. & SANSOM, M. S. 2006. Membrane protein dynamics and detergent interactions within a crystal: a simulation study of OmpA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (103), 9518-9523.
- BOYCE, J. D., CULLEN, P. A., NGUYEN, V., WILKIE, I. & ADLER, B. 2006. Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. Proteomics (6), 870-880.
- BREDIN, J., SIMONET, V., IYER, R., DELCOUR, A. H. & PAGES, J. M. 2003. Colicins, spermine and cephalosporins: a competitive interaction with the OmpF eyelet. Biochem. J. (376), 245-252.
- BREMER, E., MIDDENDORF, A., MARTINUSSEN, J. & VALENTIN-HANSEN, P. 1990. Analysis of the *tsx* gene, which encodes a nucleoside-specific channel-forming protein (Tsx) in the outer membrane of *Escherichia coli*. Gene (96), 59-65.
- BRINKMAN, F. S., BAINS, M. & HANCOCK, R. E. 2000. The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. J. Bacteriol. (182), 5251-5255.

- BUCAREY, S. A., VILLAGRA, N. A., MARTINIC, M. P., TROMBERT, A. N., SANTIVIAGO, C. A., MAULEN, N. P., YOUNDERIAN, P. & MORA, G. C. 2005. The *Salmonella enterica* serovar Typhi *tsx* gene, encoding a nucleoside-specific porin, is essential for prototrophic growth in the absence of nucleosides. *Infect. Immun.* (73), 6210-6219.
- BUCAREY, S. A., VILLAGRA, N. A., FUENTES, J. A. & MORA, G. C. 2006. The cotranscribed *Salmonella enterica* sv. Typhi *tsx* and *impX* genes encode opposing nucleoside-specific import and export proteins. *Genetics* (173), 25-34.
- BUCHMEIER, N., BOSSIE, S., CHEN, C. Y., FANG, F. C., GUINEY, D. G. & LIBBY, S. J. 1997. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella* Typhimurium, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infect. Immun.* (65), 3725-3730.
- BUTTON, J. E., SILHAVY, T. J. & RUIZ, N. 2006. A suppressor of cell death caused by the loss of *sigmaE* downregulates extracytoplasmic stress responses and outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (189), 1523-1530.
- CASCALES, E., BERNADAC, A., GAVIOLI, M., LAZZARONI, J. C. & LLOUBES, R. 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J. Bacteriol.* (184), 754-759.
- CECCHINI, G., SCHRODER, I., GUNSALUS, R. P. & MAKLASHINA, E. 2002. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* (1553), 140-157.
- CHAMBERLAND, S., BAYER, A. S., SCHOLLAARDT, T., WONG, S. A. & BRYAN, L. E. 1989. Characterization of mechanisms of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated *in vitro* and *in vivo* during experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* (33), 624-634.
- CHANG, D. E., SMALLEY, D. J., TUCKER, D. L., LEATHAM, M. P., NORRIS, W. E., STEVENSON, S. J., ANDERSON, A. B., GRISSOM, J. E., LAUX, D. C., COHEN, P. S. & CONWAY, T. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (101), 7427-7432.
- CHART, H., FROST, J. A. & ROWE, B. 1993. Expression of a new porin 'OmpE' by strains of *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Lett.* (109), 185-187.
- CHEN, S., ZHANG, A., BLYN, L. B. & STORZ, G. 2004. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (186), 6689-6697.
- CHEREPANOV, P. P. & WACKERNAGEL, W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* (158), 9-14.
- CHOMCZYNSKI, P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* (201), 134-139.
- CHRISTOFFERSEN, C. A., BRICKMAN, T. J., HOOK-BARNARD, I. & MCINTOSH, M. A. 2001. Regulatory architecture of the iron-regulated *fepD-ybdA* bidirectional promoter region in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (183), 2059-2070.
- CIRILLO, D. M., HEFFERNAN, E. J., WU, L., HARWOOD, J., FIERER, J. & GUINEY, D. G. 1996. Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect. Immun.* (64), 2019-2023.
- CLOECKAERT, A., VERGER, J. M., GRAYON, M. & VIZCAINO, N. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol. Lett.* (145), 1-8.
- CONLAN, S., ZHANG, Y., CHELEY, S. & BAYLEY, H. 2000. Biochemical and biophysical characterization of OmpG: A monomeric porin. *Biochemistry* (39), 11845-11854.

- CONLAN, S. & BAYLEY, H. 2003. Folding of a monomeric porin, OmpG, in detergent solution. *Biochemistry* (42), 9453-9465.
- CRABTREE, H. G. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* (23), 536-545.
- DAS, M., CHOPRA, A. K., CANTU, J. M. & PETERSON, J. W. 1998. Antisera to selected outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* protect against challenge with homologous and heterologous strains of *V. cholerae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (22), 303-308.
- DATSENKO, K. A. & WANNER, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (97), 6640-6645.
- DE COCK, H., STRUYVE, M., KLEEREBEZEM, M., VAN DER KRIFT, T. & TOMMASSEN, J. 1997. Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Molecular Biology* (269), 473-478.
- DE LA CRUZ, F. & DAVIES, J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* (8), 128-133.
- DE PINTO, V., LUDWIG, O., KRAUSE, J., BENZ, R. & PALMIERI, F. 1987. Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* (894), 109-119.
- DE PINTO, V., MESSINA, A., ACCARDI, R., AIELLO, R., GUARINO, F., TOMASELLO, M. F., TOMMASINO, M., TASCIO, G., CASADIO, R., BENZ, R., DE GIORGI, F., ICHAS, F., BAKER, M. & LAWEN, A. 2003. New functions of an old protein: the eukaryotic porin or voltage dependent anion selective channel (VDAC). *Ital. J. Biochem.* (52), 17-24.
- DEATH, A., NOTLEY, L. & FERENCI, T. 1993. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J. Bacteriol.* (175), 1475-1483.
- DEL RIO, M. L., GUTIERREZ-MARTIN, C. B., RODRIGUEZ-BARBOSA, J. I., NAVAS, J. & RODRIGUEZ-FERRI, E. F. 2005. Identification and characterization of the TonB region and its role in transferrin-mediated iron acquisition in *Haemophilus parasuis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (45), 75-86.
- DELA VEGA, A. L. & DELCOUR, A. H. 1995. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *Embo. J.* (14), 6058-6065.
- DELA VEGA, A. L. & DELCOUR, A. H. 1996. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* (178), 3715-3721.
- DELIHAS, N. 1995. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol. Microbiol.* (15), 411-414.
- DENOME, S. A., STANLEY, D. C., OLSON, E. S. & YOUNG, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* (175), 6890-6901.
- DOUCET-POPULAIRE, F., TRIEU-CUOT, P., DOSBAA, I., ANDREMONT, A. & COURVALIN, P. 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* (35), 185-187.
- DUMAS, F., FRANK, S., KOEBNIK, R., MAILLET, E., LUSTIG, A. & VAN GELDER, P. 2000. Extended sugar slide function for the periplasmic coiled coil domain of ScrY. *Journal of Molecular Biology* (300), 687-695.

- DUTZLER, R., WANG, Y. F., RIZKALLAH, P., ROSEBUSCH, J. P. & SCHIRMER, T. 1996. Crystal structures of various maltooligosaccharides bound to maltoporin reveal a specific sugar translocation pathway. *Structure* (4), 127-134.
- EATON, R. W. 1994. Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *J. Bacteriol.* (176), 7757-7762.
- EL HAMEL, C., FREULET, M. A., JAQUINOD, M., DE, E., MOLLE, G. & ORANGE, N. 2000. Involvement of the C-terminal part of *Pseudomonas fluorescens* OprF in the modulation of its pore-forming properties. *Biochim. Biophys. Acta* (1509), 237-244.
- EL-MANSI, M. 2004. Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (31), 295-300.
- FAJARDO, D. A., CHEUNG, J., ITO, C., SUGAWARA, E., NIKAIKO, H. & MISRA, R. 1998. Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels. *J. Bacteriol.* (180), 4452-4459.
- FANG, F. C., LIBBY, S. J., BUCHMEIER, N. A., LOEWEN, P. C., SWITALA, J., HARWOOD, J. & GUINEY, D. G. 1992. The alternative sigma factor *katF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (89), 11978-11982.
- FARR, S. B. & KOGOMA, T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol. Rev.* (55), 561-585.
- FARUQUE, S. M., ASADULGHANI, SAHA, M. N., ALIM, A. R., ALBERT, M. J., ISLAM, K. M. & MEKALANOS, J. J. 1998. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXPhi: molecular basis for origination of new strains with epidemic potential. *Infect. Immun.* (66), 5819-5825.
- FERNANDEZ-MORA, M., PUENTE, J. L. & CALVA, E. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* (186), 2909-2920.
- FERRERO, M., LLOBET-BROSSA, E., LALUCAT, J., GARCIA-VALDES, E., ROSSELLO-MORA, R. & BOSCH, R. 2002. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region. *Applied Environmental Microbiology* (68), 957-962.
- FISHER, I. S. 2004. International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003-a surveillance report from the Enter-net international surveillance network. *Euro Surveill.* (9), 45-47.
- FLECKENSTEIN, J. M., KOPECKO, D. J., WARREN, R. L. & ELSINGHORST, E. A. 1996. Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* (64), 2256-2265.
- FLORES-VALDEZ, M. A., PUENTE, J. L. & CALVA, E. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* (185), 6497-6506.
- FORST, D., WELTE, W., WACKER, T. & DIEDERICHS, K. 1998. Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella* Typhimurium and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* (5), 37-46.
- FRASER, G. M. & HUGHES, C. 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* (2), 630-635.

- FUENTES, D. E., NAVARRO, C. A., TANTALEAN, J. C., ARAYA, M. A., SAAVEDRA, C. P., PEREZ, J. M., CALDERON, I. L., YOUNDERIAN, P. A., MORA, G. C. & VASQUEZ, C. C. 2005. The product of the *qacC* gene of *Staphylococcus epidermidis* CH mediates resistance to beta-lactam antibiotics in gram-positive and gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* (156), 472-477.
- GALANIS, E., LO FO WONG, D. M., PATRICK, M. E., BINSZTEIN, N., CIESLIK, A., CHALERMCHIKIT, T., AIDARA-KANE, A., ELLIS, A., ANGULO, F. J. & WEGENER, H. C. 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerg. Infect. Dis.* (12), 381-388.
- GALDIERO, F., TUFANO, M. A., GALDIERO, M., MASIELLO, S. & DI ROSA, M. 1990. Inflammatory effects of *Salmonella* Typhimurium porins. *Infect. Immun.* (58), 3183-3186.
- GALDIERO, M., BRANCACCIO, F., NAZZARO, C. & DE MARTINO, L. 1998a. *Salmonella* Typhimurium porin internalization by leukocytes. *Res. Microbiol.* (149), 625-630.
- GALDIERO, M., DE MARTINO, L., MARCATILI, A., NUZZO, I., VITIELLO, M. & CIPOLLARO DE L'ERO, G. 1998b. Th1 and Th2 cell involvement in immune response to *Salmonella* Typhimurium porins. *Immunology* (94), 5-13.
- GALDIERO, M., FOLGORE, A., MOLITIerno, M. & GRECO, R. 1999. Porins and lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella* Typhimurium induce leucocyte transmigration through human endothelial cells *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* (116), 453-461.
- GALDIERO, M., D'ISANTO, M., VITIELLO, M., FINAMORE, E. & PELUSO, L. 2001. Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induce TNF-alpha, IL-6 and IL-8 release by CD14-independent and CD11a/CD18-dependent mechanisms. *Microbiology* (147), 2697-2704.
- GALDIERO, M., VITIELLO, M. & GALDIERO, S. 2003. Eukaryotic cell signaling and transcriptional activation induced by bacterial porins. *FEMS Microbiol. Lett.* (226), 57-64.
- GARCIA-DEL PORTILLO, F., FOSTER, J. W., MAGUIRE, M. E. & FINLAY, B. B. 1992. Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol. Microbiol.* (6), 3289-3297.
- GARCIA-DEL PORTILLO, F., FOSTER, J. W. & FINLAY, B. B. 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* Typhimurium virulence. *Infect. Immun.* (61), 4489-4492.
- GEHRING, K. B. & NIKAIIDO, H. 1989. Existence and purification of porin heterotrimers of *Escherichia coli* K12 OmpC, OmpF, and PhoE proteins. *J. Biol. Chem.* (264), 2810-2815.
- GENSBERG, K., SMITH, A. W., BRINKMAN, F. S. & HANCOCK, R. E. 1999. Identification of *oprG*, a gene encoding a major outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* (43), 607-608.
- GEORGE, A. M. 1996. Multidrug resistance in enteric and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* (139), 1-10.
- GIMENEZ, R., NUNEZ, M. F., BADIA, J., AGUILAR, J. & BALDOMA, L. 2003. The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (185), 6448-6455.
- GOGARTEN, J. P., DOOLITTLE, W. F. & LAWRENCE, J. G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* (19), 2226-2238.
- GOPHNA, U., IDESES, D., ROSEN, R., GRUNDLAND, A. & RON, E. Z. 2004. OmpA of a septicemic *Escherichia coli* O78-secretion and convergent evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* (294), 373-381.

- GUILLIER, M. & GOTTESMAN, S. 2006. Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol. Microbiol.* (59), 231-247.
- HANCOCK, R. E. & CAREY, A. M. 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* (140), 902-910.
- HANCOCK, R. E. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action-with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* (8), 429-445.
- HANCOCK, R. E., IRVIN, R. T., COSTERTON, J. W. & CAREY, A. M. 1981a. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane: peptidoglycan-associated proteins. *J. Bacteriol.* (145), 628-631.
- HANCOCK, R. E., RAFFLE, V. J. & NICAS, T. I. 1981b. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (19), 777-785.
- HANCOCK, R. E., SIEHNEL, R. & MARTIN, N. 1990. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* (4), 1069-1075.
- HANCOCK, R. E., FARMER, S. W., LI, Z. S. & POOLE, K. 1991. Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (35), 1309-1314.
- HANTKE, K. 1976. Phage T6-colicin K receptor and nucleoside transport in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* (70), 109-112.
- HARA-KAONGA, B. & PISTOLE, T. G. 2004. OmpD but not OmpC is involved in adherence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to human cells. *Can. J. Microbiol.* (50), 719-727.
- HARDER, K. J., NIKAIDO, H. & MATSUHASHI, M. 1981. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the OmpF porin. *Antimicrob. Agents Chemother.* (20), 549-552.
- HARDESTY, C., FERRAN, C. & DIRIENZO, J. M. 1991. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli*: characterization of *scrY*, the structural gene for a phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system outer membrane porin. *J. Bacteriol.* (173), 449-456.
- HARSHEY, R. M. & MATSUYAMA, T. 1994. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (91), 8631-8635.
- HASDEMIR, U. O., CHEVALIER, J., NORDMANN, P. & PAGES, J. M. 2004. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J. Clin. Microbiol.* (42), 2701-2706.
- HEFFERNAN, E. J., HARWOOD, J., FIERER, J. & GUINEY, D. 1992. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. *J. Bacteriol.* (174), 84-91.
- HEIDELBERG, J. F., EISEN, J. A., NELSON, W. C., CLAYTON, R. A., GWINN, M. L., DODSON, R. J., HAFT, D. H., HICKEY, E. K., PETERSON, J. D., UYAM, L., GILL, S. R., NELSON, K. E., READ, T. D., TETTELIN, H., RICHARDSON, D., ERMOLAEVA, M. D., VAMATHEVAN, J., BASS, S., QIN, H., DRAGOI, I., SELLERS, P., McDONALD, L., UTTERBACK, T., FLEISHMANN, R. D., NIERMAN, W. C., WHITE, O., SALZBERG, S. L., SMITH, H. O., COLWELL, R. R., MEKALANOS, J. J., VENTER, J. C. & FRASER, C. M. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* (406), 477-483.

- HIRAKAWA, H., NISHINO, K., HIRATA, T. & YAMAGUCHI, A. 2003a. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (185), 1851-1856.
- HIRAKAWA, H., NISHINO, K., YAMADA, J., HIRATA, T. & YAMAGUCHI, A. 2003b. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* (52), 576-582.
- HIRAKAWA, H., INAZUMI, Y., MASAKI, T., HIRATA, T. & YAMAGUCHI, A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (55), 1113-1126.
- HO, E. M., CHANG, H. W., KIM, S. I., KAHNG, H. Y. & OH, K. H. 2004. Analysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)-inducible cellular responses and stress shock proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Curr. Microbiol.* (49), 346-352.
- HOLMS, H. 1996. Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* (19), 85-116.
- HOLMS, W. H. 1986. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* (28), 69-105.
- HONG, H., PATEL, D. R., TAMM, L. K. & VAN DEN BERG, B. 2006. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded beta-barrel with a hydrophobic channel. *J. Biol. Chem.*
- HORSTMAN, A. L. & KUEHN, M. J. 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* (275), 12489-12496.
- HORSTMAN, A. L. & KUEHN, M. J. 2002. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol. Chem.* (277), 32538-32545.
- HORSTMAN, A. L., BAUMAN, S. J. & KUEHN, M. J. 2004. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. *J. Biol. Chem.* (279), 8070-8075.
- HOYER, L. L., HAMILTON, A. C., STEENBERGEN, S. M. & VIMR, E. R. 1992. Cloning, sequencing and distribution of the *Salmonella* Typhimurium LT2 sialidase gene, *nanH*, provides evidence for interspecies gene transfer. *Mol. Microbiol.* (6), 873-884.
- HU, H., LAN, R. & REEVES, P. R. 2006. Adaptation of multilocus sequencing for studying variation within a major clone: evolutionary relationships of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genetics* (172), 743-750.
- HU, W. S., LI, P. C. & CHENG, C. Y. 2005. Correlation between ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression of outer membrane proteins OmpW and Ail/OmpX-like protein, which are regulated by BaeR of a two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* (49), 3955-3958.
- HUANG, C. Z., LIN, X. M., WU, L. N., ZHANG, D. F., LIU, D., WANG, S. Y. & PENG, X. X. 2006. Systematic Identification of the Subproteome of *Escherichia coli* Cell Envelope Reveals the Interaction Network of Membrane Proteins and Membrane-Associated Peripheral Proteins. *J. Proteome Res.* (5), 3268-3276.
- HUDSON, J. M., HEFFRON, K., KOTLYAR, V., SHER, Y., MAKLASHINA, E., CECCHINI, G. & ARMSTRONG, F. A. 2005. Electron transfer and catalytic control by the iron-sulfur clusters in a respiratory enzyme, *E. coli* fumarate reductase. *J. Am. Chem. Soc.* (127), 6977-6989.

- HUNT, M. D., PETTIS, G. S. & MCINTOSH, M. A. 1994. Promoter and operator determinants for Fur-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *J. Bacteriol.* (176), 3944-3955.
- HUSSEINY, M. I. & HENSEL, M. 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect. Immun.* (73), 1598-1605.
- HUSSEINY, M. I. & HENSEL, M. 2006. Construction of highly attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vectors for delivering heterologous antigens by chromosomal integration. *Microbiol. Res.* (Dec.).
- HWANG, P. M., CHOY, W. Y., LO, E. I., CHEN, L., FORMAN-KAY, J. D., RAETZ, C. R., PRIVE, G. G., BISHOP, R. E. & KAY, L. E. 2002. Solution structure and dynamics of the outer membrane enzyme PagP by NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (99), 13560-13565.
- HWANG, P. M., BISHOP, R. E. & KAY, L. E. 2004. The integral membrane enzyme PagP alternates between two dynamically distinct states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (101), 9618-9623.
- ISIBASI, A., PANIAGUA, J., ROJO, M. P., MARTIN, N., RAMIREZ, G., GONZALEZ, C. R., LOPEZ-MACIAS, C., SANCHEZ, J., KUMATE, J. & ORTIZ-NAVARRETE, V. 1994. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (730), 350-352.
- IYER, R. & DELCOUR, A. H. 1997. Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. *J. Biol. Chem.* (272), 18595-18601.
- IYER, R., WU, Z., WOSTER, P. M. & DELCOUR, A. H. 2000. Molecular basis for the polyamine-OmpF porin interactions: inhibitor and mutant studies. *Journal of Molecular Biology* (297), 933-945.
- JACKSON, C. R. & DUGAS, S. L. 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal *arsC* gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol. Biol.* (3), 18.
- JAIN, R., RIVERA, M. C., MOORE, J. E. & LAKE, J. A. 2002. Horizontal gene transfer in microbial genome evolution. *Theor. Popul. Biol.* (61), 489-495.
- JALAJAKUMARI, M. B. & MANNING, P. A. 1990. Nucleotide sequence of the gene, *ompW*, encoding a 22kDa immunogenic outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Nucleic Acids Res* (18), 2180.
- JANSEN, C., HEUTINK, M., TOMMASSEN, J. & DE COCK, H. 2000. The assembly pathway of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* (267), 3792-3800.
- JANSSEN, R., VERJANS, G. M., KUSTERS, J. G. & TOMMASSEN, J. 1995. Induction of the *phoE* promoter upon invasion of *Salmonella* Typhimurium into eukaryotic cells. *Microb. Pathog.* (19), 193-201.
- JAP, B. K. & WALIAN, P. J. 1998. Gliding through sugar channels: how sweet it is! *Nat. Struct. Biol.* (5), 6-8.
- JEANNIN, P., MAGISTRELLI, G., GOETSCH, L., HAEUW, J. F., THIEBLEMONT, N., BONNEFOY, J. Y. & DELNESTE, Y. 2002. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine* (20 Suppl 4), A23-27.
- JEANTEUR, D., GLETSU, N., PATTUS, F. & BUCKLEY, J. T. 1992. Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel-forming properties. *Mol. Microbiol.* (6), 3355-3363.

- JOHANSEN, J., RASMUSSEN, A. A., OVERGAARD, M. & VALENTIN-HANSEN, P. 2006. Conserved Small Non-coding RNAs that belong to the *sigma(E)* Regulon: Role in Down-regulation of Outer Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*.
- JORDI, B. J., BOUTAGA, K., VAN HEESWIJK, C. M., VAN KNAPEN, F. & LIPMAN, L. J. 2001. Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* (204), 329-334.
- KABIR, M. S., SAGARA, T., OSHIMA, T., KAWAGOE, Y., MORI, H., TSUNEDOMI, R. & YAMADA, M. 2004. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology* (150), 2543-2553.
- KARSHIKOFF, A., SPASSOV, V., COWAN, S. W., LADENSTEIN, R. & SCHIRMER, T. 1994. Electrostatic properties of two porin channels from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* (240), 372-384.
- KAWASAKI, K., CHINA, K. & NISHIJIMA, M. 2007. Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* (189), 4911-4919.
- KENNEDY, C. L., KREJANY, E. O., YOUNG, L. F., O'CONNOR, J. R., AWAD, M. M., BOYD, R. L., EMMINS, J. J., LYRAS, D. & ROOD, J. I. 2005. The alpha-toxin of *Clostridium septicum* is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* (57), 1357-1366.
- KENYON, W. J., THOMAS, S. M., JOHNSON, E., PALLEN, M. J. & SPECTOR, M. P. 2005. Shifts from glucose to certain secondary carbon-sources result in activation of the extracytoplasmic function sigma factor SigmaE in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* (151), 2373-2383.
- KESTY, N. C. & KUEHN, M. J. 2004. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* (279), 2069-2076.
- KESTY, N. C., MASON, K. M., REEDY, M., MILLER, S. E. & KUEHN, M. J. 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *Embo. J.* (23), 4538-4549.
- KIM, J. S., KIM, J.H., RYU, E.K., KIM, J.K., KIM, C.K., HWANG, I., LEE, K. 2004. Versatile catabolic properties of *Tn4371*-encoded *bph* pathway in *Comamonas testosteroni* (formerly *Pseudomonas* sp.) NCIMB 10643. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (14), 302-311.
- KIM, W., KILLAM, T., SOOD, V. & SURETTE, M. G. 2003. Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in elevated resistance to multiple antibiotics. *J. Bacteriol.* (185), 3111-3117.
- KIM, W. & SURETTE, M. G. 2003. Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biol. Proced. Online* (5), 189-196.
- KIM, W. & SURETTE, M. G. 2004. Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* (54), 702-714.
- KIM, W. & SURETTE, M. G. 2005. Prevalence of surface swarming behavior in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* (187), 6580-6583.
- KIM, W. & SURETTE, M. G. 2006. Coordinated regulation of two independent cell-cell signaling systems and swarmer differentiation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* (188), 431-440.
- KOCH, J. P., HAYASHI, S. & LIN, E. C. 1964. The Control of Dissimilation of Glycerol and L-Alpha-Glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* (239), 3106-3108.
- KOEBNIK, R., LOCHER, K. P. & VAN GELDER, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* (37), 239-253.

- KOEBNIK, R. 2005. TonB-dependent trans-envelope signalling: the exception or the rule? *Trends Microbiol.* (13), 343-347.
- KUEHN, M. J. & KESTY, N. C. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* (19), 2645-2655.
- KULLMAN, L., WINTERHALTER, M. & BEZRUKOV, S. M. 2002. Transport of maltodextrins through maltoporin: a single-channel study. *Biophys. J.* (82), 803-812.
- KURUPATI, P., TEH, B. K., KUMARASINGHE, G. & POH, C. L. 2006. Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis. *Proteomics* (6), 836-844.
- KWON, Y. M. & RICKE, S. C. 1998. Induction of acid resistance of *Salmonella* Typhimurium by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* (64), 3458-3463.
- LACOUR, S. & LANDINI, P. 2004. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of *sigmaS*-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* (186), 7186-7195.
- LAI, E. M., NAIR, U., PHADKE, N. D. & MADDOCK, J. R. 2004. Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (52), 1029-1044.
- LENGELER, D., SCHLEGEL. (1999). *Biology of the Procaryotes*. Thieme, New York.
- LEYER, G. J. & JOHNSON, E. A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* (59), 1842-1847.
- LI, X. Z., NIKAIIDO, H. & WILLIAMS, K. E. 1997. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J. Bacteriol.* (179), 6127-6132.
- LOBNER-OLESEN, A., SKOVGAARD, O. & MARINUS, M. G. 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr. Opin. Microbiol.* (8), 154-160.
- LOTTSPEICH, F., ZORBAS, H. (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- LUCKEY, M. & NIKAIIDO, H. 1980. Specificity of diffusion channels produced by *lambda* phage receptor protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (77), 167-171.
- LULI, G. W. & STROHL, W. R. 1990. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* (56), 1004-1011.
- MAIER, C., BREMER, E., SCHMID, A. & BENZ, R. 1988. Pore-forming activity of the Tsx protein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Demonstration of a nucleoside-specific binding site. *J. Biol. Chem.* (263), 2493-2499.
- MAMMARAPPALLIL, J. G. & ELSINGHORST, E. A. 2000. Epithelial cell adherence mediated by the enterotoxigenic *Escherichia coli* Tia protein. *Infect. Immun.* (68), 6595-6601.
- MANNING, P. A., BARTOWSKY, E. J., LEAVESLY, D. I., HACKETT, J. A. & HEUZENROEDER, M. W. 1985. Molecular cloning using immune sera of a 22-kDa minor outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Gene* (34), 95-103.
- MARINUS, M. G. 2000. Recombination is essential for viability of an *Escherichia coli* Dam (DNA adenine methyltransferase) mutant. *J. Bacteriol.* (182), 463-468.

- 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.
- MCHUGH, J. P., RODRIGUEZ-QUINONES, F., ABDUL-TEHRANI, H., SVISTUNENKO, D. A., POOLE, R. K., COOPER, C. E. & ANDREWS, S. C. 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* (278), 29478-29486.
- MCKEOWN, M., KAHN, M. & HANAWALT, P. 1976. Thymidine uptake and utilization in *Escherichia coli*: a new gene controlling nucleoside transport. *J. Bacteriol.* (126), 814-822.
- MEAGHER, R. B., TAIT, R. C., BETLACH, M. & BOYER, H. W. 1977. Protein expression in *E. coli* minicells by recombinant plasmids. *The Cell* (10), 521-536.
- MECSAS, J., WELCH, R., ERICKSON, J. W. & GROSS, C. A. 1995. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* (177), 799-804.
- MEDEIROS, A. A., O'BRIEN, T. F., ROSENBERG, E. Y. & NIKAIDO, H. 1987. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella* Typhimurium causes increased resistance to cephalosporins during therapy. *J. Infect. Dis.* (156), 751-757.
- MEENAKSHI, M., BAKSHI, C. S., BUTCHAIHAH, G., BANSAL, M. P., SIDDIQUI, M. Z. & SINGH, V. P. 1999. Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Res. Commun.* (23), 81-90.
- MERIGHI, M., CARROLL-PORTILLO, A., SEPTER, A. N., BHATIYA, A. & GUNN, J. S. 2006. Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *J. Bacteriol.* (188), 141-149.
- MERLIN, C., MCATEER, S. & MASTERS, M. 2002. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function. *J. Bacteriol.* (184), 4573-4581.
- MERMIN, J., HOAR, B. & ANGULO, F. J. 1997. Iguanas and *Salmonella* Marina infection in children: a reflection of the increasing incidence of reptile-associated salmonellosis in the United States. *Pediatrics.* (99), 399-402.
- MILLER, V. L. & FALKOW, S. 1988. Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* (56), 1242-1248.
- MILLER, V. L., FARMER, J. J., 3RD, HILL, W. E. & FALKOW, S. 1989. The *ail* locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* (57), 121-131.
- MILLER, V. L., BLISKA, J. B. & FALKOW, S. 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* *ail* gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* (172), 1062-1069.
- MILLER, V. L., BEER, K. B., HEUSIPP, G., YOUNG, B. M. & WACHTEL, M. R. 2001. Identification of regions of Ail required for the invasion and serum resistance phenotypes. *Mol. Microbiol.* (41), 1053-1062.
- MISRA, R. & BENSON, S. A. 1989. A novel mutation, *cog*, which results in production of a new porin protein (OmpG) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* (171), 4105-4111.

- MIZUNO, T., CHOU, M. Y. & INOUE, M. 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (81), 1966-1970.
- MOAT, A. G., FOSTER, J. W. & SPECTOR, M. P. (2002). *Microbial Physiology*, New York.
- MOLLOY, M. P., HERBERT, B. R., WALSH, B. J., TYLER, M. I., TRAINI, M., SANCHEZ, J. C., HOCHSTRASSER, D. F., WILLIAMS, K. L. & GOOLEY, A. A. 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* (19), 837-844.
- MOTLEY, S. T., MORROW, B. J., LIU, X., DODGE, I. L., VITIELLO, A., WARD, C. K. & SHAW, K. J. 2004. Simultaneous analysis of host and pathogen interactions during an *in vivo* infection reveals local induction of host acute phase response proteins, a novel bacterial stress response, and evidence of a host-imposed metal ion limited environment. *Cell. Microbiol.* (6), 849-865.
- MURPHY, K. C. 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (180), 2063-2071.
- NAGAKUBO, S., NISHINO, K., HIRATA, T. & YAMAGUCHI, A. 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* (184), 4161-4167.
- NAGASAWA, S., ISHIGE, K. & MIZUNO, T. 1993. Novel members of the two-component signal transduction genes in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* (114), 350-357.
- NANDI, B., NANDY, R. K., MUKHOPADHYAY, S., NAIR, G. B., SHIMADA, T. & GHOSE, A. C. 2000. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J. Clin. Microbiol.* (38), 4145-4151.
- NANDI, B., NANDY, R. K., SARKAR, A. & GHOSE, A. C. 2005. Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* (151), 2975-2986.
- NEGM, R. S. & PISTOLE, T. G. 1998. Macrophages recognize and adhere to an OmpD-like protein of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (20), 191-199.
- NEGM, R. S. & PISTOLE, T. G. 1999. The porin OmpC of *Salmonella* Typhimurium mediates adherence to macrophages. *Can. J. Microbiol.* (45), 658-669.
- NESTOROVICH, E. M., SUGAWARA, E., NIKAIDO, H. & BEZRUKOV, S. M. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J. Biol. Chem.* (281), 16230-16237.
- NIEHAUS, F., HANTKE, K. & UNDEN, G. 1991. Iron content and FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* (68), 319-323.
- NIKAIDO, H. (1996). *Outer membrane*. ASM Press, Washington, D.C.
- NIKAIDO, H. 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin. Cell. Dev. Biol.* (12), 215-223.
- NIKAIDO, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (67), 593-656.
- NISHINO, K., HONDA, T. & YAMAGUCHI, A. 2005. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* (187), 1763-1772.
- NISHINO, K., HSU, F. F., TURK, J., CROMIE, M. J., WOSTEN, M. M. & GROISMAN, E. A. 2006. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB-system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol. Microbiol.* (61), 645-654.

- NOTLEY, L. & FERENCI, T. 1995. Differential expression of *mal* genes under cAMP and endogenous inducer control in nutrient-stressed *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (16), 121-129.
- OCHMAN, H., LAWRENCE, J. G. & GROISMAN, E. A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* (405), 299-304.
- O'CONNOR, C. D., FARRIS, M., FOWLER, R. & QI, S. Y. 1997. The proteome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: current progress on its determination and some applications. *Electrophoresis* (18), 1483-1490.
- OHNISHI, M., KUROKAWA, K. & HAYASHI, T. 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Biotechnol.* (9), 481-485.
- OROPEZA, R., SAMPIERI, C. L., PUENTE, J. L. & CALVA, E. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella* Typhi: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* (32), 243-252.
- OSHIMA, T., WADA, C., KAWAGOE, Y., ARA, T., MAEDA, M., MASUDA, Y., HIRAGA, S. & MORI, H. 2002. Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* (45), 673-695.
- PATTEN, C. L., KIRCHHOF, M. G., SCHERTZBERG, M. R., MORTON, R. A. & SCHELLHORN, H. E. 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Genet. Genomics* (272), 580-591.
- PAUSTIAN, M. L., MAY, B. J. & KAPUR, V. 2001. *Pasteurella multocida* gene expression in response to iron limitation. *Infect. Immun.* (69), 4109-4115.
- PAUSTIAN, M. L., MAY, B. J., CAO, D., BOLEY, D. & KAPUR, V. 2002a. Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. *J. Bacteriol.* (184), 6714-6720.
- PAUSTIAN, M. L., MAY, B. J. & KAPUR, V. 2002b. Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* (184), 3734-3739.
- PAUTSCH, A. & SCHULZ, G. E. 1998. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* (5), 1013-1017.
- PAUTSCH, A., VOGT, J., MODEL, K., SIEBOLD, C. & SCHULZ, G. E. 1999. Strategy for membrane protein crystallization exemplified with OmpA and OmpX. *Proteins* (34), 167-172.
- PAUTSCH, A. & SCHULZ, G. E. 2000. High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Struct. Biol.* (298), 273-282.
- PENG, X., XU, C., REN, H., LIN, X., WU, L. & WANG, S. 2005. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. *J. Proteome Res.* (4), 2257-2265.
- PEREZ, J. C. & GROISMAN, E. A. 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* (63), 283-293.
- PHALE, P. S., PHILIPPSEN, A., WIDMER, C., PHALE, V. P., ROSEBUSCH, J. P. & SCHIRMER, T. 2001. Role of charged residues at the OmpF porin channel constriction probed by mutagenesis and simulation. *Biochemistry* (40), 6319-6325.
- PILSL, H., SMAJS, D. & BRAUN, V. 1999. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Bacteriol.* (181), 3578-3581.
- PLYM, F., WIERUP, M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. Sci. Tech.* (25), 541-554.

- PORWOLLIK, S., WONG, R. M. & MCCLELLAND, M. 2002. Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (99), 8956-8961.
- PORWOLLIK, S., SANTIVIAGO, C. A., CHENG, P., FLOREA, L. & MCCLELLAND, M. 2005. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. J. Bacteriol. (187), 6545-6555.
- PRICE, G. P. & ST JOHN, A. C. 2000. Purification and analysis of expression of the stationary phase-inducible Slp lipoprotein in *Escherichia coli*: role of the Mar system. FEMS Microbiol. Lett. (193), 51-56.
- PROUTY, A. M., BRODSKY, I. E., MANOS, J., BELAS, R., FALKOW, S. & GUNN, J. S. 2004. Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. FEMS Immunol. Med. Microbiol. (41), 177-185.
- PULKKINEN, W. S. & MILLER, S. I. 1991. A *Salmonella* Typhimurium virulence protein is similar to a *Yersinia enterocolitica* invasion protein and a bacteriophage *lambda* outer membrane protein. J. Bacteriol. (173), 86-93.
- QI, S. Y., MOIR, A. & O'CONNOR, C. D. 1996. Proteome of *Salmonella* Typhimurium SL1344: identification of novel abundant cell envelope proteins and assignment to a two-dimensional reference map. J. Bacteriol. (178), 5032-5038.
- RAFFA, R. G. & RAIVIO, T. L. 2002. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. (45), 1599-1611.
- RAIMONDI, A., SISTO, F. & NIKAIIDO, H. 2001. Mutation in *Serratia marcescens* AmpC beta-lactamase producing high-level resistance to ceftazidime and ceftipime. Antimicrob. Agents Chemother. (45), 2331-2339.
- REEN, F. J., BOYD, E. F., PORWOLLIK, S., MURPHY, B. P., GILROY, D., FANNING, S. & MCCLELLAND, M. 2005. Genomic comparisons of *Salmonella enterica* serovar Dublin, Agona, and Typhimurium strains recently isolated from milk filters and bovine samples from Ireland, using a *Salmonella* microarray. Appl. Environ. Microbiol. (71), 1616-1625.
- RHODIUS, V. A., SUH, W. C., NONAKA, G., WEST, J. & GROSS, C. A. 2006. Conserved and variable functions of the *sigmaE* stress response in related genomes. PLoS. Biol. (4), e2.
- RIESENBERG-WILMES, M. R., BEARSON, B., FOSTER, J. W. & CURTIS, R., 3RD. 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella* Typhimurium. Infect. Immun. (64), 1085-1092.
- ROBBE-SAULE, V., COYNAULT, C., IBANEZ-RUIZ, M., HERMANT, D. & NOREL, F. 2001. Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (*sigmaS*). Mol. Microbiol. (39), 1533-1545.
- ROBERT KOCH-INSTITUT, R. 1997. Zum Vorkommen von *Salmonella* Marina. Epidemiologisches Bulletin (24/97), 163.
- RODRIGUEZ-MORALES, O., FERNANDEZ-MORA, M., HERNANDEZ-LUCAS, I., VAZQUEZ, A., PUENTE, J. L. & CALVA, E. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. Infect. Immun. (74), 1398-1402.
- SACCONI, C., CAGGESE, C., D'ERCHIA, A. M., LANAVE, C., OLIVA, M. & PESOLE, G. 2003. Molecular clock and gene function. J. Mol. Evol. (57 Suppl 1), S277-285.
- SAIER, M. H., JR. 2000a. Families of proteins forming transmembrane channels. J. Membr. Biol. (175), 165-180.
- SAIER, M. H., JR. 2000b. Families of transmembrane sugar transport proteins. Mol. Microbiol. (35), 699-710.

- SAIER, M. H. J. (2006). Transport Classification Database (TCDB) - 1.B.39 The Bacterial Porin OmpW, OmpW Family. <http://www.tcdb.org>. Letzter Zugriff: 10.11.2006.
- SAINT, N., LOU, K. L., WIDMER, C., LUCKEY, M., SCHIRMER, T. & ROSENBUSCH, J. P. 1996. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. II. Functional characterization. *J. Biol. Chem.* (271), 20676-20680.
- SAINZ, T., PEREZ, J., VILLASECA, J., HERNANDEZ, U., ESLAVA, C., MENDOZA, G. & WACHER, C. 2005. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* (105), 357-367.
- SALAZAR-GONZALEZ, R. M., MALDONADO-BERNAL, C., RAMIREZ-CRUZ, N. E., RIOS-SARABIA, N., BELTRAN-NAVA, J., CASTANON-GONZALEZ, J., CASTILLO-TORRES, N., PALMA-AGUIRRE, J. A., CARRERA-CAMARGO, M., LOPEZ-MACIAS, C. & ISIBASI, A. 2004. Induction of cellular immune response and anti-*Salmonella enterica* serovar typhi bactericidal antibodies in healthy volunteers by immunization with a vaccine candidate against typhoid fever. *Immunol. Lett.* (93), 115-122.
- SALMOND, C. V., KROLL, R. G. & BOOTH, I. R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* (130), 2845-2850.
- SAMARTZIDOU, H. & DELCOUR, A. H. 1999a. Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators. *FEBS Lett.* (444), 65-70.
- SAMARTZIDOU, H. & DELCOUR, A. H. 1999b. Excretion of endogenous cadaverine leads to a decrease in porin-mediated outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* (181), 791-798.
- SAMBROCK, J. E., FRITSCH, F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G. G. & KORBER, D. R. 2004. Treatment of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a sublethal concentration of trisodium phosphate or alkaline pH induces thermotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* (70), 4613-4620.
- SANTIVIAGO, C. A., TORO, C. S., BUCAREY, S. A. & MORA, G. C. 2001. A chromosomal region surrounding the *ompD* porin gene marks a genetic difference between *Salmonella* Typhi and the majority of *Salmonella* serovars. *Microbiology* (147), 1897-1907.
- SANTIVIAGO, C. A., FUENTES, J. A., BUENO, S. M., TROMBERT, A. N., HILDAGO, A. A., SOCIAS, L. T., YOUNDERIAN, P. & MORA, G. C. 2002. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol. Microbiol.* (46), 687-698.
- SANTIVIAGO, C. A., TORO, C. S., HIDALGO, A. A., YOUNDERIAN, P. & MORA, G. C. 2003. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD. *J. Bacteriol.* (185), 5901-5905.
- 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 Infect.* (3), 1335-1344.
- SANTOS, R. L., TSOLIS, R. M., BAUMLER, A. J. & ADAMS, L. G. 2003. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (36), 3-12.
- SCHIRMER, T. & PHALE, P. S. 1999. Brownian dynamics simulation of ion flow through porin channels. *Journal of Molecular Biology* (294), 1159-1167.
- SCHMID, K., EBNER, R., ALTENBUCHNER, J., SCHMITT, R. & LENGELER, J. W. 1988. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K12: mapping of the *scr* genes of pUR400. *Mol. Microbiol.* (2), 1-8.

- SCHMID, K., EBNER, R., JAHREIS, K., LENGELER, J. W. & TITGEMEYER, F. 1991. A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* (5), 941-950.
- SCHOOLNIK, G. K. & YILDIZ, F. H. 2000. The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biol.* (1), REVIEWS1016.
- SCHROTER, M., ROGGENTIN, P., HOFMANN, J., SPEICHER, A., LAUFS, R. & MACK, D. 2004. Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Serogroup IIIb): a prospective study. *Appl. Environ. Microbiol.* (70), 613-615.
- SCHULEIN, K., SCHMID, K. & BENZL, R. 1991. The sugar-specific outer membrane channel ScrY contains functional characteristics of general diffusion pores and substrate-specific porins. *Mol. Microbiol.* (5), 2233-2241.
- SECUNDINO, I., LOPEZ-MACIAS, C., CERVANTES-BARRAGAN, L., GIL-CRUZ, C., RIOS-SARABIA, N., PASTELIN-PALACIOS, R., VILLASIS-KEEVER, M. A., BECKER, I., PUENTE, J. L., CALVA, E. & ISIBASI, A. 2006. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* (117), 59-70.
- SELIFONOV, S. A., SLEPEN'KIN, A. V., ADANIN, V. M., NEFEDOVA, M. & STAROVOITOV, II. 1991. [Oxidation of dibenzofuran by *Pseudomonas* strains harboring plasmids of naphthalene degradation]. *Mikrobiologiya* (60), 67-71.
- SELKE, M., MEENS, J., SPRINGER, S., FRANK, R. & GERLACH, G. F. 2007. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infect. Immun.* (75), 2476-2483.
- SENGUPTA, T. K., NANDY, R. K., MUKHOPADHYAY, S., HALL, R. H., SATHYAMOORTHY, V. & GHOSE, A. C. 1998. Characterization of a 20-kDa pilus protein expressed by a diarrheogenic strain of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (160), 183-189.
- SHA, J., FADL, A. A., KLIMPEL, G. R., NIESEL, D. W., POPOV, V. L. & CHOPRA, A. K. 2004. The two murein lipoproteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribute to the virulence of the organism. *Infect. Immun.* (72), 3987-4003.
- SHARMA, A. & CHATURVEDI, A. N. 2006. Prevalence of virulence genes (*ctxA*, *stn*, *ompW* and *tcpA*) among non-O1 *Vibrio cholerae* isolated from fresh water environment. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*
- SILHAVY, T. J., BRICKMAN, E., BASSFORD, P. J., JR., CASADABAN, M. J., SHUMAN, H. A., SCHWARTZ, V., GUARENTE, L., SCHWARTZ, M. & BECKWITH, J. R. 1979. Structure of the *malB* region in *Escherichia coli* K12. II. Genetic map of the *malE,F,G* operon. *Mol Gen Genet* (174), 249-259.
- SIMONET, V., MALL INVERTED QUESTION MARKEA, M. & PAG INVERTED QUESTION MARKES, J. M. 2000. Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* (44), 311-315.
- SINCLAIR, J. C., DELGODA, R., NOBLE, M. E., JARMIN, S., GOH, N. K. & SIM, E. 1998. Purification, characterization, and crystallization of an N-hydroxyarylamine O-acetyltransferase from *Salmonella* Typhimurium. *Protein Expr. Purif.* (12), 371-380.
- SINGH, D. V., ISAC, S. R. & COLWELL, R. R. 2002. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* (40), 4321-4324.
- SINGH, D. V. 2003. Hexaplex PCR for rapid detection of virulence factors. *Expert Rev. Mol. Diagn.* (3), 781-784.

- SINGH, S. P., WILLIAMS, Y. U., KLEBBA, P. E., MACCHIA, P. & MILLER, S. 2000. Immune recognition of porin and lipopolysaccharide epitopes of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Microbial Pathogens* (28), 157-167.
- SODERBLOM, T., OXHAMRE, C., WAI, S. N., UHLEN, P., APERIA, A., UHLIN, B. E. & RICHTER-DAHLFORS, A. 2005. Effects of the *Escherichia coli* toxin cytolysin A on mucosal immunostimulation via epithelial Ca²⁺ signalling and Toll-like receptor 4. *Cell. Microbiol.* (7), 779-788.
- STABLER, R. A., GERDING, D. N., SONGER, J. G., DRUDY, D., BRAZIER, J. S., TRINH, H. T., WITNEY, A. A., HINDS, J. & WREN, B. W. 2006. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J. Bacteriol.* (188), 7297-7305.
- SUBBARAO, G. V. & VAN DEN BERG, B. 2006. Crystal structure of the monomeric porin OmpG. *Journal of Molecular Biology* (360), 750-759.
- SUGAWARA, E. & NIKAIDO, H. 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* (267), 2507-2511.
- SUGAWARA, E., STEIERT, M., ROUHANI, S. & NIKAIDO, H. 1996. Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* (178), 6067-6069.
- SUGAWARA, E., NESTOROVICH, E. M., BEZRUKOV, S. M. & NIKAIDO, H. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *J. Biol. Chem.* (281), 16220-16229.
- SUKUMARAN, S. K., SHIMADA, H. & PRASADARAO, N. V. 2003. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A. *Infect. Immun.* (71), 5951-5961.
- TABARAE, B., SHARMA, B. K., SHARMA, P. R., SEHGAL, R. & GANGULY, N. K. 1994. Evaluation of *Salmonella* porins as a broad spectrum vaccine candidate. *Microbiol. Immunol.* (38), 553-559.
- TAKIZAWA, N., IIDA, T., SAWADA, T., YAMAUCHI, K., WANG, Y. W., FUKUDA, M. & KIYOHARA, H. 1999. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Biosci. Bioeng.* (87), 721-731.
- TAMRAKAR, A. K., GOEL, A. K., KAMBOJ, D. V. & SINGH, L. 2006. Surveillance methodology for *Vibrio cholerae* in environmental samples. *Int. J. Hyg. Environ. Health* (16), 305-312.
- TCHAWA YIMGA, M., LEATHAM, M. P., ALLEN, J. H., LAUX, D. C., CONWAY, T. & COHEN, P. S. 2006. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice. *Infect. Immun.* (74), 1130-1140.
- THANASSI, D. G., CHENG, L. W. & NIKAIDO, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (179), 2512-2518.
- THOMAS, A. D. & BOOTH, I. R. 1992. The regulation of expression of the porin gene *ompC* by acid pH. *J. Gen. Microbiol.* (138), 1829-1835.
- THOMPSON, D. K., BELIAEV, A. S., GIOMETTI, C. S., TOLLAKSEN, S. L., KHARE, T., LIES, D. P., NEALSON, K. H., LIM, H., YATES, J., 3RD, BRANDT, C. C., TIEDJE, J. M. & ZHOU, J. 2002. Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (*fur*) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of Fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* (68), 881-892.
- THORNE, G. M. & CORWIN, L. M. 1975. Mutations affecting aromatic amino acid transport in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. *J. Gen. Microbiol.* (90), 203-216.

- TOBE, T., TATSUNO, I., KATAYAMA, E., WU, C. Y., SCHOOLNIK, G. K. & SASAKAWA, C. 1999. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol. Microbiol.* (33), 741-752.
- TOGUCHI, A., SIANO, M., BURKART, M. & HARSHEY, R. M. 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* (182), 6308-6321.
- TOMMASSEN, J. & LUGTENBERG, B. 1982. Pho-regulon of *Escherichia coli* K12: a minireview. *Ann. Microbiol. (Paris)* (133), 243-249.
- TORO, C. S., LOBOS, S. R., CALDERON, I., RODRIGUEZ, M. & MORA, G. C. 1990. Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.* (34), 1715-1719.
- TRIAS, J. & NIKAIIDO, H. 1990. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* (265), 15680-15684.
- TRIEU-CUOT, P., GERBAUD, G., LAMBERT, T. & COURVALIN, P. 1985. *In vivo* transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *Embo. J.* (4), 3583-3587.
- TRIEU-CUOT, P. & COURVALIN, P. 1986. Evolution and transfer of aminoglycoside resistance genes under natural conditions. *J. Antimicrob. Chemother.* (18 Suppl C), 93-102.
- TSOLIS, R. M., BAUMLER, A. J., STOJILJKOVIC, I. & HEFFRON, F. 1995. Fur regulon of *Salmonella* Typhimurium: identification of new iron-regulated genes. *J. Bacteriol.* (177), 4628-4637.
- UDHAYAKUMAR, V. & MUTHUKKARUPPAN, V. 1989. Protective immunity induced by porin against *Salmonella* infection in mice. *The Indian Journal of Medical Research* (89), 121-127.
- VAN BEILEN, J. B., EGGINK, G., ENEQUIST, H., BOS, R. & WITHOLT, B. 1992. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol. Microbiol.* (6), 3121-3136.
- VAN DEN BERG, B., BLACK, P. N., CLEMONS, W. M., JR. & RAPOPORT, T. A. 2004. Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL. *Science* (304), 1506-1509.
- VAN DEN BERG, B. 2005. The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (15), 401-407.
- VAN GELDER, P., SAINT, N., PHALE, P., EPPENS, E. F., PRILIPOV, A., VAN BOXTEL, R., ROSENBUSCH, J. P. & TOMMASSEN, J. 1997a. Voltage sensing in the PhoE and OmpF outer membrane porins of *Escherichia coli*: role of charged residues. *Journal of Molecular Biology* (269), 468-472.
- VAN GELDER, P., SAINT, N., VAN BOXTEL, R., ROSENBUSCH, J. P. & TOMMASSEN, J. 1997b. Pore functioning of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*: mutagenesis of the constriction loop L3. *Protein Eng.* (10), 699-706.
- VAN HELLEMOND, J. J. & TIELENS, A. G. 1994. Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochem. J.* (304 (Pt 2)), 321-331.
- VANDEPUTTE-RUTTEN, L., BOS, M. P., TOMMASSEN, J. & GROS, P. 2003. Crystal structure of Neisserial surface protein A (NspA), a conserved outer membrane protein with vaccine potential. *J. Biol. Chem.* (278), 24825-24830.
- VIZCAINO, N., CLOECKAERT, A., ZYGMUNT, M. S. & DUBRAY, G. 1996. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.* (64), 3744-3751.

- VOGT, J. & SCHULZ, G. E. 1999. The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure* (7), 1301-1309.
- VORA, G. J., MEADOR, C. E., BIRD, M. M., BOPP, C. A., ANDREADIS, J. D. & STENGER, D. A. 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (102), 19109-19114.
- WAI, S. N., LINDMARK, B., SODERBLOM, T., TAKADE, A., WESTERMARK, M., OSCARSSON, J., JASS, J., RICHTER-DAHLFORS, A., MIZUNOE, Y. & UHLIN, B. E. 2003. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell*. (115), 25-35.
- WANG, J. Y., PASETTI, M. F., NORIEGA, F. R., ANDERSON, R. J., WASSERMAN, S. S., GALEN, J. E., SZTEIN, M. B. & LEVINE, M. M. 2001. Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated Delta-*guaBA* *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect. Immun.* (69), 4734-4741.
- WANG, Q., FRYE, J. G., MCCLELLAND, M. & HARSHEY, R. M. 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella* Typhimurium: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol. Microbiol.* (52), 169-187.
- WANG, Y. F., DUTZLER, R., RIZKALLAH, P. J., ROSENBUSCH, J. P. & SCHIRMER, T. 1997. Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential flux rates in maltoporin. *Journal of Molecular Biology* (272), 56-63.
- WATT, S. A., WILKE, A., PATSCHKOWSKI, T. & NIEHAUS, K. 2005. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics* (5), 153-167.
- WATT, S. A., TELLSTROM, V., PATSCHKOWSKI, T. & NIEHAUS, K. 2006. Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. *J. Biotechnol.* (126), 78-86.
- WEBER, A., KOGL, S. A. & JUNG, K. 2006. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (188), 7165-7175.
- WEISER, J. N. & GOTSCHLICH, E. C. 1991. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* (59), 2252-2258.
- WIENER, M. C. 2005. TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Curr. Opin. Struct. Biol.* (15), 394-400.
- WOLFE, A. J. 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (69), 12-50.
- WONG, R. S., WIRTZ, R. A. & HANCOCK, R. E. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF as an expression vector for foreign epitopes: the effects of positioning and length on the antigenicity of the epitope. *Gene* (158), 55-60.
- WOODWARD, D. L., KHAKHRIA, R. & JOHNSON, W. M. 1997. Human salmonellosis associated with exotic pets. *J. Clin. Microbiol.* (35), 2786-2790.
- WU, L., LIN, X., WANG, F., YE, D., XIAO, X., WANG, S. & PENG, X. 2006. OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*. *J. Proteome Res.* (5), 2250-2257.
- XU, C., REN, H., WANG, S. & PENG, X. 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Res. Microbiol.* (155), 835-842.

- XU, C., WANG, S., REN, H., LIN, X., WU, L. & PENG, X. 2005. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics* (5), 3142-3152.
- XU, C., LIN, X., REN, H., ZHANG, Y., WANG, S. & PENG, X. 2006. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics* (6), 462-473.
- XU, Q., DZIEJMAN, M. & MEKALANOS, J. J. 2003. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during inraintestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (100), 1286-1291.
- YAMAGUCHI, A., IWASAKI-OHBA, Y., ONO, N., KANEKO-OHDERA, M. & SAWAI, T. 1991. Stoichiometry of metal-tetracycline/H⁺ antiport mediated by transposon *Tn10*-encoded tetracycline resistance protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* (282), 415-418.
- YE, J. & VAN DEN BERG, B. 2004. Crystal structure of the bacterial nucleoside transporter Tsx. *Embo. J.* (23), 3187-3195.
- YEN, K. M. & GUNSALUS, I. C. 1985. Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7. *J. Bacteriol.* (162), 1008-1013.
- YEN, K. M. & SERDAR, C. M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *Crit. Rev. Microbiol.* (15), 247-268.
- YILDIZ, O., VINOTHKUMAR, K. R., GOSWAMI, P. & KUHLEBRANDT, W. 2006. Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. *Embo. J.* (25), 3702-3713.
- ZGURSKAYA, H. I. & NIKAIDO, H. 2000. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol. Microbiol.* (37), 219-225.
- ZHANG, Y., MUYRERS, J. P., TESTA, G. & STEWART, A. F. 2000. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* (18), 1314-1317.
- ZIEMER, C. J. & STEADHAM, S. R. 2003. Evaluation of the specificity of Salmonella PCR primers using various intestinal bacterial species. *Lett. Appl. Microbiol.* (37), 463-469.

9 ANHANG

Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Kochblut-Agar	wie Schafblut-Agar, jedoch 10 min bei 80 °C schwenken bis braun verfärbt	
Luria-Bertani Medium (LBM)	NaCl	5 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Bacto® Trypton	10 g
	NaOH (1 M)	1 ml
Luria-Bertani Agar (LBA)	NaCl	5 g
	Hefe-Extrakt	2,5 g
	Bacto® Trypton	5 g
	Bacto® Agar	16 g
	A. dest.	ad 1.000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,0
M9-Ca-Minimalmedium, mit Casaminoäuren supplementiert	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	64 g
	KH ₂ PO ₄	15 g
	NaCl	2,5 g
	NH ₄ Cl	5 g
	A. dest.	ad 3.000 ml
	MgSO ₄	1,23 g
	A. dest.	ad 4.000 ml
	autoklavieren	
	Casamino­säuren (vitaminfrei)	25,0 g
	NAD	0,4 g
	Thiamin	0,025 g
	A. dest.	ad 5.000 ml
	steril filtrieren (0,2 µm;)	
Müller-Hinton (MH)-Agar	Nr. 1.10414, Fa. Merck	
Schafblut-Agar	Blutagar (Basis), Fa. Merck	5 %
	Defibriniertes Schafblut	5 %
Serumbouillon	Standard-I-Nährbouillon, Fa. Merck	25 g
	Rinderserum	100 ml
	A. dest.	ad 1.000 ml
Schwärmplatten (0,35 % LB-Agar)	NaCl	5 g
	Hefe-Extrakt	2,5 g
	Bacto® Trypton	5 g
	Bacto® Agar	3,5 g
	A. dest.	ad 1.000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,0

Zeissler-Nährboden	Columbia-Agar, Fa. Merck	52,0 g
	Glukose	10,0 g
	Defibriniertes Schafblut	50 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml

Zellkulturmedien

LoVo-Epithelzellmedium	DMEM/Ham's F-12 Salze (1:1)	450 ml
	Fetales Kälberserum	50 ml
Makrophagenzell-Medium	Iscove's Modified MEM	450 ml
	Fetales Kälberserum	50 ml

Lösungen und Puffer

Anodenpuffer I	Tris-Base (1 M)	300 ml
	Methanol	200 ml
	<i>A. dest.</i>	500 ml
Anodenpuffer II	Tris-Base (1 M)	25 ml
	Methanol	200 ml
	<i>A. dest.</i>	775 ml
Blockstammlösung	Blocking Reagenz in <i>A. dest.</i> , Fa. Roche	10 % (v/v)
Chloroform-Isoamylalkohol	Chloroform	24 % (v/v)
	Isoamylalkohol	1 % (v/v)
Chloronaphthol-Methanol-Lösung	Chloronaphthol	0,12 g
	Methanol	40 ml
Coating-Puffer	Lösung A	17 ml
	Lösung B	8 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 100 ml
Coomassie-Entfärbelösung	Eisessig	10 ml
	Methanol	40 ml
	<i>A. dest.</i>	50 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant-Blau G250	100 mg
	Eisessig	10 ml
	Methanol	40 ml
	<i>A. dest.</i>	50 ml
CSPD-Gebrauchslösung	CSPD-Stammlösung (25 mM)	0,1 ml
	Detektionspuffer 3	9,9 ml
CTAB/NaCl-Lösung	Cetyltrimethylammonium bromid in NaCl	10 % (w/v)
Denaturierungslösung	NaOH in <i>A. dest.</i>	0,5 M
	NaCl in <i>A. dest.</i>	1,5 M

Detektionspuffer 1 (für DNS-Waschpuffer und Detektionspuffer 2)	Maleinsäure	25,21 g
	NaCl	17,52 g
	A. <i>dest.</i>	ad 2.000 ml
	NaOH (5 M)	ad pH 7,5
Detektionspuffer 2	Blockstammlösung (10 %) in Detektionspuffer 1	1 % (v/v)
Detektionspuffer 3	NaCl	5,85 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,17 g
	Tris-HCl (pH 9,5)	100 ml
	A. <i>dest.</i>	ad 1.000 ml
Di-Natrium-EDTA (0,5 M, pH 8,0)	Na ₂ EDTA	186,12 g
	A. <i>dest.</i>	ad 1.000 ml
	NaOH (Plättchen)	ad pH 8,0
DNS-Waschlösung 1	20 x SSC	10 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	in A. <i>dest.</i>	
DNS-Waschlösung 2	20 x SSC	0,5 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	in A. <i>dest.</i>	
DNS-Waschpuffer	Tween 20 in Detektionspuffer 1	0,3 % (v/v)
Elutionspuffer D	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13,8 g
	Tris-Base	1,2 g
	Harnstoff	480,5 g
	A. <i>dest.</i>	ad 1.000 ml
	HCl (1 M)	ad pH 5,9
Elutionspuffer E	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	13,8 g
	Tris-Base	1,2 g
	Harnstoff	480,5 g
	A. <i>dest.</i>	ad 1.000 ml
	HCl (1 M)	ad pH 4,5
ES-Puffer	Na ₂ EDTA	46,56 g
	NaOH (Plättchen)	ad pH 9,0
	Na-Laurolylsarcosin	2,5 g
	kurz vor Gebrauch zugeben: Proteinase K (20 mg/ml)	ad 0,65 mg/ml
Glycerinwasser (10 %)	Glycerin in A. <i>dest.</i>	10 % (v/v)
HCl-Lösung	Salzsäure in A. <i>dest.</i>	0,25 M

Hybridisierungslösung	Formamid	50 ml
	20 x SSC	25 ml
	Blockierungsreagenz	2 g
	Na-Laurolylsarcosin	0,1 g
	SDS (10 %)	0,2 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 100 ml
Kathodenpuffer	Tris (1 M)	25 ml
	6-Aminocaprinsäure	5,25 g
	Methanol	200 ml
	<i>A. dest.</i>	770 ml
Lämmli-Probenpuffer	Tris-HCl (50 mM, pH 6,8)	1,25 % (v/v)
	Glycerin	1 % (v/v)
	SDS	2 % (v/v)
	β -Mercaptoethanol	0,5 % (v/v)
	Bromphenolblau (0,1 %)	0,25 % (w/v)
	in <i>A. dest.</i>	
Loading-Puffer (6 x)	Bromphenolblau	25 mg
	Ficoll	1,5 g
	<i>A. dest.</i>	9,5 ml
Lösung A	Na_2CO_3 in <i>A. dest.</i>	0,2 M
Lösung B	NaHCO_3 in <i>A. dest.</i>	0,2 M
Lysepuffer	NaOH	0,4 M
	SDS	2 %
	in <i>A. dest.</i>	
Lysepuffer B	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,8 g
	Tris-Base	1,2 g
	Harnstoff	480,5 g
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
	NaOH (1 M)	ad pH 8,0
NaCl (5 M)	NaCl	292,2 g
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
OPD-Substratpuffer (pH 7,0)	Zitronensäuremonohydrat	4,67 g
	NaH_2PO_4	9,15 g
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
Neutralisationslösung	Tris-HCl (pH 8,0)	0,5 mM
	NaCl	1,5 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	in <i>A. dest.</i>	
Phosphat-gepufferte Saline (1xPBS, pH 7,4)	NaCl	10 g
	KCl	0,25 g
	KH_2PO_4	0,25 g
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,8 g
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
PBS-Tween, pH 7,4 (ELISA)	1 x PBS mit Zusatz von Tween 20,	1 % (v/v)

PBS-Tween, pH 7,2 (Immuno-Blot)	NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,47 g
	Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
	NaCl	8,18 g
	Tween 20	0,5 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
PET IV-Puffer	NaCl (5 M)	40 ml
	Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	1 ml
	Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8,0)	4 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 200 ml
PFGE-Lyselösung	NaCl (5 M)	50 ml
	Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	1,25 ml
	Na ₂ EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
	Na-Laurolylsarcosin	1,25 g
	Na-Desoxycholat	0,5 g
	<i>A. dest.</i>	ad 250 ml
	kurz vor Gebrauch zugeben:	
	RNAse in <i>A. dest.</i> (10 mg/ml)	2 µl/ml
	Lysozym in <i>A. dest.</i> (50 mg/ml)	1 mg/ml
Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol	Phenol (58 °C)	25 % (v/v)
	Chloroform	24 % (v/v)
	Isoamylalkohol	1 % (v/v)
Proteinase K-Lösung	Proteinase K	100 mg
	<i>A. dest.</i>	1 ml
Proteinase K-Lösung (für ES-Puffer)	Proteinase K	20 mg
	<i>A. dest.</i>	1 ml
Saline-Sodium-Citrat (20 x SSC, pH 7,0)	NaCl	3 M
	Na-Citrat (pH 7,0)	0,3 M
	in <i>A. dest.</i>	
SDS-Elektrophoresepuffer (10 x)	Tris-Base	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
SDS-Trenngel (12,5 %, Mini)	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	5 ml
	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
	SDS (20 %)	62,5 µl
	Harnstoff	3,75 ml
	APS (10 %)	60 µl
	TEMED	10 µl
	<i>A. dest.</i>	890 µl

SDS-Sammelgel (5 %, Mini)	Acrylamid/Bisacrylamid (50 %/1,5 %)	250 μ l
	Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	250 ml
	SDS (20 %)	12,5 μ l
	Harnstoff	1,5 ml
	APS (10 %)	75 μ l
	TEMED	2,5 μ l
	<i>A. dest.</i>	450 μ l
Substratlösung	1 x PBS	7 ml
	Chloronaphthol-Methanol-Lösung	3 ml
	H ₂ O ₂ (30 %)	5 μ l
TAE-Laufpuffer (50 x)	Tris-Base	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 1.000 ml
TBE (10 x)	Tris-Base	54 g
	Borsäure	27,5 g
	Na-freies EDTA (0,5 M, pH 8,0)	20 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 500 ml
TBE (0,5 x)	TBE (10 x)	50 ml
	<i>A. dest.</i>	950 ml
TE (10:1)	Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	2,5 ml
	Di-Na-EDTA (0,5 M)	1 ml
	<i>A. dest.</i>	ad 500 ml
TE-PMSF	PMSF in Isopropanol (100 mM, 56 °C)	240 μ l
	TE (10:1)	16 ml
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	HCl	ad pH 8,0
	in <i>A. dest.</i>	
TFB I (pH 5,8)	K(OAc)	30 mM
	MnCl ₂	50 mM
	KCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	in <i>A. dest.</i>	
Glycerin	15 % (v/v)	
TFB II (pH 7,0)	Morpholinpropansulfonsäure (pH 7,0)	10 mM
	KCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	in <i>A. dest.</i>	
	Glycerin	15 % (v/v)
Transferlösung	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
	in <i>A. dest.</i>	

Tris-HCl (2 M, pH 8,0)	Tris-Base A. <i>dest.</i> HCl (1 M)	242,2 g ad 1.000 ml ad pH 8,0
Waschpuffer C	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Tris-Base Harnstoff A. <i>dest.</i> HCl (1 M)	13,8 g 1,2 g 480,5 g ad 1.000 ml ad pH 6,3

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen und ohne deren Unterstützung und Beistand die Durchführung nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Möglichkeit in so angenehmem Arbeitsklima und unter besten Bedingungen diese Arbeit am Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rolf Bauerfeind. Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind für die Überlassung des Themas und die Betreuung des Promotionsvorhabens. Seine Ideen und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Meiner Betreuerin Frau Dr. Stefanie Barth danke ich für Ihre aufopferungsvolle Betreuung, die vielen konstruktiven Diskussionen und ihr persönliches Engagement, das weit über das übliche Maß hinausging. Frau Anja Schwanitz danke ich, dass sie mich fast drei Jahre in ihrem Labor „ertragen“ hat, mir technisch und moralisch immer helfend zur Seite stand und ich ihren Traktor fahren durfte. Meine Mit-Doktoranden Abdybek und Christiane sind im Laufe der Arbeit zu lieben Wegbegleitern und Freunden geworden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für Förderung durch das Stipendium im Graduiertenkolleg 455 „Molekulare Veterinärmedizin“. Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger, Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind, Frau Jana Heber und den Kollegiatinnen und Kollegiaten des Graduiertenkollegs danke ich für die schöne Zeit, die fachlich und menschlich für mich sehr wertvoll war.

Herrn Dr. Karsten Tedin und seiner Arbeitsgruppe, Freie Universität Berlin, danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor die Herstellung von bakteriellen Knockout-Mutanten zu erlernen und für die Überlassung der notwendigen Bakterienstämme und Plasmide. Besonderer Dank auch für die Durchführung der Gentamicin-Protektionsassays sowie für die vielen wertvollen Tipps.

Herrn PD Dr. Christian Menge und Herrn Dr. Etienne Moussay aus unserem Institut danke ich für die Hilfestellung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Herrn Dr. Amir Abdulmawjood, Institut für Lebensmittelhygiene am Fachbereich Veterinärmedizin in Gießen, danke ich für die Hilfe bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese.

Den Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes danke ich für die schöne Zeit und die familiäre Atmosphäre, die mir stets in guter Erinnerung bleiben werden.

Shirin danke ich für Ihre Hilfe, ihren Beistand und ihre Geduld.

Und schließlich danke ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Promotion nach besten Kräften unterstützt haben und ohne die die Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5366-4



9 783595 366600