
Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Infection and Immunity



**Replikation von
enteroinvasiven *Escherichia coli* und
Salmonella enterica Serovar Typhimurium Stämmen
in Epithelzellen unter besonderer Betrachtung des
Kohlenstoffmetabolismus**

**Replication of
enteroinvasive *Escherichia coli* and
Salmonella enterica Serovar Typhimurium strains
in epithelial cells with particular examination of the
carbon metabolism**

vorgelegt von

Andreas Götz

aus

Birkenfeld bei Marktheidenfeld

Würzburg, 2010

Eingereicht am: 28.01.2010

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r:	Prof. Dr. Thomas Hünig
1. Betreuer:	Prof. Dr. Werner Goebel
2. Betreuer:	Prof. Dr. Roland Benz
3. Betreuer:	Prof. Dr. Aladar Szalay

Tag des Promotionskolloquiums: 02.07.2010

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Replikation von enteroinvasiven *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Stämmen in Epithelzellen unter besonderer Betrachtung des Kohlenstoffmetabolismus“ nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt und von mir selbständig durchgeführt und verfaßt wurde. Ich habe keine Hilfe oder andere Unterstützung von dritten Personen gegen Bezahlung erhalten.

Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Bis heute habe ich neben dem akademischen Grad „Diplom-Biologe Univ.“ keine weiteren akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Würzburg, den 28.01.2010

Meinen Eltern

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. Werner Goebel für die Vergabe des hoch interessanten Themas und für den wissenschaftlichen Freiraum, es zu bearbeiten. Seine kritische wissenschaftliche Unterstützung hat einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Weiterhin möchte ich Hr. Prof. Dr. Ulf Rüdiger Rapp für seine Betreuung im Rahmen des Deutsch-Französischen Graduiertenkollegs danken und Hr. Prof. Dr. Roland Benz, daß er kurzfristig bereit war, die Begutachtung für den erkrankten Hr. Prof. Dr. Ulf Rüdiger Rapp zu übernehmen.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch Prof. Dr. Aladar Szalay für seine Betreuung und Hilfe während der Durchführung der Arbeiten.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Thomas Rudel, daß ich nach der Neubesetzung des Lehrstuhls meine Arbeit in der Mikrobiologie beenden durfte.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich an Monika Götz richten. Nicht nur ihre stete Hilfsbereitschaft bei unzähligen Anliegen, sondern insbesondere die skurrilen Anekdoten über das Leben in einem Labor und außerhalb davon machten die Arbeitsatmosphäre in C238 einzigartig.

An Dr. Eva Eylert von der Technischen Universität München möchte ich ebenfalls ein großes Dankeschön richten für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Auswertung der ^{13}C -Isotopologienexperimente und der Erstellung der Publikation. Natürlich geht mein Dank auch an Hr. Dr. Wolfgang Eisenreich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Auch meiner langjährigen Nachbarin in C237, Dr. Stephanie Weibel, gebührt ein herzliches Dankeschön. Im gleichen Zug möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe von Prof. Szalay für die freundliche Aufnahme in den Mittagspausen bedanken.

Ein Dank auch dem Deutsch-Französischen Graduiertenkolleg Würzburg-Nizza GCWN 1141 für die wissenschaftlichen Diskussionen und Literaturbeiträge in den Seminarrunden. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Katharina Galmbacher für die Hilfe bei der Durchführung dieses wirklich lange dauernden MACS[®]-Versuches bedanken.

Den wichtigsten Personen, meinen Eltern, möchte ich zum Schluß danken. Ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Zuspruch während der Promotion waren mir eine große Hilfe.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	x
Summary	xii
1 Einleitung	14
1.1 Die Gattung <i>Salmonella</i>	14
1.1.1 Molekulare Pathogenese von <i>Salmonella</i>	16
1.1.2 Die Reifung der <i>Salmonella</i> -enthaltenden Vakuole.....	18
1.2 Die Gattungen <i>Escherichia</i> und <i>Shigella</i>	19
1.2.1 Molekulare Pathogenese von <i>Shigella</i> / <i>EIEC</i>	20
1.2.2 Adaptionen von <i>Shigella</i> / <i>EIEC</i> an die intrazelluläre Lebensweise.....	22
1.3 Der Metabolismus von Pathogenen während einer Infektion	23
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	27
2 Material	29
2.1 Bakterienstämme	29
2.2 Zelllinien	31
2.3 Mausinzuchtlinie	32
2.4 Desoxyribonukleinsäuren	32
2.4.1 Oligonukleotide.....	32
2.4.2 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	34
2.5 Lösungen, Puffer und Chemikalien	35
2.5.1 Agarosegelelektrophorese.....	35
2.5.2 Southern-Blot.....	35
2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.5.4 Silberfärbung.....	36
2.5.5 Proteinisolierung für Western-Blot.....	36
2.5.6 Western-Blot.....	37
2.5.7 β -Galaktosidasetest.....	37
2.5.8 Bakterienisolierung aus Caco-2-Zellen für ^{13}C -Isotopolog- Perturbationsanalyse.....	37
2.5.9 Gewebefixierung für Immunfluoreszenzfärbung.....	37
2.5.10 Tumorverdau für magnetische Zellsortierung (MACS [®]).....	38
2.5.11 Sonstige Puffer und Lösungen.....	38
2.6 Bakterien- und Zellkultur	39
2.6.1 Medien für die Bakterienkultur.....	39
2.6.2 Medien für die Zellkultur.....	42
2.6.3 Medienzusätze, Farbstoffe und Antikörper.....	42
2.7 Gebrauchsfertige Analysesets, Lösungen und Längenstandards	44
2.8 Geräte	44
2.9 Computerprogramme	46
3 Methoden	47
3.1 Bakterienkultur	47
3.1.1 Anlegen einer Stammkultur.....	47
3.1.2 Animpfen einer Flüssigkultur.....	47
3.1.3 Herstellung elektrokompeter Zellen.....	47
3.1.4 Herstellung von Aliquots für die Mikroinjektion.....	47
3.1.5 Isolierung des Lipopolysaccharids (LPS).....	47
3.1.6 Ermittlung des bakteriellen Wachstums im Minimalmedium.....	48
3.1.7 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität.....	48
3.2 Molekulargenetische Methoden	49
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNS.....	49

3.2.2	Isolierung chromosomaler DNS	49
3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
3.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel	50
3.2.5	Bestimmung der DNS-Konzentration und des Reinheitsgrades	51
3.2.6	Deletion von Genen in <i>E. coli</i> und <i>S. Typhimurium</i> nach Datsenko und Wanner	51
3.2.7	Spaltung von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	52
3.2.8	Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNS	53
3.2.9	Ligation gespaltener DNS	53
3.2.10	Transformation von Plasmid-DNS	53
3.2.11	Southern-Blot	54
3.3	Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel	55
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	55
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	56
3.3.3	Silberfärbung des Lipopolysaccharids	56
3.3.4	Western-Blot	56
3.4	Methoden der Zellkultur	57
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	57
3.4.2	Bestimmung der Lebendzellzahl eukaryotischer Zellen	57
3.4.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	58
3.4.4	Mikroinjektion	58
3.4.5	Bakterielle Kulturbedingungen vor einer Infektion	59
3.4.6	Proteinisolierung aus infizierten Zellen für Western-Blots	59
3.4.7	Adhäsionsassay	60
3.4.8	Invasions- und Replikationsassay	60
3.4.9	Messung der Glukoseverwertung mit D-[U- ¹⁴ C ₆]-Glukose	61
3.4.10	¹³ C-Isotopolog-Perturbationsanalyse	61
3.5	Tierexperimente	62
3.5.1	Haltung von BALB/cOlaHsd-Mäusen	62
3.5.2	Bestimmung der Bakterienzahl in Leber, Milz und Tumor	63
3.5.3	Histologie und Immunfluoreszenzfärbung	63
3.5.4	magnetische Zellsortierung	64
3.6	Statistische Methoden	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Replikation von <i>S. Typhimurium</i> 14028s im Zytoplasma von Epithelzellen nach Mikroinjektion oder Infektion	65
4.1.1	Der Stamm <i>S. Typhimurium</i> 14028 AL01 exprimiert ein R-Form LPS	65
4.1.2	Rauh-Mutanten zeigen eine erhöhte Adhärenz an Caco-2-Zellen	70
4.1.3	Konstruktion der <i>S. Typhimurium</i> 14028s Δ <i>sifA</i> -Mutante	70
4.1.4	Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> 14028s Δ <i>sifA</i> aktiviert die Caspasen 9 und 3 in HeLa-Zellen	71
4.2	Wachstum von <i>E. coli</i> und <i>S. Typhimurium</i> im Minimalmedium auf unterschiedlichen Kohlenhydraten und C₃-Substraten	75
4.2.1	<i>EIEC</i> 4608-58 und <i>EIEC</i> HN280 gehören zu unterschiedlichen phylogenetischen <i>E. coli</i> -Gruppen	75
4.2.2	Konstruktion der Glukose- und Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten von <i>E. coli</i> und <i>S. Typhimurium</i>	75
4.2.3	Die Aufnahme von Glukose durch enteroinvasive <i>E. coli</i> erfolgt überwiegend durch zwei PTS-Transporter	76
4.2.4	Der Phänotyp der <i>uhpT</i> -Deletionsmutanten unterscheidet sich zwischen den beiden <i>EIEC</i> -Stämmen	78

4.2.5	Wachstum von <i>EIEC</i> -Mutanten mit Deletionen in den wichtigsten Aufnahmesystemen für Glukose und Glukose-6-phosphat im Minimalmedium	80
4.2.6	<i>trans</i> -Komplementierung von <i>EIEC</i> 4608-58 $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i>	81
4.2.7	Wachstumseigenschaften der <i>ptsG</i> -, <i>manXYZ</i> - und/oder <i>glk</i> - oder <i>uhpT</i> -Mutanten von <i>S. Typhimurium</i> 14028s	82
4.2.8	Wachstum der beiden <i>EIEC</i> -Stämme und <i>S. Typhimurium</i> 14028s auf C ₃ -Substraten	84
4.3	Infektion von Caco-2-Zellen mit <i>EIEC</i> 4608-58, <i>EIEC</i> HN280 und <i>Stm</i> 14028s sowie deren Kohlenhydrataufnahmemutanten	87
4.3.1	Die Deletion von <i>ptsG</i> erhöht die Adhärenz von <i>EIEC</i> 4608-58 an Wirtszellen	87
4.3.2	Die Replikation der Glukose- und Glukose/Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten in Caco-2-Zellen ist nur geringfügig verlangsamt	89
4.4	Virulenz von <i>EIEC</i> 4608-58 WT und $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i>, <i>uhpT</i> in tumortragenden BALB/c-Mäusen	93
4.4.1	Die Replikation von <i>EIEC</i> 4608-58 $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i> ist im 4T1-Maustumormodell leicht attenuiert	93
4.4.2	Die Verteilung von <i>EIEC</i> 4608-58 im 4T1-Tumormodell entspricht annähernd der von <i>E. coli</i> K-12	95
4.5	¹³C-Isotopolog-Perturbationsanalyse von <i>EIEC</i> 4608-58, <i>EIEC</i> HN280 und <i>S. Typhimurium</i> 14028s nach Infektion von Caco-2-Zellen	99
4.5.1	Glukoseverwertung im Anabolismus von Caco-2-Zellen und Bakterien während der Infektion	99
4.5.2	Einbau der ¹³ C-Markierung aus extern zugegebener [U- ¹³ C ₆]-Glukose in die Aminosäuren der intrazellulär replizierenden Enterobakterien	101
4.5.3	Vergleich der ¹³ C-Isotopologenprofile der einzelnen Aminosäuren aus den drei Wildstämmen und ihrer entsprechenden $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i> -Mutanten	104
a.	Aminosäuren, die von Zwischenprodukten der Glykolyse abstammen und <i>de novo</i> synthetisiert wurden (Ala, Val, Ser, Gly)	105
b.	Aminosäuren, die von Zwischenprodukten des Citratzyklus abstammen und <i>de novo</i> synthetisiert wurden (Glu, Asp, Pro, Thr, Lys)	109
c.	Aminosäuren, die von Zwischenprodukten des Pentosephosphatzyklus abstammen und <i>de novo</i> synthetisiert wurden (His, Phe, Tyr)	113
4.5.4	Bei schneller proliferierenden Caco-2-Zellen zeigt sich ein höherer ¹³ C-Einbau in Aminosäuren der Wirtszellen und der intrazellulären bakteriellen Wildstämmen, aber nur teilweise in Aminosäuren der $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i> -Mutanten	115
4.5.5	Das ¹³ C-Isotopologemuster von Aminosäuren, die in nicht infizierten und infizierten Caco-2-Zellen <i>de novo</i> synthetisiert wurden, und der Einfluß der Infektion mit den intrazellulären Pathogenen auf den Metabolismus der Caco-2-Wirtszellen	117
4.5.6	Einbau der ¹³ C-Markierung aus Glukose in Aminosäuren während des extrazellulären Wachstums der Bakterien im RPMI Medium	123
5	Diskussion	127
5.1	Die Replikation von <i>Salmonella</i> Typhimurium 14028s im Zytoplasma von Epithelzellen	127
5.2	Glukose und Glukose-6-phosphat als Kohlenstoffquelle während des extra- und intrazellulären Wachstums von enteroinvasiven <i>Escherichia coli</i> und <i>S. Typhimurium</i>	130

5.3 Der Kohlenstoffmetabolismus humanpathogener Enterobakterien während der Replikation in Caco-2-Zellen	137
Literaturverzeichnis.....	145
Abkürzungsverzeichnis.....	166
Anhang 1: Vektorkarte von pAG125.....	169
Anhang 2: Vektorkarte von pAG119.....	170
Anhang 3: Vektorkarte von pAG124.....	171
Anhang 4: Vektorkarte von pAG078.....	172
Anhang 5: Vektorkarte von pAG123.....	173
Anhang 6: Neue Sequenzen der deletierten Genloki in <i>S. typhimurium</i> 14028s.....	174
Anhang 7: Neue Sequenzen der deletierten Genloki in <i>EIEC</i> 4608-58, <i>EIEC</i> HN280 und <i>E. coli</i> K-12.....	179
Anhang 8: Vergleich offenen Leseraster von <i>pgtP</i> aus <i>E. coli</i> APEC O1, <i>EIEC</i> 4608-58 und <i>EIEC</i> HN280.....	182
Anhang 9: Vergleich der Proteinsequenzen von PgtP aus <i>S. Typhimurium</i> LT2, <i>EIEC</i> 4608-58 und <i>EIEC</i> HN280.....	184
Anhang 10: Tabellen ¹³ C-Versuch „Bakterien kultiviert in RPMI“.....	185
Anhang 11: Tabellen ¹³ C-Versuch „nicht infizierte Caco-2-Zellen“.....	189
Anhang 12: Tabellen ¹³ C-Versuch „vormarkierte, nicht infizierte Caco-2-Zellen“... ..	191
Anhang 13: Tabellen ¹³ C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten <i>EIEC</i> 4608-58“.....	193
Anhang 14: Tabellen ¹³ C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten <i>EIEC</i> HN280“.....	197
Anhang 15: Tabellen ¹³ C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s“.....	201
Anhang 16: Tabellen ¹³ C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten <i>EIEC</i> 4608-58“.....	205
Anhang 17: Tabellen ¹³ C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit nicht FCS behandelten <i>EIEC</i> 4608-58“.....	213
Anhang 18: Tabellen ¹³ C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten <i>EIEC</i> HN280“.....	217
Anhang 19: Tabellen ¹³ C-Versuch „Infektion schnell proliferierender Caco-2-Zellen mit FCS behandelten <i>EIEC</i> HN280“.....	225
Anhang 20: Tabellen ¹³ C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit nicht FCS behandelten <i>EIEC</i> HN280“.....	227
Anhang 21: Tabellen ¹³ C-Versuch „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s“.....	231
Anhang 22: Tabellen ¹³ C-Versuch „Infektion schnell proliferierender Caco-2-Zellen mit FCS behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s“.....	235
Anhang 23: Verfolgung des ¹³ C-Kohlenstoffs durch zwei Runden des Citronensäurezyklus.....	237
Anhang 24: Anaplerotische Reaktion: Synthese von Oxalacetat aus PEP und CO ₂ durch die PEP-Carboxylase und nachfolgende Umsetzung im Citronensäurezyklus.....	240
Anhang 25: Anaplerotische Reaktion: Wiederauffüllung des Citratzyklus über den Glyoxylatweg und die Synthese von PEP aus Oxalacetat durch die PEP-Carboxykinase.....	242
Veröffentlichungen.....	244

Zusammenfassung

Salmonella Typhimurium und enteroinvasive *E. coli* (EIEC) sind fakultativ intrazelluläre Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Während erstere sich nach der Internalisierung durch eukaryotische Zellen normalerweise in einem spezialisierten Phagosom, der *Salmonella*-enthaltenden Vakuole (SCV), vermehren, replizieren EIEC im Zytoplasma der Wirtszellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst durch Mikroinjektion die Fähigkeit von *S. Typhimurium* 14028s untersucht, ebenfalls im Zytoplasma von Caco-2-Zellen replizieren zu können. Dabei wurde festgestellt, daß ein früher als *S. Typhimurium* 14028s WT bezeichneter Stamm eine Insertion eines Desoxythymidins an Position 76 des offenen Leserasters von *rfbP* trägt, einem Gen, dessen Protein an der LPS-Synthese beteiligt ist. Weiterhin synthetisierte dieser Stamm ein rauhes LPS. Aufgrund von Agglutination konnte der Rauh-Stamm nur mit geringem Erfolg mikroinjiziert werden. Hingegen lag 5 h nach der Mikroinjektion einer nicht invasiven Mutante von *Salmonella* mit vollständigem LPS der Anteil an Caco-2-Zellen, die mehr als 32 Bakterien enthielten, bei etwa 30 %. Der Anteil war 2-3 mal höher als bei früheren Mikroinjektionen in HeLa-Zellen. Daher wurde das Verhalten von HeLa-Zellen nach einer Infektion durch *S. Typhimurium* Δ *sifA* - einer Mutante, die aus der SCV ins Zytoplasma entkommt - untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die *sifA*-Mutante 10 h nach der Infektion die Aktivität der Caspasen 9 und 3 in HeLa-Zellen, aber nicht in Caco-2-Zellen induziert.

In weiteren Versuchen wurde die Bedeutung von Glukose, Glukose-6-phosphat und Mannose als Kohlenstoffquellen für die extra- und intrazelluläre Replikation zweier Isolate enteroinvasiver *E. coli* und eines *S. Typhimurium* Stammes analysiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst definierte Mutanten in den beiden wichtigsten Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesystemen (PTS) für die Aufnahme von Glukose und Mannose, *ptsG* und *manXYZ*, sowie im Antiporter für die Aufnahme von Glukose-6-phosphat, *uhpT*, konstruiert. Bei Wachstum im Minimalmedium mit Glukose als einziger C-Quelle waren die Generationszeiten aller Δ *ptsG*- und Δ *ptsG*, *manXYZ*-Mutanten im Vergleich zu den Wildstämmen deutlich verlängert. Ebenso wuchsen Δ *manXYZ*-Mutanten bzw. Δ *uhpT*-Mutanten deutlich langsamer auf Mannose bzw. Glukose-6-phosphat. Jedoch ergaben sich hierbei Stamm-spezifische Unterschiede. So erreichte EIEC 4608-58 Δ *uhpT* in der stationären Phase eine ähnliche Zelldichte wie der Wildstamm in Gegenwart von Glukose-6-phosphat und eine Δ *ptsG*, *manXYZ*-Mutante von *S. Typhimurium* 14028s konnte immer noch effizient mit Glukose wachsen.

Infektionsversuche mit Caco-2-Zellen zeigten weiterhin, daß die Deletion von *ptsG* zu einer signifikanten Erhöhung der Adhärenz und Invasivität von *EIEC* 4608-58 führt, während sich die intrazellulären Generationszeiten aller hier untersuchten Mutanten kaum veränderten. Selbst die $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Dreifachmutanten der drei hier verwendeten Enterobakterien und die $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *glk*-Mutante von *S. Typhimurium* 14028s konnten immer noch in Caco-2-Zellen replizieren, wenn auch mit Stamm-spezifisch verringerten Geschwindigkeiten.

¹³C-Markierungsexperimente mit [U-¹³C₆]-Glukose als Substrat ergaben jedoch, daß in der Tat alle hier untersuchten enterobakteriellen Wildstämme Glukose während der Replikation in Caco-2-Zellen unter Zellkulturbedingungen verwerten. Glukose-6-phosphat, Glukonat oder Fettsäuren konnten dagegen als wichtigste Kohlenstoffquellen für das intrazelluläre Wachstum ausgeschlossen werden. *EIEC* 4608-58 metabolisierte Glukose jedoch weniger effizient als *EIEC* HN280 und schien zudem noch zusätzlich C₃-Substrate aus der Wirtszelle aufzunehmen. Das Markierungsmuster zeigte einen Stamm-spezifischen Kohlenstofffluß durch Glykolyse und/oder Entner-Doudoroff-Weg, Pentosephosphatzyklus, Citratzyklus und den anaplerotischen Reaktionen zwischen PEP und Oxalacetat. Mutanten mit Deletionen in *ptsG* und *manXYZ* konnten auf alternative C₃-Substrate wechseln und glichen dies durch eine erhöhte Aufnahme von Aminosäuren aus den Wirtszellen aus.

Summary

Salmonella Typhimurium and enteroinvasive *E. coli* (EIEC) are facultative intracellular bacteria belonging to the family of *Enterobacteriaceae*. After internalisation by eukaryotic cells *Salmonella* normally resides inside a specialised phagosome called *Salmonella*-containing vacuole (SCV) whereas EIEC replicates inside the cytosol of host cells. In this study the ability of *S. Typhimurium* 14028s to replicate inside the cytosol of Caco-2 host cells was investigated by microinjection. It was thereby observed that a formerly used strain also called *S. Typhimurium* 14028s WT harboured an insertion of one deoxythymidin at position 76 of the *rfbP* open reading frame, a gene whose protein is involved in the LPS biosynthesis. Furthermore this strain expressed a rough LPS. Due to agglutination the microinjection procedure of the rough strain had only little success. But the percentage of Caco-2 cells that harboured more than 32 bacteria was about 30% 5 h after injection of a non invasive mutant of *Salmonella* expressing full-length LPS chains. This was 2-3 times higher than the results observed before using HeLa cells. Therefore, the behaviour of HeLa cells infected by *S. Typhimurium* Δ *sifA* - a mutant that escapes from the SCV into the cytosol - was studied. The results showed that the *sifA* mutant strain induced the activity of caspases 9 and 3 in HeLa cells 10 h after infection but not in Caco-2 cells.

In further experiments the contribution of glucose, glucose 6-phosphate and mannose as carbon sources for extra- and intracellular growth of two enteroinvasive *E. coli* isolates and one *S. Typhimurium* strain was analysed. Therefore, defined mutants of the most important phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems (PTS) taking up glucose or mannose, i.e. *ptsG* and *manXYZ*, were constructed as well as mutants carrying a deletion of *uhpT* the antiporter for uptake of glucose 6-phosphate. During growth of the resulting Δ *ptsG* and Δ *ptsG*, *manXYZ* mutants in minimal medium with glucose as sole carbon source considerably longer generation times were observed. Likewise, Δ *manXYZ* mutants and Δ *uhpT* mutants grew significantly slower on mannose or glucose 6-phosphate, respectively. But there were also strain specific differences. EIEC 4608-58 Δ *uhpT* reached a similar cell density as the wild-type strain during stationary phase when grown in the presence of glucose 6-phosphate and *S. Typhimurium* Δ *ptsG*, *manXYZ* could still grow efficiently on glucose.

Infections of Caco-2 cells showed that the deletion of *ptsG* increased the ability of EIEC 4608-58 significantly to adhere and invade these cells. But the intracellular generation times of all mutants under study were hardly changed. Even the triple mutants Δ *ptsG*, *manXYZ*,

uhpT of all three enterobacterial strains and the $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *glk* mutant of *S. Typhimurium* 14028s were still able to replicate in Caco-2 cells, albeit at strain specific lower rates.

¹³C-Isotopologue profiling using [U-¹³C₆]glucose as precursor revealed that in deed all analysed enterobacterial wild-type strains utilised glucose for their replication in Caco-2 cells under the applied conditions. Glucose 6-phosphate, gluconate and fatty acids could be ruled out as main carbon sources for intracellular growth. *EIEC* 4608-58 metabolised the applied glucose less efficiently than *EIEC* HN280 and seemed to take up C₃-compounds from the host cells in addition to glucose. The labelling patterns reflected strain specific carbon fluxes via glycolysis and/or Entner-Doudoroff pathway, pentose phosphate pathway, citric acid cycle and the anaplerotic reactions between PEP and oxaloacetate. Mutants carrying deletions in *ptsG* and *manXYZ* switched to alternative C₃-substrates and counterbalanced this by an increased uptake of amino acids from the host cells.

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Salmonella*

Die Familie der *Enterobacteriaceae*, benannt nach dem Vorkommen einiger ihrer Vertreter im menschlichen Verdauungstrakt, enthält sowohl freilebende Arten als auch Pflanzen- und Tierpathogene (Bell *et al.*, 2004). Zu den für den Menschen bedeutsamsten Gattungen aus dieser Familie zählen *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia* und *Salmonella*.

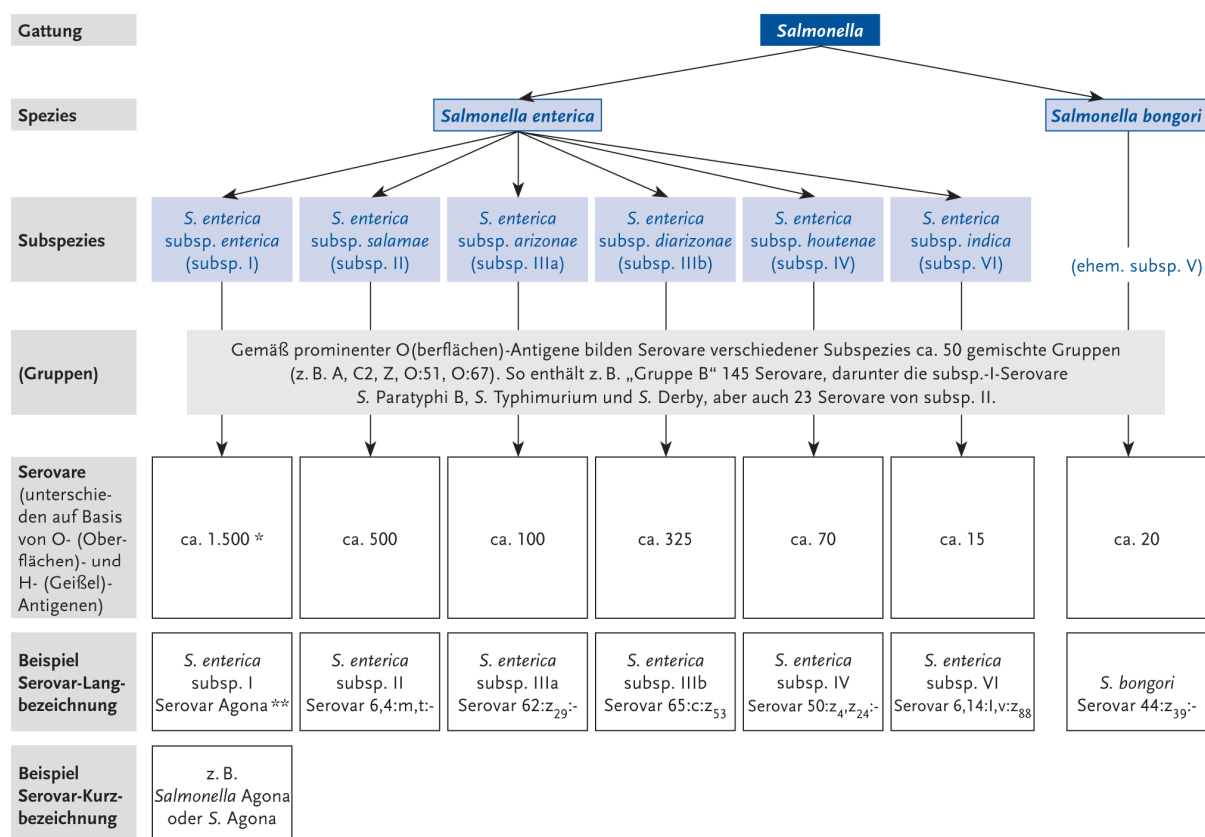


Abb. 1: Stammbaum der Gattung *Salmonella*. Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Robert Koch-Institut Berlin http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_Salmonellose.html)

* darunter auch *S. Typhi* und *S. Paratyphi A, B* oder *C*, aber auch *S. Enteritidis* (Gruppe D1) und *S. Typhimurium* (Gruppe B).

** nur Serovare der subsp. I tragen krankheitsbeschreibende, Personen- oder Ortsnamen (z. B. *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. London*), Serovar-Varianten werden mit der Antigenformel bezeichnet (z. B. eine monophasische Variante von *S. Typhimurium* mit 4,[5],12:i.-).

Die Gattung *Salmonella* wurde zum ersten Mal 1880 von Eberth beschrieben und 1884 von Gaffky kultiviert (Burrows, 1959). Es handelt sich hierbei um gramnegative, stäbchenförmige, nicht sporulierende und peritrich begeißelte Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm und einer Länge von 2-5 µm, die sich fakultativ anaerob und fakultativ intrazellulär vermehren können. Die Gattung wird inzwischen nur noch in 2 Arten unterteilt, *S. enterica* und *S. bongori*, die anhand unterschiedlicher biochemischer

Eigenschaften in weitere Unterarten und diese wiederum aufgrund ihrer Zellwand-(O-Antigene) und Flagellenantigene (H-Antigene) in weitere Serovare differenziert werden (Grimont and Weill, 2007; Abb. 1).

Im Menschen und anderen Warmblütern wird Salmonellose, d. h. die Infektion des Magen-Darm-Traktes, überwiegend von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* verursacht. Allgemein verbreitete Serovare wie Typhimurium oder Enteritidis lösen dabei meist eine akute, aber selbstlimitierende Entzündung aus, wohingegen wirtsspezifische Serovare wie Typhi beim Menschen oder Gallinarum bei Geflügel oftmals zu schweren systemischen Infektionen führen (Stevens *et al.*, 2009). Wie Stevens *et al.* (2009) weiter ausführen, hängt jedoch die Virulenz von *Salmonella* nicht nur vom Treffen eines bestimmten Serovars auf einen bestimmten Wirtsorganismus ab, sondern vielmehr auch vom genetischen Hintergrund beider und dem Immunstatus des Wirtes. So existieren selbst innerhalb eines Serovars wie Typhimurium verschiedene aus Tieren und Menschen isolierte Stämme, die sich in ihrer Virulenz für Mäuse unterscheiden (Heithoff *et al.*, 2008), und solche, die streng wirtsspezifisch sind (Rabsch *et al.*, 2002). Dieses Phänomen wurde auch bei Nutztieren beobachtet und erschwert die Diagnose eines Befalls mit Salmonellen in der Nutztierhaltung, die ein wesentliches Reservoir für nicht typhoide Erkrankungen beim Menschen darstellt. So wird geschätzt, daß alleine in den USA 1,4 Millionen Fälle von nicht typhoider Salmonellose pro Jahr mit 168.000 Arztbesuchen, 15.000 Krankenhausaufenthalten und 400 Todesfällen auftreten (Voetsch *et al.*, 2004), die Kosten von etwa 2,6 Milliarden Dollar verursachen (<http://www.ers.usda.gov/data/foodborneillness/>; Stevens *et al.*, 2009). In Entwicklungsländern mit schlechteren hygienischen Standards dürfte die Zahl der Erkrankungen noch beträchtlich höher sein. Das vermehrte Auftreten multiresistenter Stämme von *Salmonella*, auch verursacht durch den Einsatz von Antibiotika in der Viehzucht (Ahmed *et al.*, 2009), der ansteigende weltweite Reiseverkehr, der zu einer schnelleren Ausbreitung von Erregern führt, sowie die erhöhte Anzahl immunsuprimierter Patienten erschweren die Therapie zunehmend (Norrby *et al.*, 2005).

Obwohl die molekularen Infektionsmechanismen und spezifischen Anpassungen vieler Pathogene wie *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* und weiterer Erreger in den letzten Jahrzehnten gründlich erforscht wurden und zum Teil bis auf das molekulare Niveau bekannt sind (Galan, 2009; Kumar and Valdivia, 2009; Pizarro-Cerda and Cossart, 2009; Ray *et al.*, 2009), scheint es weiterhin schwierig zu sein, aus diesen Erkenntnissen neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln (Bumann, 2009). Dies mag daran liegen, daß der Schwerpunkt der Arbeiten bisher auf individuellen Faktoren von Pathogenen und/oder

Wirtszellen liegt und sich die Entwicklung neuer Medikamente, die nur bei einer Krankheit anwendbar sind, wirtschaftlich kaum lohnt, solange noch günstige und breit anwendbare Ersatzprodukte zur Verfügung stehen. Daher scheint es notwendig zu sein, die gewonnenen Erkenntnisse zusammenzufassen und *in silico* Modelle zu entwickeln, welche die komplexen Netzwerke der Wirt-Pathogen-Interaktion mit ihren Hunderten von wirtszellulären und bakteriellen Faktoren beschreiben, um die Reaktion des Systems auf äußere Eingriffe mit Medikamenten möglichst schnell und günstig vorhersagen zu können (Forst, 2006; Bumann, 2009).

1.1.1 Molekulare Pathogenese von *Salmonella*

Im Allgemeinen werden Salmonellen über kontaminierte Nahrung, risikoreich sind vor allem nicht gekühltes Hackfleisch, rohes oder nur halb gegartes Fleisch, Geflügel und Eier, oder durch Schmierinfektionen aufgenommen. Die Anzahl der Bakterien, die schließlich den Dünndarm erreicht, hängt wesentlich von der Passage durch den sauren Magen ab. So wird eine niedrigere Infektionsdosis benötigt, wenn die Bakterien mit flüssigen Nahrungsmitteln aufgenommen werden, die den Magen schnell passieren, oder wenn sie zusammen mit Stoffen in den Magen gelangen, die den pH-Wert neutralisieren. Schätzungsweise sind 10^5 - 10^{11} Bakterien notwendig, um eine Infektion zu etablieren (Blaser and Newman, 1982). Auch setzt eine Vorbehandlung mit Streptomycin die notwendige Infektionsdosis bei Mäusen herab (Bohnhoff *et al.*, 1964). Vermutlich erleichtert dies die Adhärenz der Bakterien an die Peyerschen Plaques. Im Mausmodell scheinen dabei besonders die langen polaren Fimbrien (Lpf) eine Rolle zu spielen (Baumler *et al.*, 1996). *In vitro* reduziert eine Mutation in *lpfC* die Fähigkeit von *S. Typhimurium*, die M-Zellen der Peyerschen Plaques zu kolonisieren, wohingegen die Besiedlung von Enterozyten mit Mikrovillisaum davon nicht betroffen ist. Die auf dem pSLT-Plasmid von *S. Typhimurium* kodierten Fimbrien (Pef) scheinen diese Adhärenz an den Mikrovillisaum zu vermitteln (Baumler *et al.*, 1996). Zur Langzeitbesiedlung des Intestinaltraktes von resistenten Mäusen tragen jedoch nur die Fimbrienoperone *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std* und *sth* bei (Weening *et al.*, 2005).

Salmonella kann vermutlich auf verschiedenen Wegen das Dünndarmepithel überwinden. Der Hauptweg scheint jedoch über M-Zellen zu führen. Diese liegen über den Peyerschen Plaques und nehmen permanent Darminhalte auf, um die darin enthaltenen antigenen Strukturen den lymphoiden Zellpopulationen des Lymphfollikels zu präsentieren (Neutra *et al.*, 1987; Pappo and Ermak, 1989; Nicoletti, C., 2000). Während der Transzytose von *Salmonella* werden die infizierten M-Zellen zerstört, wodurch Lücken im Epithel entstehen, die den Bakterien den

Zugang erleichtern (Jones *et al.*, 1994). Daneben können sie aber auch in die Enterozyten der Darmwand eindringen (Jepson and Clark, 2001). *S. Typhimurium* wächst etwa 2 Tage logarithmisch in den lymphoiden Zellen und mesenterischen Lymphfollikeln der Peyerschen Plaques (Hohmann *et al.*, 1978; Lindgren *et al.*, 1996) und breitet sich gleichzeitig in Leber und Milz aus, wo der Keim hauptsächlich in Makrophagen repliziert (Richter-Dahlfors *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2001). Um in nicht phagozytische Zellen eindringen zu können, nutzen die Bakterien das Typ III Sekretionssystem der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (T3SS-1), das Effektorproteine zur Induktion von Membranausstülpungen in eukaryotische Zellen transloziert (Valdez *et al.*, 2009). SPI-1 defiziente *Salmonella*-Stämme können indes von CD18-exprimierenden Phagozyten im Darmlumen aufgenommen und in den Blutstrom transportiert werden, von wo aus sie anschließend Leber und Milz kolonisieren (Vazquez-Torres *et al.*, 1999).

Ein Teil der Effektorproteine, die über das T3SS-1 in die Wirtszellen sekretiert werden, wird benötigt, um durch Neuorganisation des Aktinzytoskeletts große Membranausstülpungen zu induzieren (Review McGhie *et al.*, 2009). Diese umschließen die Bakterien an deren Kontaktstelle mit der Wirtszellmembran, wodurch die Erreger letztlich in einem Phagosom in die Zelle aufgenommen werden. Der Transportapparat des T3SS-1 besteht aus einer Basis mit vielen Ringen, die von den Proteinen PrgK, PrgH und InvG der SPI-1, sowie aus einer dünnen, nadelähnlichen Struktur, die von dem Protein PrgI gebildet wird (Kubori *et al.*, 2000). Die Proteine der Ringbasis werden zunächst *sec*-abhängig transportiert und assoziieren im Periplasma mit Proteinen der inneren Membran. In diesem Stadium kann der Komplex nur Proteine, die zum Aufbau der Nadelstruktur benötigt werden, sekretieren. Erst wenn diese vollständig zusammengebaut ist, kann das Transportsystem weitere Proteine exportieren, einschließlich der Effektoren, die in das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen transloziert werden (Zhou and Galan, 2001).

Für letzteres werden zumindest die Proteine SipB, SipC und SipD benötigt, auch wenn sie nicht direkt am Transportprozeß beteiligt sind. Mutanten, bei denen eines dieser Proteine nicht mehr funktionell ist, können zwar weitere Effektoren in das Kulturmedium sekretieren, aber nicht mehr über die eukaryotische Zellmembran translozieren (Collazo and Galan, 1997). Die Interaktionen weiterer bekannter Effektoren mit Proteinen der Wirtszelle werden schon seit vielen Jahren untersucht und u. a. bei McGhie *et al.* (2009) dargestellt: Der C-Terminus von SipC begünstigt direkt die Polymerisation von Aktin, wodurch die Filamente rasch wachsen, während der N-Terminus diese bündelt (Hayward and Koronakis, 2002). SipA hingegen erniedrigt die für die Polymerisation kritische Aktinkonzentration und bindet an F-

Aktin, wodurch die Filamente mechanisch stabilisiert werden. Weiterhin erhöht SipA auch die Bündelungsaktivität des zellulären T-Plastins und verhindert, daß das zelluläre Protein ADF/cofilin an F-Aktin bindet, wodurch letzteres sonst depolymerisieren würde (Hayward and Koronakis, 2002; McGhie *et al.*, 2004; Patel and Galan, 2005; McGhie *et al.*, 2009).

Ohne direkte Interaktion mit Aktin stimulieren die Effektorproteine SopE und SopE2 die Polymerisation von Aktin, indem sie die Funktion zellulärer Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) imitieren. Dabei aktiviert SopE die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac-1, während SopE2 spezifisch für Cdc42 ist. Die dadurch stimulierten Signalwege führen zur Aktinkondensation mit Hilfe des Arp2/3-Komplexes (Patel and Galan, 2005). Die Inositolphosphat-Phosphatase SopB dephosphoryliert eine Reihe von Phosphoinositid- und Inositolphosphaten (Zhou *et al.*, 2001). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen, daß eine SopB-abhängige Stimulation des zellulären SH3-GEF die kleine GTPase RhoG aktiviert, die an der Umlagerung des Aktinzytoskeletts beteiligt ist (Patel and Galan, 2006). Nach der Aufnahme von *Salmonella* wird der ursprüngliche Zustand des Aktinzytoskeletts durch die Wirkung des GTPase aktivierenden Proteins (GAP) SptP wiederhergestellt, indem es die GTPase-Aktivität von Cdc42 und Rac-1 stimuliert (Fu and Galan, 1999; McGhie *et al.*, 2009).

1.1.2 Die Reifung der *Salmonella*-enthaltenden Vakuole

McGhie *et al.* (2009) beschreiben die Wanderung der *Salmonella*-enthaltenden Vakuole (SCV), die im Anschluß an die Phagozytose in Richtung der perinuklearen Region der Wirtszelle migriert: Dies geschieht durch Akquirierung des Rab7-interagierenden lysosomalen Proteins (RILP) während des Reifungsprozesses, das seinerseits mit dem Motorprotein Dynein interagiert. Die Nähe zum Golgi-Apparat könnte Verschmelzungen mit endosomalen und/oder exozytotischen Vesikeln zur Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen begünstigen (Ramsden *et al.*, 2007). In der Tat scheinen die Effektorproteine des T3SS der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (T3SS-2) SifA, SseG und SseF an der Umleitung der zellulären Exozytose hin zur SCV beteiligt zu sein (Kuhle *et al.*, 2006; McGhie *et al.*, 2009).

Die Aufrechterhaltung und Positionierung der SCV in der Wirtszelle ist ein kritischer Schritt im Infektionszyklus von *Salmonella*. Auch hierbei scheinen SseG und SseF eine Rolle zu spielen, indem sie die SCV entweder mit dem Golgi-Apparat verbinden oder die Aktivität des Dyneins herabsetzen (Deiwick *et al.*, 2006; Ramsden *et al.*, 2007). SifA hingegen bindet an das Wirtszellprotein SKIP (SifA und Kinesin interagierendes Protein), um so die PipB2-

induzierte Rekrutierung des Motorproteins Kinesin an die SCV zu inhibieren (Boucrot *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006). Weiterhin scheint SopB ebenfalls eine Rolle bei der Verankerung der SCV in der perinuklearen Region zu übernehmen, indem es vermutlich über den Rho/ROCK/MLC-Signalweg die Phosphorylierung der leichten Kette des Aktin-assoziierten Motorproteins Myosin II (MLC) vermittelt (Wasylnka *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009).

Nach der Positionierung der SCV beginnt die Vermehrung von *Salmonella*. Während dieser Replikationsphase induzieren die Bakterien die Bildung von LAMP-angereicherten tubulären Strukturen, genannt *Salmonella*-induzierte Filamente (Sifs), die sich von der SCV aus entlang der Mikrotubuli erstrecken. Vermutlich werden sie durch Fusion von späten Endosomen/Lysosomen mit der SCV erzeugt (Steele-Mortimer, 2008). Ihre genaue Entstehung und Funktion sind jedoch noch unklar, doch ist SifA unbedingt notwendig für ihre Bildung sowie zur Aufrechterhaltung der Integrität der SCV (Beuzón *et al.*, 2000; Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Möglicherweise interagiert SifA mit Rab7 und trennt so dessen Bindung an RILP, wodurch kein Dynein mehr an die Filamente rekrutiert würde (Ramsden *et al.*, 2007). Folglich würde dann die Interaktion von PipB2 mit Kinesin-1 überwiegen und die Verlängerung der Sifs vorantreiben (Knodler and Steele-Mortimer, 2005; Henry *et al.*, 2006). SseF und SseG scheinen ebenfalls an der Bildung der Sifs beteiligt zu sein, indem sie die Ansammlung von endosomalen Kompartimenten regulieren (Guy *et al.*, 2000), während SseJ und SpvB dem Prozeß entgegenwirken. Mutationen in *sseJ* oder *spvB* erhöhen die Anzahl der Sifs (Ramsden *et al.*, 2007), während eine Transfektion der Wirtszellen mit SseJ vor einer Infektion mit *Salmonella* die Sif-Bildung inhibiert (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Weiterhin scheint SseJ ebenfalls am Verlust der vakuolären Membran um die Bakterien und dem Entkommen einer *sifA*-Mutante in das Zytoplasma der Wirtszelle beteiligt zu sein, da eine *sseJ*, *sifA*-Doppelmutante die SCV nicht verlassen kann (Ruiz-Albert *et al.*, 2002; McGhie *et al.*, 2009). In späten Stadien der Infektion scheinen erhebliche Teile der SCV wieder in Richtung der Zellmembran zu wandern. Dieser Prozeß ist ebenfalls abhängig von Mikrotubuli, Kinesin und dem T3SS-2 Effektorprotein PipB2. Weiterhin ist dies mit einem Rückgang der Mengen an Effektorproteinen des T3SS-1 in der Zelle verbunden. Dieser Transfer von der perinuklearen Region in die Nähe der Zellmembran ermöglicht es den Bakterien, neue Zellen zu infizieren (Szeto *et al.*, 2009).

1.2 Die Gattungen *Escherichia* und *Shigella*

Bakterien der Gattung *Shigella* spp. und enteroinvasive *E. coli* (EIEC) rufen beim Menschen geschätzte 150 Millionen Fälle von Durchfallerkrankungen mit etwa 1 Million Todesfällen

pro Jahr hervor (Kotloff *et al.*, 1999). Ebenso wie bei den verwandten Salmonellen handelt es sich hierbei um gramnegative, stäbchenförmige und nicht sporulierende Bakterien, die fakultativ anaerob und fakultativ intrazellulär mit einem hohen Tropismus für Menschen und Primaten leben können (Review Schroeder and Hilbi, 2008). Schroeder and Hilbi (2008) geben einen umfassenden Überblick über die Evolution, die Pathogenese und intrazelluläre Adaption der Gattung *Shigella*, die in vier Arten, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* und *S. sonnei*, mit jeweils weiteren Serotypen anhand der O-Antigene unterteilt wird: Zahlreiche Studien zeigen jedoch, daß *Shigella* spp. zur Art *E. coli* gehört und keine eigene Gattung begründet (Ochman *et al.*, 1983; Pupo *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 1998; Fukushima *et al.*, 2002). Die Divergenz der Genomsequenzen von *S. flexneri* und *E. coli* K-12 beträgt nur etwa 1,5 % und ist damit deutlich geringer als zwischen *Salmonella* und *E. coli* (Lan and Reeves, 2002). Darüber hinaus besitzen Shigellen und *EIEC* ähnliche biochemische Eigenschaften und Virulenzfaktoren und rufen die gleichen klinischen Symptome hervor. Obwohl jedoch *EIEC* die Kriterien für die Gattung *Shigella* nicht vollständig erfüllen, zeigen Genomanalysen, daß sie näher mit *Shigella* als mit kommensalen *E. coli* verwandt sind (Lan *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007). Vergleichende Genomanalysen zeigen weiterhin, daß sich *Shigella* spp. und *EIEC* aus vielen *E. coli*-Stämmen durch konvergente Evolution entwickelt haben (Pupo *et al.*, 2000; Schroeder and Hilbi, 2008). Da Veröffentlichungen über enteroinvasive *E. coli* selten sind, wird daher im folgenden auf die Ergebnisse von Untersuchungen mit *Shigella* zurückgegriffen.

1.2.1 Molekulare Pathogenese von *Shigella*/*EIEC*

Shigellose zeichnet sich durch eine großflächige Zerstörung des Darmepithels aufgrund einer inflammatorischen Immunantwort nach der Invasion der Bakterien aus (Review Parsot, 2009). Zur Etablierung einer Infektion genügen bereits 10 bis 100 Shigellen, die nach oraler Aufnahme den Dickdarm erreichen (DuPont *et al.*, 1989; Schroeder and Hilbi, 2008). Da sie ihre eigentlichen Wirtszellen, die Enterozyten des Dickdarms, jedoch nur von der basolateralen Seite aus infizieren können, induzieren Shigellen zunächst ihre Aufnahme in M-Zellen (Wassef *et al.*, 1989; Sansonetti *et al.*, 1996). Nach der Transzytose, bei der im Gegensatz zu *Salmonella* die infizierten M-Zellen nicht zerstört werden, werden die Bakterien von residenten Makrophagen phagozytiert, deren Apoptose sie jedoch unmittelbar nach der Internalisierung induzieren (Zychlinsky *et al.*, 1996), wodurch weitere proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden (Sansonetti *et al.*, 2000).

Nach dem Entkommen aus Makrophagen können Shigellen mit Hilfe des durch die Operone *mxi* und *spa* kodierten T3SS ihre Aufnahme in die Enterozyten von der basolateralen Seite aus induzieren. Dieser Apparat ist auf dem etwa 220 kbp großen Virulenzplasmid in der sogenannten Eintrittsregion kodiert (Maurelli *et al.*, 1985) und wird hauptsächlich temperaturabhängig bei 37 °C exprimiert (Tobe *et al.*, 1991; Dagberg and Uhlin, 1992; Tobe *et al.*, 1993). Durch die Temperaturerhöhung kommt es zu einer Konformationsänderung der DNS, wodurch H-NS den Promotor von *virF* nicht mehr reprimieren kann. In der Folge bindet VirF an die Promotoren von *virB* und *icsA*, wodurch diese verstärkt exprimiert werden (Dorman *et al.*, 2001; Beloin and Dorman, 2003; McKenna *et al.*, 2003). VirB reguliert die Expression der Eintrittsregion und weiterer Virulenzproteine der Osp-Familie (Le Gall *et al.*, 2005; Schroeder and Hilbi, 2008). Das zusammengesetzte T3SS zeigt bei 37 °C im Kulturmedium aber nur eine geringe Aktivität. Vermutlich verschließt das hydrophile IpaD die Spitze der Sekretionsnadel durch Interaktion mit dem hydrophoben IpaB, das dadurch im Sekretionskanal zurückgehalten wird. Erst bei Kontakt mit einer Epithelzelle wird das T3SS vermutlich durch eine Konformationsänderung von IpaD aktiviert. In der Folge werden IpaB und IpaC sekretiert und inserieren in die Membran der Zielzelle (Menard *et al.*, 1994b; Espina *et al.*, 2006). Weiterhin wird die Expression weiterer Virulenzproteine, kontrolliert durch den Transkriptionsaktivator MxiE, induziert. Dazu ist jedoch noch der Coaktivator IpgC notwendig (Mavris *et al.*, 2002). Im ruhenden Zustand bindet IpgC an IpaB bzw. IpaC und wird dadurch titriert (Menard *et al.*, 1994a; Le Gall *et al.*, 2005). MxiE wiederum bindet an das T3SS-Substrat OspD1 und ist dadurch ebenfalls inaktiv (Parsot *et al.*, 2005). Durch die Aktivierung werden IpaB, IpaC und OspD1 sekretiert, was zur Aufhebung der Inhibition von IpgC und MxiE führt (Schroeder and Hilbi, 2008; Parsot, 2009).

IpaB bindet an den zellulären Rezeptor CD44, während der Komplex aus IpaBCD an $\alpha_5\beta_1$ -Integrin bindet. Beide zellulären Rezeptoren sind Teil der Lipid Rafts von eukaryotischen Zellmembranen (Watarai *et al.*, 1996; Lafont *et al.*, 2002). Ähnlich wie bei *Salmonella* induzieren auch Shigellen eine Umlagerung des Aktinzytoskeletts der Wirtszelle, indem IpaC die GTPasen Rac1 und Cdc42 aktiviert (Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). Weiterhin scheint IpgB1 die Aktivität der kleinen GTPase RhoG nachzuahmen, indem es an ELMO-Dock180 bindet und so die Aktivierung von Rac1 auslöst (Handa *et al.*, 2007). Rac1 wird ebenfalls als Reaktion auf die Destabilisierung des Mikrotubulinnetzwerkes durch die Cysteinprotease VirA aktiviert (Yoshida *et al.*, 2002). Das Effektorprotein IpgD hingegen hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-5-phosphat, wodurch sich das Aktinzytoskelett von der Zellmembran löst und damit die Neuorganisation

erleichtert (Niebuhr *et al.*, 2002). IpaA wiederum bindet an Vinculin und fördert so dessen Bindung an Aktin, wodurch dieses depolymerisiert und die Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix schwächt (Ramarao *et al.*, 2007). Dies könnte die Aufnahme der Bakterien erleichtern (Schroeder and Hilbi, 2008).

Im Gegensatz zu Salmonellen, die sich nach der Internalisierung in einer spezialisierten Vakuole vermehren, lysieren Shigellen das Phagosom schon nach 15-30 min mit Hilfe des Mxi-Spa T3SS und der Proteine IpaB, IpaC und IpaD, ohne daß dazu eine Ansäuerung notwendig wäre (Finlay and Falkow, 1988; High *et al.*, 1992; Barzu *et al.*, 1997; Picking *et al.*, 2005; Schroeder and Hilbi, 2008). Im Zytoplasma der Wirtszelle replizieren sie mit einer Generationszeit von etwa 40 min (Sansonetti *et al.*, 1986) und können sich durch polare Polymerisation von Aktin fortbewegen. Diese Motilität wird durch IcsA vermittelt. Die einseitige Lokalisierung und Aktivität von IcsA werden durch die Serinprotease SopA und die Apyrase PhoN2 reguliert (Shere *et al.*, 1997; Steinhauer *et al.*, 1999; Santapaola *et al.*, 2006). Der an der Oberfläche eines Pols der Bakterienzelle gebundene Autotransporter IcsA rekrutiert N-WASP und dieses wiederum den Arp2/3-Komplex aus der Wirtszelle (Egile *et al.*, 1999). Der so gebildete Komplex katalysiert die Polymerisation von Aktin zu einem Schweif, wodurch die Bakterien durch das Zytoplasma geschoben werden. Gleichzeitig degradiert die Cysteinprotease VirA am anderen Pol der Bakterienzelle wirtszelluläres α -Tubulin und erzeugt so eine Gasse im Mikrotubulinetzwerk der Zelle, durch die sich die Bakterien fortbewegen können (Yoshida *et al.*, 2006). Stoßen die Bakterien dabei unterhalb der Zellmembran in die benachbarte Zelle vor, können sie von dieser wiederum endozytiert werden. Nach der Lyse der Doppelmembran um die Bakterien mittels des T3SS und der Proteine IpaB, IpaC und IpaD können sie nun eine neue Replikationsrunde beginnen und sich weiter im Gewebe ausbreiten (Page *et al.*, 1999; Schroeder and Hilbi, 2008).

1.2.2 Adaptionen von *Shigella/EIEC* an die intrazelluläre Lebensweise

Die „Gattung“ *Shigella* besteht aus nicht motilen Bakterien, die mit wenigen Ausnahmen kein Gas aus fermentierbaren Kohlenhydraten bilden. Im Vergleich zu *E. coli* verwerten sie Kohlenhydrate weniger effizient und fermentieren weder Salicin, Adonitol noch Inositol. Auch Laktose wird von den meisten Stämmen mit Ausnahme von *S. sonnei* nicht abgebaut, solange die Bakterien in einem Standardkulturmedium gezüchtet werden (Farmer *et al.*, 1985; Ewing, 1986; Lan and Reeves, 2002). Die Reduktion der verwertbaren Kohlenstoffquellen im Vergleich zu *E. coli* scheint eine Anpassung von Shigellen an die biochemische Zusammensetzung des Zytoplasmas eukaryotischer Zellen zu sein, wohingegen

EIEC-Stämme auf einem etwas breiteren Spektrum von Substraten wachsen können und zum Teil auch beweglich sind (Lan and Reeves, 2002).

Der Verlust der eigenen Motilität wird durch einen aktinabhängigen Mechanismus zur Fortbewegung ersetzt. Dies verringert nicht nur den Energiebedarf der Bakterienzelle, sondern verhindert vermutlich auch eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 5, der angeborenen Immunabwehr und der zytoplasmatischen Nod-like-Rezeptoren Birc 1e und Ipaf durch Flagellin (Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Coers *et al.*, 2007; Fournier *et al.*, 2009). Jedoch induziert IcsA im Zytoplasma der Wirtszellen eine Autophagozytose der Bakterien, indem es das zelluläre Protein AGT5 bindet. Diesen Mechanismus, durch den Bestandteile des Zellinneren wie Proteine, aber auch Mitochondrien in eine Doppelmembran eingeschlossen und abgebaut werden (Kirkegaard *et al.*, 2004), umgehen Shigellen durch Sekretion von IcsB, das die Erkennungsstellen von IcsA für AGT5 maskiert (Ogawa *et al.*, 2005; Schroeder and Hilbi, 2008; Ray *et al.*, 2009).

1.3 Der Metabolismus von Pathogenen während einer Infektion

Obwohl die „klassischen“ Virulenzfaktoren intrazellulärer Pathogene, d. h. im besonderen die zur Invasion eukaryotischer Zellen, zum Entkommen aus oder zur Etablierung eines Phagosoms, zur Ausbreitung in infizierten Zellmonolayern und Geweben sowie zur Induktion von Apoptose bis heute ausführlich untersucht wurden, liegen die metabolischen Ereignisse während der intrazellulären Replikation weitestgehend im Dunkeln. Aber jüngste Untersuchungen belegen, daß metabolische Faktoren sowohl akute wie auch persistente Infektionen beeinflussen können (McKinney *et al.*, 2000; Chico-Calero *et al.*, 2002; Munoz-Elias and McKinney, 2005) und daß selbst in komplexen Organismen wie Mäusen mit ihrer Vielzahl an organischen Verbindungen und möglichen Substraten Stoffwechselwege nicht beliebig umgangen werden können. Darüber hinaus scheint die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle bei manchen Pathogenen direkten Einfluß auf die Transkription der Virulenzgene zu nehmen (Milenbachs *et al.*, 1997; Exley *et al.*, 2005; Bruggemann *et al.*, 2006).

Transportproteine, die an der Aufnahme von Nährstoffen insbesondere von Kohlenhydraten beteiligt sind, sind seit vielen Jahren sowohl in Bakterien als auch in eukaryotischen Zellen gut untersucht (Lengeler and Jahreis, 2009; Pfannkuche and Gabel, 2009). In *E. coli* sind darüber hinaus auch ihr Einfluß auf die Transkription über die Synthese von cAMP oder über den Transkriptionsregulator Mlc und zudem die wichtigsten katabolen Wege (Glykolyse, Pentosephosphatzyklus, Entner-Doudoroff-Weg, Citratzyklus und anaplerotische Reaktionen)

bekannt (Korner *et al.*, 2003; Bohm and Boos, 2004; Kim and Copley, 2007; Lemuth *et al.*, 2008). Doch trotz aller Untersuchungen zur Stoffaufnahme und zu den Metabolitflüssen ist das Zytoplasma eukaryotischer Zellen als ein möglicher bakterieller Replikationsort biochemisch nur schlecht charakterisiert (Metallo *et al.*, 2009). Wie Ray *et al.* (2009) anmerken, kann man zwar annehmen, daß aufgrund von Glukosetransportern (C- und Energiequelle) und Aufnahmesystemen für Aminosäuren (N-Quelle) das Zytoplasma eine geeignete Nische für die Vermehrung vieler Bakterien sein müßte, doch wenn dem so wäre, sollten weit mehr Pathogene dort replizieren, als dies bislang bekannt ist. Im Zytoplasma einer typischen eukaryotischen Zelle sind die Konzentrationen von Mg^{2+} (0,5 mM), Na^+ (5-15 mM) und Ca^{2+} (10^{-4} mM) niedrig, aber von K^+ (140 mM) hoch und der pH-Wert (7,2) liegt im neutralen Bereich (Alberts *et al.*, 2002). Des weiteren wird vermutet, daß das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion etwa 30:1 beträgt (Hwang *et al.*, 1992), wodurch das Zytoplasma eine reduzierende Umgebung darstellt, in der zudem Eisen überwiegend an Transportmoleküle wie Ferritin gebunden ist (Shi *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 2009). Jedoch scheint es auch beachtliche Unterschiede hinsichtlich antimikrobieller Mechanismen im Zytoplasma verschiedener Wirtszelltypen zu geben. So kann eine *S. Typhimurium* $\Delta sifA$ -Mutante zwar im Zytoplasma von Epithelzellen, nicht aber von murinen Makrophagen und Fibroblasten replizieren (Beuzon *et al.*, 2002; Perrin *et al.*, 2004). Die Verfügbarkeit organischer Nährstoffe im Zytoplasma wie auch die Bedingungen in der SCV, als Beispiel für ein phagosomales bakterielles Kompartiment, sind demgegenüber aber kaum erforscht. Während zytoplasmatisch replizierende Shigellen vermutlich direkt durch die membranständigen Aufnahmesysteme der Wirtszelle versorgt werden, könnten durch Wechselwirkungen mit endozytotischen bzw. exozytotischen Vesikeln vielleicht Inhalte aus dem extrazellulären Medium bzw. dem Golgi-Apparat in die SCV gelangen (Drecktrah *et al.*, 2007; Review McGhie *et al.*, 2009). Allerdings besitzen Endosomen auch wirksame Nährstofftransporter, die den Inhalt selektiv aussortieren (Lloyd, 1996; Winchester, 2001; Bumann, 2009).

Erste Hinweise auf die Verfügbarkeit von anabolen Monomeren während der zytoplasmatischen oder phagosomalen Replikation in eukaryotischen Zellen stammen aus Untersuchungen mit auxotrophen Mutanten. So zeigen die Ergebnisse von Marquis *et al.* (1993) und Stritzker *et al.* (2004), daß *Listeria monocytogenes* intrazellulär auf die *de novo* Synthese von Adenin, Threonin und aromatischen Aminosäuren angewiesen ist, woraus sich ableiten läßt, daß diese nur begrenzt zur Verfügung stehen. Ähnliche Versuche mit *Shigella flexneri* zeigen, daß auch dieser pathogene Keim bei einem Defekt in der *de novo* Synthese

von aromatischen Aminosäuren sowie von Diaminopimelinsäure, Thymin und Guanin schlechter replizieren kann (Noriega *et al.*, 1996; Cersini *et al.*, 1998; Cersini *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2009). Für *Salmonella*, das im Gegensatz zu den bisher genannten Pathogenen in einer Vakuole repliziert, wurden nahezu die gleichen Anforderungen an den Anabolismus gefunden. Hier bewirken u. a. Mutationen in den Genen *guaBA*, *aroA* und *hisG* eine Verringerung der Virulenz (Hoiseith and Stocker, 1981; Chatfield *et al.*, 1992; Wang, J. Y. *et al.*, 2001).

Neben diesen Gemeinsamkeiten im Bedarf an anabolen Monomeren ist über den Katabolismus intrazellulärer Bakterien jedoch kaum etwas bekannt (Munoz-Elias and McKinney, 2006; Bumann, 2009). Erste Hinweise darauf, welche Kohlenstoffquellen im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen zur Verfügung stehen könnten, lieferten die Versuche von Chico-Calero *et al.* (2002) mit *Listeria monocytogenes* Δhpt . Diese zeigen, daß *L. monocytogenes* zur intrazellulären Replikation Glukose-6-phosphat oder verwandte phosphorylierte Kohlenhydrate aufnimmt. Hpt ist der listerielle Transporter für diese Substrate, dessen Expression unter der Kontrolle des Virulenzgenregulators PrfA steht (Ripio *et al.*, 1997). Eine Deletion dieses Gens führt zu einer eingeschränkten intrazellulären Replikationsfähigkeit und Attenuierung *in vivo*. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen weiterhin, daß *L. monocytogenes* intrazellulär nicht ausschließlich phosphorylierte Kohlenhydrate verwertet, sondern ebenfalls Glyzerin metabolisiert (Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2008).

Auch bei *Shigella flexneri* wurde eine verstärkte Transkription von *uhpT*, dem enterobakteriellen Glukose-6-phosphattransporter, während der Infektion von Makrophagen und Epithelzellen festgestellt. Eine Deletionsmutante ist jedoch im Gegensatz zu *Listeria monocytogenes* nicht attenuiert (Runyen-Janecky and Payne, 2002; Lucchini *et al.*, 2005). Dasselbe Ergebnis wurde auch bei *S. Typhimurium* SL1344 beobachtet (Hautefort *et al.*, 2008). Beide Spezies besitzen homologe UhpT-Transporter (Island *et al.*, 1992), die durch ein Zweikomponentensystem aus UhpABC und die Katabolitrepession reguliert werden (Verhamme *et al.*, 2001; Verhamme *et al.*, 2002). Ihre Transkription ist daher in Gegenwart von Glukose niedrig.

Für die Enterobakterien *EIEC/Shigella* und *Salmonella* ist Glukose ein bevorzugtes Kohlenstoffsubstrat und wird bei millimolarer Konzentration hauptsächlich über die zwei Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesysteme (PTS) PtsG/Crr und ManXYZ aufgenommen (Curtis and Epstein, 1975; Stock *et al.*, 1982; Erni and Zanolari, 1985; 1986; Barabote and Saier, 2005). Die Aufnahme führt zur Induktion der Katabolitrepession und

erniedrigt bei hohen extrazellulären Glukosekonzentrationen die Expression cAMP-Crp-abhängiger Gene. Bei niedrigen, mikromolaren Glukosekonzentrationen erfolgt die Aufnahme über den hoch affinen ABC-Transporter LamB/MglABC (Review Ferenci, 1996; Seeto *et al.*, 2004). LamB ist ein Membranprotein, das in der äußeren Membran der Bakterien verankert ist. Es bindet extrazelluläre Glukose mit hoher Affinität und leitet sie ins Periplasma. Dort wird sie von dem ABC-Transporter MglABC gebunden und über die Zytoplasmamembran in die Bakterienzelle transportiert (Review Ferenci, 1996).

Darüber hinaus können beide Pathogene zusätzlich verschiedene C₂-, C₃-, C₄-, und C₅-Substrate wie Fettsäuren, Glycerin, Pyruvat, Laktat abbauen. C₄-Dicarbonsäuren kommen ebenfalls als mögliche Kohlenstoffquellen unter bestimmten Wachstumsbedingungen wie z. B. innerhalb eukaryotischer Zellen in Betracht. *EIEC/Shigella* und *Salmonella* sind somit typische heterotrophe und prototrophe Bakterien. Die Genomsequenzen zeigen, daß beide Pathogene über ein ähnliches metabolisches Reservoir verfügen, das alle Enzyme für die wichtigsten zentralen Stoffwechselwege wie Glykolyse, Entner-Doudoroff-Weg, Pentosephosphatzyklus, Citratzyklus, die Biosynthese von Aminosäuren und Nukleotiden sowie die wichtigsten anaplerotischen Reaktionen inklusive des Glyoxylatweges enthält (McClelland *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2004). Entsprechend ist ihr Wachstum in Kulturmedien unter *in vitro* Bedingungen ähnlich. Es ist jedoch nicht bekannt, wie diese Pathogene ihren eigenen Kohlenstoffmetabolismus während einer Infektion an den Metabolismus der Wirtszelle anpassen. Weitere Informationen über den intrazellulären Kohlenstoffmetabolismus von *Shigella/EIEC* und *Salmonella* wurden aus Untersuchungen mit Hilfe verschiedener *in vivo* Expressionstechniken, differentieller Genexpressionsprofile und Mutanten mit Defekten in spezifischen katabolen Reaktionen gewonnen.

Diese Studien zeigen, daß in zytoplasmatisch replizierenden *Shigella flexneri* die Gene für die Glukosetransporter *ptsG/crr* und *manXYZ* reprimiert sind, während die von *uhpT*, *glpF* und *ugp* kodierend für Transporter von Glukose-6-phosphat, Glycerin und Glycerin-3-phosphat induziert sind. Weiterhin sind die Gene für die Enzyme der Glykolyse herunterreguliert, während die Gene der Glukoneogenese (*fbp* und *pps*) verstärkt transkribiert werden (Runyen-Janecky and Payne, 2002; Lucchini *et al.*, 2005). Diese Daten deuten auf Glycerin und/oder Glycerin-3-phosphat als wichtigste Kohlenstoffquellen für zytoplasmatisch replizierende Shigellen hin.

In *S. Typhimurium* ergibt sich ein differenzierteres Bild während des Wachstums in der SCV innerhalb von J-774A.1-Makrophagen bzw. HeLa-Epithelzellen. Während in Makrophagen die Transkription der Gene für Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzyklus

reprimiert ist, bleibt das Expressionsniveau für Gene des Entner-Doudoroff-Weges nahezu unverändert. Zusätzlich sind in Makrophagen die Aufnahmesysteme für Glukonat *gntT*, Glukuronsäure/Galakturonsäure STM3134 und Galaktonat *dgoT* zusammen mit den Enzymen zur Umwandlung dieser Kohlenhydrate in Pyruvat und Glyzerinaldehyd-3-phosphat (*dgoK* und *dgoA*) hochreguliert. Diese Daten favorisieren Glukonat oder verwandte Kohlenhydrate als wichtigste intrazelluläre Kohlenstoffquelle in Makrophagen (Eriksson *et al.*, 2003). In HeLa-Zellen werden dagegen die Enzyme der Glykolyse und des Citratzyklus verstärkt exprimiert. Auch im Vergleich zu Makrophagen sind diese Gene zusammen mit den Genen für den Entner-Doudoroff-Weg stärker aktiv. Auch *ptsG* und *uhpT* zeigen in HeLa-Zellen eine höhere Transkriptionsrate im Vergleich zu Kulturen aus LB-Medium. Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß Glukose, phosphorylierte Zucker oder die Säuren bestimmter Kohlenhydrate wichtige Kohlenstoff- und Energiequellen in HeLa-Zellen sind (Hautefort *et al.*, 2008). Faßt man die Ergebnisse aus beiden Zelllinien zusammen, scheinen Salmonellen innerhalb der SCV Zugang zu Kohlenhydraten aus der Wirtszelle zu haben. In Übereinstimmung damit zeigt eine vor kurzem veröffentlichte Untersuchung von Bowden *et al.* (2009), daß Mutanten von *S. Typhimurium* 4/74 mit Deletionen in den wichtigsten Glukoseaufnahmesystemen und/oder Enzymen der Glykolyse in Raw 264.7-Makrophagen und in BALB/c-Mäusen attenuiert sind. Dies bestätigt die Notwendigkeit von Glukose und der Glykolyse für den intrazellulären Metabolismus von *S. Typhimurium*. In systemisch infizierten Mäusen, wo *Salmonella* überwiegend in phagozytischen Zellen repliziert, ist die Virulenz zusätzlich von einem durchgängigen Citratzyklus abhängig. Mutanten, bei denen eines der drei Enzyme deletiert ist, die Succinyl-CoA in Oxalacetat umwandeln (*sucCD*, *sdhCDA* bzw. *mdh*), sind attenuiert und eine *sucAB*-Mutante ist vollständig avirulent (Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Mercado-Lubo *et al.*, 2009). Dagegen scheinen Salmonellen nicht auf Glukoneogenese oder den Glyoxylatweg während der akuten Infektion von Mäusen angewiesen zu sein (Fang *et al.*, 2005; Tchawa Yimga *et al.*, 2006). Die Isocitratlyase scheint aber eine Rolle während der chronischen Infektion von Mäusen zu spielen. Nach diesen Ergebnissen scheinen Salmonellen auch *in vivo* bei einer Infektion von Mäusen begrenzten Zugang zu glykolytischen Substraten, vermutlich C₆-Kohlenhydrate, zu besitzen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Vorangegangene Mikroinjektionsversuche haben gezeigt, daß *S. Typhimurium* 14028s WT auch nach Mikroinjektion im Zytoplasma von Caco-2-Zellen replizieren kann. Es wurde aber auch gezeigt, daß eine *sifA*-Mutante die Apoptose in infizierten HeLa-Zellen induziert (Götz,

2005). Damit steht diese Arbeit im Widerspruch zu den Mikroinjektionsergebnissen von Goetz M. *et al.* (2001) mit Caco-2-Zellen und den Infektionsversuchen von Beuzón *et al.* (2002) mit HeLa-Zellen. Um diese Diskrepanzen aufzulösen, wurde die Zellmorphologie der beiden mikroinjizierten Bakterienstämme näher charakterisiert und weitere *Salmonella*-Stämme in Caco-2-Zellen injiziert. Des Weiteren wurde die Reaktion von HeLa-Zellen auf die Infektion mit der Δ *sifA*-Mutante analysiert.

Weiterhin wurde der Metabolismus von enteroinvasiven *E. coli* und *S. Typhimurium* während der Infektion humaner Darmepithelzellen näher untersucht, um festzustellen, welche metabolischen Voraussetzungen für die Replikation im Zytoplasma bzw. der SCV notwendig sind. Dazu wurden definierte Mutanten in den wichtigsten Transportsystemen für Glukose und Glukose-6-phosphat konstruiert. Deren Phänotyp wurde durch Wachstum im Minimalmedium mit verschiedenen Substraten, durch Bestimmung der Lebendzellzahl während der Infektion von Caco-2-Zellen und mittels der ^{13}C -Isotopolog-Perturbationsanalyse charakterisiert. Versuche im Maustumormodell mit einer ausgewählten Mutante sollten Hinweise liefern, ob die eingeführten Deletionen auch *in vivo* relevant sein könnten oder ob in einem komplexen Organismus ausreichend Ersatznährstoffe zur Verfügung stehen.

2 Material

Alle nicht näher aufgeführten Enzyme, Chemikalien und Antibiotika wurden von den Firmen Bio-Rad, Ferak, Fermentas, Gibco-BRL, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Roth, Serva, Sigma-Aldrich oder USB bezogen. Nährmedien und Agarose stammten von Becton Dickinson, Difco (Augsburg), Gibco-BRL (Berlin), Merck (Darmstadt) oder Oxoid. Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Antibiotika stammten von Gibco-BRL, das FCS von Biochrom (Charge 256FF). Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Brandt, Costar, Greiner, Laborcenter, Amersham, Sarstedt und Schleicher & Schuell.

2.1 Bakterienstämme

Die verwendeten bakteriellen Wildstämme und die aus ihnen erzeugten Mutanten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Die Deletionen wurden nach der von Datsenko und Wanner (2000) entwickelten Methode durchgeführt.

Stamm	Genotyp/Eigenschaft(en)	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
K-12	Wildtyp, phylogenetische Gruppe A (Herzer <i>et al.</i> , 1990)	DSMZ DSM Nr. 498, entspricht ATCC 23716
AG098	K-12 $\Delta ptsG$; Glukose-spezifisches PTS Enzym IICB	diese Arbeit
AG044	K-12 $\Delta uhpT$; Kohlenhydratphosphat-Antiporter	diese Arbeit
AG099	K-12 $\Delta ptsG, uhpT$	diese Arbeit
DH5 α	F ⁻ , λ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>enteroinvasive E. coli</i>		
4608-58	Wildtyp, klinisches Isolat	Sansonetti <i>et al.</i> (1982) (Institut Pasteur, Paris)
AG092	4608-58 $\Delta glpT$; Glyzerin-3-phosphat-Antiporter	diese Arbeit
AG110	4608-58 $\Delta uhpT, glpT$	diese Arbeit
AG231	4608-58 $\Delta pgtP$; putativer PEP-Transporter	diese Arbeit
AG222	4608-58 $\Delta uhpT, pgtP::cm$; Cm ^R	diese Arbeit
AG127	4608-58 $\Delta uhpT, glpT, uhpC::kan$; Glukose-6-phosphat-Sensor, Kan ^R	diese Arbeit
AG128	4608-58 $\Delta uhpT, glpT, Z0461::cm$; Cm ^R	diese Arbeit
AG147	4608-58 $\Delta icsA, uhpT$; Spreadingfaktor	diese Arbeit
AG096	4608-58 $\Delta ptsG$	diese Arbeit

AG161	4608-58 $\Delta manXYZ$; Mannose-spezifisches PTS Enzym IAB, IIC und IID	diese Arbeit
AG069	4608-58 $\Delta uhpT$	diese Arbeit
AG156	4608-58 $\Delta manXYZ, uhpT$	diese Arbeit
AG097	4608-58 $\Delta ptsG, uhpT$	diese Arbeit
AG157	4608-58 $\Delta ptsG, manXYZ$	diese Arbeit
AG135	4608-58 $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	diese Arbeit
HN280	Wildtyp, klinisches Isolat, Laktose ⁻	Nicoletti <i>et al.</i> (1988) (Dipartimento di Scienze Biomediche, Università G. D'Annunzio, Chieti)
AG232	HN280 $\Delta pgtP$	diese Arbeit
AG166	HN280 $\Delta ptsG$	diese Arbeit
AG158	HN280 $\Delta manXYZ$	diese Arbeit
AG136	HN280 $\Delta uhpT$	diese Arbeit
AG159	HN280 $\Delta manXYZ, uhpT$	diese Arbeit
AG167	HN280 $\Delta ptsG, uhpT$	diese Arbeit
AG168	HN280 $\Delta ptsG, manXYZ$	diese Arbeit
AG169	HN280 $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	diese Arbeit
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Typhimurium		
14028s	Wildtyp, S-Form LPS	S. J. Libby (University of Washington School of Medicine, Seattle)
14028r	nicht definierte Rauh-Mutante von 14028s Insertion eines Desoxythymidins an Position 76 des offenen Leserasters von <i>rfbP</i> (diese Arbeit)	S. J. Libby
AG071	14028r $\Delta sifA$; Deletion des <i>sifA</i> -Gens	diese Arbeit
14028 AL01	Originalstamm der Mikroinjektion, früher bezeichnet als 14028s WT Insertion eines Desoxythymidins an Position 76 des offenen Leserasters von <i>rfbP</i> (diese Arbeit)	Institutssammlung, Goetz <i>et al.</i> (2001)
14028slyA	<i>slyA</i> -Plasmidinsertionsmutante von 14028s; Insertion des Suizidvektors pCNA1 in 5'-kodierenden Bereich des <i>slyA</i> -Gens, Amp ^R	Institutssammlung, Daniels <i>et al.</i> (1996)
SL1344	<i>hisG, rpsL, xyl</i> , streptomycinresistent	A. Ludwig (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum der Universität Frankfurt), Hoiseh und Stocker (1981)
LT2	Wildtyp, Serogruppe B, Type strain	DSMZ DSM Nr. 17058

P3B12	NCTC 12023 <i>invG::mTn5</i> (SPI-1)	M. Hensel (Mikrobiologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen)
14028s	Wildtyp, S-Form LPS, Serogruppe B (Luk <i>et al.</i> , 1993; Oliver <i>et al.</i> , 2002)	M. Hensel, entspricht NCTC 12023
AG100	14028s Δrfc ; O-Antigen-Polymerase	diese Arbeit
AG102	14028s $\Delta sifA$, <i>rfaL</i> ; O-Antigen-Ligase	diese Arbeit
AG088	14028s $\Delta ptsG$	diese Arbeit
AG224	14028s $\Delta manXYZ$	diese Arbeit
AG229	14028s Δglk ; Glukokinase	diese Arbeit
AG046	14028s $\Delta uhpT$	diese Arbeit
AG094	14028s $\Delta ptsG$, <i>uhpT</i>	diese Arbeit
AG223	14028s $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i>	diese Arbeit
AG230	14028s $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>glk</i>	diese Arbeit
AG143	14028s $\Delta ptsG$, <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i>	diese Arbeit
AG037	14028s $\Delta sifA$; Deletion des <i>sifA</i> -Gens, repliziert im Zytoplasma der Wirtszelle (Beuzón <i>et al.</i> , 2000)	diese Arbeit
AG090	14028s $\Delta sifA$, <i>ptsG</i>	diese Arbeit
AG043	14028s $\Delta sifA$, <i>uhpT</i>	diese Arbeit
AG095	14028s $\Delta sifA$, <i>ptsG</i> , <i>uhpT</i>	diese Arbeit
AG144	14028s $\Delta sifA$, <i>ptsG</i> , <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i>	diese Arbeit

2.2 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaft(en)	Herkunft
HeLa	Humane Gebärmutterhalszellen (Adenokarzinom); niedrige p53 Expression (Scheffner <i>et al.</i> , 1991)	DSMZ ACC 57, entspricht ATCC CCL-2
Caco-2	Humane Kolon-Darmepithelzellen (Adenokarzinom)	DSMZ ACC 169, entspricht ATCC HTB-37
4T1	Murine Milchdrüsenzellen (Tumor); BALB/cfC3H	J. Fensterle (Institut für Medizinische Strahlenkunde, Universität Würzburg), entspricht ATCC CRL-2539
U-937	Humane Gewebsmakrophagen/Monozyten (diffuses Lymphom)	DSMZ ACC 5
J-774A.1	Murine Monozyten-Makrophagen (Retikulumzellsarkom) weiblich, BALB/c	DSMZ ACC 170

2.3 Mausinzuchtlinie

Mausinzuchtlinie	Eigenschaft(en)	Herkunft
BALB/cOlaHsd	weiblich, 5 Wochen alt, Haplotyp H-2 ^d	Harlan Winkelmann GmbH, Borchen

2.4 Desoxyribonukleinsäuren

2.4.1 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich oder Metabion hergestellt. Unterstrichen sind jeweils die Primerbindestellen (65-mer) zur Amplifikation der Resistenzkassetten von pKD3 und pKD4 bzw. die Restriktionsschnittstellen (30-mer) für die Ligation in pBR322 oder pMW-P_{sod}. Abweichungen zu den in der NCBI-Datenbank veröffentlichten Genomsequenzen für *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* APEC O1 oder *S. Typhimurium* LT2, die durch teilweise Sequenzierung der in dieser Arbeit verwendeten Wildstämme festgestellt wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Genus/Name	Sequenz 5' → 3'
c1	TTATACGCAAGGCGACAAGG
c2	GATCTTCCGTCACAGGTAGG
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
pBR322-Sall-up	CATGCACCATTCCTTGCGGC
pBR322-EagI-down	CGCCGGAAGCGAGAAGAATC
pBR322-EcoRI-up	CAAATAGGGGTTCCGCGCAC
pBR322-NheI-down	AGTAGCGAAGCGAGCAGGAC
pBR322-BamHI-up	TGGAGCCACTATCGACTAC
pBR322-SgrAI-down	GGTGATGTCGGCGATATAG
pMW-P _{sod} -up	AATGACCCAGAGCGCTGC
pMW-P _{sod} -down	TTTATCAGACCGCTTCTGCG
<i>Escherichia coli</i>	
<i>glpT</i> -del-up	TCATAAATAAGACCACGGGCCACGGAGGCTATCAATGTTGAGTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>glpT</i> -del-down	AGTGCTCATCATGATCGCCATGCTAAGGTTTTTCAGCGTCAATTTTCATATGAATATCCTCCTTA
<i>pgtP</i> -del-up	TGTTTCATATCAATATAAAAATACAGGTGAAGACATGTTATCAATATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>pgtP</i> -del-down	CACTCCCCAGGGAAAACGCCCTGGGGACGGTAATCAGTGTCTTTTCATATGAATATCCTCCTTA
<i>uhpC</i> -del-up	TGACTGATAAATATGAAATTGATGCCCGCTATCGCTACTGGCGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>uhpC</i> -del-down	GGGCAGTAACAGCAGTGCAGAAATCCCGCGCGGATAGAGATAACCATATGAATATCCTCCTTA
Z0461-del-up	TTCATTTTCATATAGTCAGCAACATGGAGACAACCATGCACGCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
Z0461-del-down	CAGCGCAACGGCAGAAGCAATCAGAGTAGAGGTAAGGTCATTTTCATATGAATATCCTCCTTA
<i>icsA</i> -del-up	TGGACTTTCTCCCTTGGGAGCTGGTGAAGATGGAATGGATGCGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>icsA</i> -del-down	CAATCCCAATTTTGCTTGAATATTATTGCCCCAGAGGATGTGACCATATGAATATCCTCCTTA
<i>ptsG</i> -del-up	AAGCACCCATACTCAGGAGCACTCTCAATTATGTTTAAAGAATGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>ptsG</i> -del-down	CTGGCTGCCTTAGTCTCCCAACGTCTTACGGATTAGTGGTTACGCATATGAATATCCTCCTTA
<i>manXYZ</i> -del-up	TCTGGCACGTTGAGGTGTTAACGATAATAAAGGAGGTAGCAAGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>manXYZ</i> -del-down	GCCAAAAGGCCCGGTAGTGTACAACAGTCTTACAGTCCCAGCAGCATATGAATATCCTCCTTA

<i>uhpT</i> -del-up (K-12)	AGGTATTCATTTTCAGGAGTAACCCATGCTGGCTTTCTTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>uhpT</i> -del-up (EIEC)	AGGTATTCATTTTCAGGAGTAACCCATGCTGGCTTTCTTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>uhpT</i> -del-down	GCCGGGCAAAACGTTACCAAATGCACACATTTAAGCGATATTGACCATATGAATATCCTCCTTA
<i>glpT</i> -kont-up	GATTTTCGCGCATATTTCGCTC
<i>glpT</i> -kont-down	CCAGATTGTCTGCTTTTGGTC
<i>pgtP</i> -kont-up	GCATGAGATTTGTTAATATCCG
<i>pgtP</i> -kont-down	CACTCCCCAGGGAAACGCCCC
<i>uhpC</i> -kont-up	GCAGGATGAACGGTTGATGC
<i>uhpC</i> -kont-down	ACATTTTTCGCGCCGCACTTCG
Z0461-kont-up	GTATTGCATCTGGAAGTCAGC
Z0461-kont-down	TTCTCCATGATCTGCTCAAGG
<i>icsA</i> -kont-up	AATATGACCCAATGTTACAGG
<i>icsA</i> -kont-down	TTTGAGTTCAATCACATTACGG
<i>ptsG</i> -kont-up	TGGGCGGTGAATAACCACG
<i>ptsG</i> -kont-down	TCGCGTGTATACCGACACC
<i>manXYZ</i> -kont-up	CGGTGACGATCCATACTGCG
<i>manXYZ</i> -kont-down	AACCCATCAGAGCCAGTGCG
<i>uhpT</i> -kont-up	TTGCCTGGACGCTATC
<i>uhpT</i> -kont-down	TACGCTGGAAGTCACGGA
<i>ptsG</i> -komp-up	CCAATGTCGACTGTCAAAATGTGCAACTTCTCC (<i>Sall</i>)
<i>ptsG</i> -komp-down	AAAAAGTCGACGACAAAACCTACGATACCAACG (<i>Sall</i>)
<i>ptsG</i> -N-Ter-down	GAGGCGATTTCTTCAGCAGG
<i>ptsG</i> -C-Ter-up	CGGTTATGCGATTGTTACTAC
<i>manXYZ</i> -komp-up	AAAAAGAATTCCGGTGACGATCCATACTGCG (<i>EcoRI</i>)
<i>manXYZ</i> -komp-down	AAAAAGAATTCAACCCATCAGAGCCAGTGCG (<i>EcoRI</i>)
mann-N-Ter-down	GCCTAACAGCATTCTGCCC
mann-C-Ter-up	CTGCTGCTGACCTTTGCTTG
<i>uhpT</i> -komp-up-1	TGGAGCGCCGGTGTGTGGTTATCTCTATCGCC (<i>SgrAI</i>)
<i>uhpT</i> -komp-down-1	GGCGCGGATCCTGGCGGAACAAATTGAC (<i>BamHI</i>)
<i>uhpT</i> -komp-up-2	AAAAAGAGCTCAGGAGTAACCCATGCTGGC (<i>SacI</i>)
<i>uhpT</i> -komp-down-2	AAAAAGAATTCAGGTACAAAGTCATCTGCCG (<i>EcoRI</i>)
<i>uhpT</i> -N-Ter-down	GATGGAGAAACCCAGG
<i>uhpT</i> -C-Ter-up	GATGGTATTAAGGCACC
<i>uhpT</i> -intern-up	TCGAAGTGCGGCGCAAAATG
<i>uhpT</i> -intern-down	TAAAACCGACAATCAGCGCG
<i>uhpT</i> -N-seq4-up	GGGTTTCTCCATCACTTATG
<i>uhpT</i> -C-seq4-down	GGTGCCTTAATACCATCGG
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Typhimurium	
<i>rfc</i> -del-up	ATTTTTAATACTAAGCATTTTTTTCTAAAAGGCTCTATATGCTTATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>rfc</i> -del-down	AAAACGGCGGCATTGCCGCCGTATAACTTATTTATTGTTTCTTAGCATATGAATATCCTCCTTA
<i>rfaL</i> -del-up	GACTCTGTCTCATCCCAAACCTATTGTGGAGAAAAGATGCTAACCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>rfaL</i> -del-down	TGATACCFTAATAAGTATCAGCGGTTTTTTTTATCTATTCTTAGCATATGAATATCCTCCTTA
<i>ptsG</i> -del-up	GTAGAAAAGCACAAATACTCAGGAGCACTCTCAATTATGTTAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>ptsG</i> -del-down	GGCTGCCTTAATTCTCCCCAACATCACTACTGCTTAGCTGTTACGCATATGAATATCCTCCTTA
<i>manXYZ</i> -del-up	AGTTGATGTGTTGACAATAATAAAGGAGGTAGCAAGTGACCATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>manXYZ</i> -del-down	ACAGCCTTACTGGCCAGCAGTCTACGGAGTAGCCGGCGATACCCATATGAATATCCTCCTTA
<i>glk</i> -del-up	AAAGACTTATTTGACTTTAGCGGAGCAGTAGAAGAATGACAAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>glk</i> -del-down	TTTTGTAGCCGGATAAGGCGTTTATGCCACCATCTGGCTTATAGCATATGAATATCCTCCTTA
<i>uhpT</i> -del-up	GCCATTTCGACGGTATAAAAATTAGCTCAGGAGTAATCCATGCTGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

<i>uhpT</i> -del-down	GCCGGGCAAAACGTTACCAAATGCACACATTTAAGCGATATTGACCATATGAATATCCTCCTTA
<i>sifA</i> -del-up	TTACTCCAGTATAAGTGAGATTAATATGCCGATTACTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>sifA</i> -del-down	ACCCTGAACGTGACGTCTGAGAAAGCGTCGTCTGATTTACATATGAATATCCTCCTTA
<i>rfaC</i> -kont-up	GCAGTAGATAGGAGTGTTA
<i>rfaC</i> -kont-down	AAACGCAAGCACTATCATG
<i>rfaL</i> -kont-up	TGCTCACCAGAACAGAACC
<i>rfaL</i> -kont-down	TGCTGATAAGGAACGCCA
<i>ptsG</i> -kont-up	GCGTAAAGTTCACCGCCAC
<i>ptsG</i> -kont-down	CTATGCGCTGGTCGATCTG
<i>manXYZ</i> -kont-up	TCCATACAACGGGTGCTGC
<i>manXYZ</i> -kont-down	CTCCGTGGCTGGTTACGTTG
<i>glk</i> -kont-up	GCGATTAACCAGGCTTGACG
<i>glk</i> -kont-down	ATGAAACCGTAAATAAGGCAGCG
<i>uhpT</i> -kont-up	CGCTGTGCGCAGGCCAC
<i>uhpT</i> -kont-down	GTGACGTTCTGGCCTG
<i>sifA</i> -kont-up	ATGCGCCCGCAGTTGAG
<i>sifA</i> -kont-down	GACTATTCTCATCCGATCC
<i>rfaL</i> -komp-up	AAAAAGAATTCGTGGAGAAAAGATGCTAACC (<i>EcoRI</i>)
<i>rfaL</i> -komp-down	AAAAACAAGCTTTGCTGATAAGGAACGCCACC (<i>HindIII</i>)
<i>rfaL</i> -N-Ter-down	TTTATTCAGATCGGCTTCC
<i>rfaL</i> -C-Ter-up	TGAACAGGTCGATATTGCTC
<i>rfaKP</i> -up-1	ATTGGCTCGCCTTATGTTATC
<i>rfaKP</i> -down-1	ATAACATCAAACCCATCATC
<i>rfaP</i> -up-2	AACAAGCTAGGTATCTGGAAG
<i>rfaP</i> -down-2	TGGCAGGTTAAAGGTGAATAG

2.4.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaft(en)	Herkunft/Referenz
pKSBC16- P_{sod} - <i>gfp</i>	<i>gfp</i> unter der Kontrolle des konstitutiven <i>sod</i> -Promotors (P_{sod}) von <i>Listeria monocytogenes</i> , Tc ^R	Goetz M. und Bubert, nicht veröffentlicht
pFPV25.1	Derivat von pFPV25 enthält <i>gfpmut3a</i> unter der Kontrolle des <i>rpsM</i> -Promotors, Carb ^R	M. Hensel, Valdivia und Falkow (1996)
pKD3	Templateplasmid enthält Chloramphenicol-Resistenzkassette, Amp ^R , Cm ^R	Datsenko und Wanner (2000)
pKD4	Templateplasmid enthält Kanamycin-Resistenzkassette, Amp ^R , Kan ^R	Datsenko und Wanner (2000)
pKD46	temperatursensitives Plasmid enthält λ -Phage Red-Rekombinase System, Amp ^R	Datsenko und Wanner (2000)
pCP20	temperatursensitives Plasmid enthält FLP-Rekombinasegen, Amp ^R , Cm ^R	Datsenko und Wanner (2000)
pBR322	Klonierungsvektor, Amp ^R , Tc ^R	New England Biolabs, Covarrubias <i>et al.</i> (1981), Bolivar <i>et al.</i> (1992)
pAG119	Derivat von pBR322 enthält P_{ptsG} - <i>ptsG</i> von <i>EIEC</i> 4608-58, revers kloniert in die <i>SaII</i> -Restriktionsschnittstelle, Amp ^R	diese Arbeit (Anhang 2)
pAG124	Derivat von pBR322 enthält P_{manXYZ} - <i>manXYZ</i> von <i>EIEC</i> 4608-58, kloniert in die <i>EcoRI</i> -Restriktionsschnittstelle, Amp ^R , Tc ^R	diese Arbeit (Anhang 3)

pAG078	Derivat von pBR322 enthält $P_{uhpT-uhpT}$ von <i>EIEC</i> 4608-58, revers kloniert in die <i>Bam</i> HI/ <i>Sgr</i> AI-Restriktionsschnittstelle, Amp ^R	diese Arbeit (Anhang 4)
pMW-P _{sod}	Klonierungsvektor, Derivat von pMW211, listerieller <i>sod</i> -Promotor, neue multiple Klonierungsstelle, Amp ^R	S. Weibel, nicht veröffentlicht
pAG125	Derivat von pMW-P _{sod} enthält <i>rfaL</i> aus <i>S. Typhimurium</i> 14028s, kloniert in die <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-Restriktionsschnittstelle, Amp ^R	diese Arbeit (Anhang 1)
pAG123	Derivat von pMW-P _{sod} enthält <i>uhpT</i> aus <i>EIEC</i> 4608-58, kloniert in die <i>Sac</i> I/ <i>Eco</i> RI-Restriktionsschnittstelle, Amp ^R	diese Arbeit (Anhang 5)

2.5 Lösungen, Puffer und Chemikalien

Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem H₂O hergestellt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert oder aus bereits sterilen Lösungen hergestellt. Standardchemikalien und Antibiotika stammten von den Firmen Becton Dickinson, Boehringer, Bio-Rad, Difco, Ferak, Fermentas, Gibco-BRL, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Roth, Serva, Sigma- Aldrich oder USB

2.5.1 Agarosegelelektrophorese

<u>50 × TAE</u>		<u>15.000 × Ethidiumbromidlösung</u>	
Tris Base	242 g	EtBr in H ₂ O _{dest.}	10 mg/ml
Eisessig	57,1 ml		
0,5 M Na-EDTA pH 8	100 ml	<u>6 × Ladepuffer</u>	
ad 1,0 l aqua dest.		Bromphenolblau	0,01 g
		Xylen Cyanol FF	0,02 g
<u>1 × TAE</u>		EDTA	100 mM
50 × TAE	20 ml	Saccharose	5 g
ad 1,0 l aqua dest.		ad 10 ml aqua dest.	

2.5.2 Southern-Blot

<u>20 × SSC</u>		<u>Neutralisierungslösung</u>	
NaCl	3 M	Tris-HCl	0,5 M
Trinatriumcitrat	0,3 M	NaCl	1,5 M
pH 7,0			
<u>Depurinierungslösung</u>		<u>Primärer Waschpuffer</u>	
HCl	0,25 N	Harnstoff	6 M
		SDS	4% (w/v)
<u>Denaturierungslösung</u>		<u>Sekundärer Waschpuffer (2 × SSC)</u>	
NaOH	0,5 M	20 × SSC	100 ml
NaCl	1,5 M	ad 1 l aqua dest.	

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

5 × PAGE-Puffer

Glycin	144 g
Tris	30,3 g
SDS	5 g
ad 1 l aqua dest.	

1 × PAGE-Puffer

5 × PAGE-Puffer	200 ml
ad 1 l aqua dest.	

1,5 M Tris pH 8,8

Tris	181,7 g
pH 8,8 mit HCl	
ad 1 l aqua dest.	

1,5 M Tris pH 6,8

Tris	181,7 g
pH 6,8 mit HCl	
ad 1 l aqua dest.	

10% SDS

Sodiumdodecylsulfat	10 g
ad 100 ml aqua dest.	

10% APS

Ammoniumperoxodisulfat	10 g
ad 100 ml aqua dest.	

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

30% Acrylamidmix

4 × Laemmli-Puffer

2 M Tris pH 6,8	2 ml
Bromphenolblau	20 mg
β-Mercaptoethanol	2 ml
SDS	0,8 g
86% Glyzerin	4,64 ml
aqua dest.	0,54 ml

2.5.4 Silberfärbung

Fixierer

Ethanol	40% (v/v)
Essigsäure	5% (v/v)

Oxidierer

Na-Perjodat	1,4 g
Fixierer	100 ml
aqua dest.	100 ml

Stopplösung

EDTA	40 mM
------	-------

Färbelösung

1 N NaOH	2,8 ml
25% NH ₃	2,4 ml
20% (w/v) Silbernitrat	5 ml
aqua dest.	139,6 ml

Entwickler

Na ₂ CO ₃	2,5 g
37% Formaldehyd	54 µl
aqua dest.	200 ml

2.5.5 Proteinisolierung für Western-Blot

10 % TritonX-100

TritonX-100	10 ml
ad 100 ml aqua dest.	

2 × HBS

NaCl	300 mM
HEPES pH 7,5	40 mM

1 × Zellysepuffer

2 × HBS	2 ml
1 M DTT	6 µl
10% TritonX-100	40 µl
0,5 M EDTA pH 8,0	8 µl
50 × Proteaseinhibitor	80 µl
Benzoase	4 µl
ad 4 ml aqua dest.	

2.5.6 Western-Blot

Transferpuffer

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Ethanol	200 ml
ad 1 l aqua dest.	

10 × TBS

Tris pH 7,5	12,11 g
NaCl	90 g
ad 1 l aqua dest.	

1 × TBS Tween 20 (Waschpuffer)

Tween 20	0,8 ml
10 × TBS	100 ml
ad 1 l aqua dest.	

1 × TBS Tween 20 mit 5%
Magermilchpulver (Block- und
Bindepuffer)

Magermilchpulver (MP)	5 g
1 × TBS Tween 20	100 ml

2.5.7 β -Galaktosidasetest0,05 M Na⁺/K⁺-Phosphatpuffer

0,05 M KH ₂ PO ₄	200 ml
pH 7,4 eingestellt mit	
0,05 M Na ₂ HPO ₄	ca. 300 ml
β -Mercaptoethanol	7 μ l/l
nicht autoklavieren	

1% Natriumdeoxycholat

Natriumdeoxycholat	1 g
ad 100 ml aqua dest.	

Toluolo-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
(ONPG)

ONPG	0,5 g
ad 100 ml aqua dest.	

10% Dinatriumcarbonat

Na ₂ CO ₃	10 g
ad 100 ml aqua dest.	

2.5.8 Bakterienisolierung aus Caco-2-Zellen für ¹³C-Isotopolog-PerturbationsanalyseRIPA-Puffer

NaCl	0,88 g
Tris	0,61 g
SDS	0,1 g
Deoxycholat	0,5 g
IGE-Pal Nonidet P-40	1 ml
ad 100 ml aqua dest.	

0,1% TritonX-100

TritonX-100	500 μ l
ad 0,5 l aqua dest.	

2.5.9 Gewebefixierung für Immunfluoreszenzfärbung

4% Paraformaldehydlösung (PFA)

Paraformaldehyd	4 g
aqua dest.	80 ml
lösen mit 1 M NaOH	
10 × PBS	10 ml
pH 7,4 mit HCl	
ad 100 ml aqua dest.	

0,3% TritonX-100 in PBS

TritonX-100	300 μ l
1 × PBS	100 ml

60% Glyzerin in PBS

Glyzerin	6 ml
ad 10 ml 1 × PBS	

5% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt

LMP-Agarose	5 g
1 × PBS	100 ml

80% Glyzerin in PBS

Glyzerin	8 ml
ad 10 ml 1 × PBS	

2.5.10 Tumorverdau für magnetische Zellsortierung (MACS®)

<u>Dispase/DNase I-Lösung</u>		<u>MACS®-Puffer</u>	
MACS®-Puffer		BSA	0,25 g
DNase I (Sigma)	100 U/ml	25 mM EDTA	4 ml
Dispase (Gibco)	2 µg/ml	ad 50 ml PBS pH 7,2	

2.5.11 Sonstige Puffer und Lösungen

<u>10 × PBS</u>		<u>20% Glyzerin in PBS</u>	
NaCl	80 g	Glyzerin	100 ml
KCl	2 g	ad 0,5 l 1 × PBS	
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	14,4 g	<u>2 × Einfriermedium für Bakterien</u>	
KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	2,4 g	Glyzerin	50% (v/v)
ad 1,0 l aqua dest.		NaCl	2,9% (w/v)
<u>20 × Ca²⁺Mg²⁺-Lösung</u>		aqua dest.	
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	2 g	<u>STE-Puffer</u>	
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	2 g	NaCl	100 mM
ad 1,0 l aqua dest.		Tris pH 8,0	10 mM
<u>1 × PBS</u>		EDTA	1 mM
10 × PBS	50 ml	<u>Proteinase K-Stammlösung</u>	
ad 0,5 l aqua dest.		Proteinase K	10 mg
<u>1 × PBS Ca²⁺Mg²⁺</u>		ad 1 ml aqua dest.	
10 × PBS	50 ml	<u>Rinderserumalbumin (BSA)</u>	
20 × Ca ²⁺ Mg ²⁺	25 ml	BSA	1 mg
ad 0,5 l aqua dest.		ad 10 ml aqua dest.	
<u>10% Glyzerin</u>		bzw.	
Glyzerin	50 ml	BSA	5 mg
ad 0,5 l aqua dest.		ad 10 ml aqua dest.	

und destilliertes Wasser, viel destilliertes Wasser

2.6 Bakterien- und Zellkultur

Alle verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch sterilisiert. Medien mit Agarzusatz (12 g auf einen Liter Medium) und Flüssigmedien zur Bakterienkultur wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten wurden ca. 25 ml der handwarmen Lösung in Petrischalen (Ø = 10 cm) gegossen. Nach dem Erstarren und dem Trocknen können diese für maximal zwei Monate im Kühlraum gelagert werden. Steriles Einwegmaterial wie serologische Einmalpipetten, Zellkulturplatten („Multi-Well“) und Petrischalen stammten von den Firmen Becton Dickinson, Costar, Falcon, Greiner, Nunc und Sarstedt.

2.6.1 Medien für die Bakterienkultur

Luria-Bertani-Medium (LB) mit 0,5% NaCl

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000 ml

LB-Medium mit 1% NaCl

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000 ml

LB-Agarplatten

Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	12 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000 ml

bei Bedarf nach dem Autoklavieren zugeben:
20% L-Arabinose (sterilfiltriert) 10 ml

Tryptic Soy Broth-Medium (TSB)

Tryptic Soy Broth	30 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000 ml

TSB-Agarplatten mit 0,01% Kongorot

Tryptic Soy Broth	30 g
Agar	12 g
H ₂ O _{dest}	ad 1.000 ml

nach dem Autoklavieren zugeben:
0,5% Kongorot (sterilfiltriert) 20 ml

Minimalmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin
enthält alle Aminosäuren außer Alanin

	RPMI 1640 mit L-Glutamin	RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne Glukose
	Gibco: http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.187.html	Gibco: http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.116.html
Aminosäuren		
Glycin	0,133 mM	0,133 mM
L-Arginin	1,15 mM	1,15 mM
L-Asparagin	0,379 mM	0,379 mM
L-Aspartat	0,15 mM	0,15 mM
L-Cystin	0,208 mM	--
L-Cystin × 2 HCl	--	0,208 mM
L-Glutamat	0,136 mM	0,136 mM
L-Glutamin	2,05 mM	2,05 mM
L-Histidin	0,0968 mM	0,0968 mM
L-Hydroxyprolin	0,153 mM	0,153 mM
L-Isoleucin	0,382 mM	0,382 mM
L-Leucin	0,382 mM	0,382 mM
L-Lysinhydrochlorid	0,219 mM	0,274 mM
L-Methionin	0,101 mM	0,101 mM
L-Phenylalanin	0,0909 mM	0,0909 mM
L-Prolin	0,174 mM	0,174 mM
L-Serin	0,286 mM	0,286 mM
L-Threonin	0,168 mM	0,168 mM
L-Tryptophan	0,0245 mM	0,0245 mM
L-Tyrosin	0,11 mM	--
L-Tyrosin Dinatriumsalz Dihydrat	--	0,111 mM
L-Valin	0,171 mM	0,171 mM
Vitamine		
Biotin	0,00082 mM	0,00082 mM
Cholinchlorid	0,0214 mM	0,0214 mM
D-Calciumpantothenat	0,000524 mM	0,000524 mM
Folsäure	0,00227 mM	0,00227 mM
Niacinamid	0,0082 mM	0,0082 mM
para-Aminobenzoessäure	0,0073 mM	0,0073 mM
Pyridoxinhydrochlorid	0,00485 mM	0,00485 mM
Riboflavin	0,000532 mM	0,000532 mM
Thiaminhydrochlorid	0,00297 mM	0,00297 mM
Vitamin B12	0,0000037 mM	0,0000037 mM
i-Inositol	0,194 mM	0,194 mM

Anorganische Salze		
Calciumnitrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	0,424 mM	0,424 mM
Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,407 mM	--
Magnesiumsulfat MgSO_4 wasserfrei	--	0,407 mM
Kaliumchlorid KCl	5,33 mM	5,33 mM
Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	23,81 mM	23,81 mM
Natriumchlorid NaCl	103,45 mM	103,45 mM
Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4 wasserfrei	5,63 mM	--
Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	--	5,64 mM
weitere Inhaltsstoffe		
D-Glukose (Dextrose)	11,11 mM	--
Glutathion (reduziert)	0,00326 mM	0,00326 mM
Phenolrot	0,0133 mM	0,0133 mM

bei Bedarf wurden folgende Substanzen zugesetzt und das Medium anschließend sterilfiltriert:

D-(+)-Mannose (Fluka)	--	10 mM
D-Glukose-6-phosphat Dinatriumsalz Hydrat (Sigma)	--	10 mM
Glukonsäure (Natriumsalz)	--	10 mM
Fruktose	--	10 mM
Phosphoenolpyruvat (Mononatriumsalz)	--	20 mM
Pyruvat (Natriumsalz)	--	10 mM
Laktat (Natriumsalz)	--	10 mM
Glyzerin	--	10 mM
FCS (hitzeinaktiviert)	10%	

2.6.2 Medien für die Zellkultur

RPMI 1640 mit L-Glutamin, mit und ohne 10% FCS

Tiefgefrorenes FCS (Biochrom, Charge 256FF) wurde im 37 °C Wasserbad aufgetaut und für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

bei Bedarf: FCS (hitzeinaktiviert)	45 ml
bei Bedarf: D-[U- ¹⁴ C ₆]-Glukose	500 nM
(Amersham: 10,7 GBq/mmol; 9,25 MBq in 1,25 ml)	
RPMI 1640 mit L-Glutamin	500 ml

RPMI 1640 mit L-Glutamin sowie 10 mM D-[U-¹³C₆]-Glukose und 10% FCS

FCS (hitzeinaktiviert)	45 ml
D-[U- ¹³ C ₆]-Glukose	1 g
RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne Glukose	500 ml

2.6.3 Medienzusätze, Farbstoffe und Antikörper

Antibiotika, Zellgifte und Differenzierungsreagenzien

Antibiotika-Stammlösungen wurden in jeweils 1.000facher Konzentration angesetzt, sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Bei frisch autoklavierten Nährmedien mit Agarzusatz wurde nach dem Abkühlen auf 50 °C 1 ml der Stammlösung auf 1.000 ml des Nährmediums geben. Konzentration und Lösungsmittel für entsprechende Antibiotika sind nachfolgend aufgelistet.

Antibiotikum/Zellgift/ Differenzierungsreagenz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Tetracyclin	7,5 mg/ml in 50% Ethanol 5 mg/ml in 70% Ethanol	7,5 µg/ml für Agarplatten 5 µg/ml für Flüssigkulturen
Carbenicillin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	30 und 50 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Phosphomycin	30 mg/ml in H ₂ O	30 µg/ml
Gentamicin	50 mg/ml in H ₂ O	5, 10, 20, 100 und 300 µg/ml
Camptothecin	10 mM in DMSO	10 µM in RPMI für HeLa-Zellen 50 µM in RPMI für Caco-2-Zellen
Cytochalasin D	1 mg/ml in 100% Ethanol	1 µg/ml in RPMI
Natriumazid	5 M in H ₂ O	10 mM
all-trans Retinsäure	10 mM, 100 µM in 100% Ethanol	100 nM in RPMI (Differenzierung für 3 Tage)
1α,25-Dihydroxyvitamin D ₃	100 µM in 100% Ethanol	100 nM in RPMI (Differenzierung für 3 Tage)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	16 µM in 100% Ethanol	16 nM in RPMI (Differenzierung für 2 Tage)

Proteaseinhibitoren

Eine Stammlösung von Proteaseinhibitoren wurde in 50facher Konzentration aus einer complete, EDTA-free Tablette (Roche Diagnostics GmbH) in 1 ml aqua dest. angesetzt und bei -20 °C aufbewahrt. Diese inhibierte jedoch weder Metallo- noch Aspartatproteasen. Letztere sind aber nur bei niedrigem pH-Wert aktiv und können durch Zugabe von Pepstatin inhibiert werden.

Farbstoffe zur Mikroskopie

Farbstoff	Eigenschaft(en)	Konzentrationen
Texas Red®-Dextran 70.000 (Molecular Probes)	gut wasserlöslich, nicht membrangängig nicht durch <i>Salmonella</i> abbaubar	Stocklösung: 2 mg/ml in PBS Anwendung: 1:2 in PBS (1 mg/ml)
Höchst 33342 (Bisbenzimid)	bindet an DNS, membrangängig	Stocklösung: 1 mg/ml in H ₂ O Anwendung: 1:400 in PBS mit 0,3% TritonX-100
Phalloidin-FITC	bindet an F-Aktin	Stocklösung: 0,5 mg/ml in Methanol Anwendung: 1:100 in PBS mit 0,3% TritonX-100
Streptavidin-Cy3	bindet an Biotin	Stocklösung: 1 mg/ml in 0,01 M PBS pH 7,4, 1% BSA, 15 mM NaN ₃ Anwendung: 1:200 in PBS mit 0,3% TritonX-100

Primärantikörper

Antigen-spezifität	Spender-organismus	Konjugat	Anwendung	Herkunft/Klon
humane Caspase-8	Maus	--	1:1.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	Cell Signaling, Klon 1C12
humane Caspase-1	Hase	--	1:1.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	Cell Signaling, polyklonal
humane Caspase-7	Maus	--	1:1.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	BD Pharmingen, Klon B94-1
humane Caspase-9	Hase	--	1:1.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	Cell Signaling, polyklonal
Caspase-3	Hase	--	1:1.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	Cell Signaling, polyklonal
<i>E. coli</i> O- und K-Antigene	Hase	Biotin	1:200 in PBS mit 0,3% TritonX-100	ViroStat, polyklonal
murines CD31 (Blutgefäße)	Ratte	--	1:50 in PBS mit 0,3% TritonX-100	BD Pharmingen
murines CD68 (Makrophagen)	Ratte	--	1:100 in PBS mit 0,3% TritonX-100	AbD Serotec, Klon FA-11
murines F4/80 (Makrophagen)	Ratte	--	10 µl pro 10 ⁸ Zellen in MACS®-Puffer	Acris, Klon BM8

Sekundärantikörper

Antigen-spezifität	Spender-organismus	Konjugat	Anwendung	Herkunft/Klon
anti-Maus	Schaf	Peroxidase aus Meerschweinchen	1:3.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	GE Healthcare
anti-Hase	Esel	Peroxidase aus Meerschweinchen	1:3.000 in TBS Tween 20 mit 5% Magermilchpulver	GE Healthcare
anti-Ratte	Esel	Cy-2	1:100 in PBS mit 0,3% TritonX-100	Jackson Immuno Research
anti-Ratte IgG (H+L) F(ab') ₂	Ziege	Magnetpartikel	10 µl pro 10 ⁸ Zellen in MACS [®] -Puffer	Miltenyi Biotec GmbH

2.7 Gebrauchsfertige Analysesets, Lösungen und Längenstandards

Set, Lösung oder Längenstandard	Hersteller
endotoxinfreies PBS	Invitrogen
endotoxinfreies PBS Ca ²⁺ Mg ²⁺	PAA Laboratories
PureYield [™] Plasmid Midiprep System	Promega
PCR Purification Kit	Qiagen
positivgeladene Nylontransfermembran für Nukleinsäuren Amersham Hybond [™] -N ⁺	GE Healthcare
ECL [™] Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System	GE Healthcare
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad
Nitrocellulosemembran für ECL Western blotting Hybond [™] ECL [™]	GE Healthcare
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
Trypsin, 0,05% EDTA	Invitrogen
0,4% Trypanblau	Fluka
Lysing Matrix D Röhrchen	MP Biomedicals
MACS [®] -MS Säulen	Miltenyi Biotec GmbH
Rotiszint eco plus für hydrophile und hydrophobe Proben	Roth
GeneRuler 1 kbp Ladder	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Precision Plus Protein Prestained Standards Dual Color	Bio-Rad

2.8 Geräte

Gerät	Hersteller
-20 °C Gefrierfach	Quelle Privileg
-80 °C Gefrierschrank	Thermo Scientific Revco
Autoklaven	Biomedis Laborservice, Webeco, Münchner Medizin Mechanik
Begasungsbrutschrank	Nunc Cellstar
Blotkammer	Starlab
Brutschrank	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer (horizontal)	Bio-Rad ComPhort L Midi
Elektrophoresekammer (vertikal)	institutseigene Werkstatt, Minigelkammer von Amersham Biosciences
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Gene Pulser
Entwicklerkassette	Hartenstein

Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM R
Fluoreszenzmikroskop, invers	Leica DM IRB
Glaskapillare	Sutter Instruments Co., BF100-78-10
Heizblöcke	Liebisch, Eppendorf Thermostat 5320
Homogenisator	Thermo Savant FastPrep FP120
Kühlschrank	Quelle Privileg
MACS [®] Permanentmagnet	Miltenyi Biotec GmbH
Magnetrührer	Gerhardt Heidolph MR1000
Mikroinjektionsanlage	Eppendorf FemtoJet, InjectMan
Mikrokapillaren-Zieher	Bachofer Typ 462
Mikropipetten	Eppendorf, Gilson
Mikroskope, invers	Olympus CK2, Leica DM IL
Mikroskop, konfokal	Leica DM IRE2 TCS SP2
Mikrowellengerät	Quelle Privileg
Netzgerät	Bio-Rad Power-Pac 300
PCR-Thermocycler	Biometra T3 Thermocycler, GeneTechnologies G-Storm, Peqlab peqSTAR 96 Universal Gradient
pH-Elektrode	WTW SenTix 61
pH-Meter	WTW-Weilheim
Photometer	Klett-Summerson DM4, Pharmacia Biotec Ultrospec III, Ultrospec 2100pro und Ultrospec 3100pro, Peqlab Spectrophotometer ND1000 (NanoDrop)
Pipettierhilfen	Brand accu-jet
Röhrchenroller	Bibby Scientific Limited Stuart SRT9
Röntgenfilmentwickler	PROTEC medical systems Ecomax
Schüttelinkubator	Infors AG
Stereoskop	Leica MZ16FA
Sterilbank	NuAire II Type A/B3, Flow Gelaire
Szintillationszähler	LKB Wallac 1214 Rackbeta
Taumlern	Heidolph
Tischzentrifuge	Heraeus Sepatec Biofuge 15
Ultraschallgerät	Branson Sonic Power Comp. Sonifier B12
Geldokumentationsgerät	Biostep Dark Hood DA-40/50
Vibratom	Leica VT1000S
Vortexer	Retsch, Heidolph, Boskamp
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zellzählkammer	Neubauer (verbessert)
Zentrifugen	Heraeus Minifuge RF, Heraeus Megafuge 1.0R und Beckmann Coulter Allegra 25R

2.9 Computerprogramme

Name und Version	Hersteller
Word 2003 (SP3)	Microsoft
OriginPro 8G (SR4)	OriginLab
Excel 2003 (SP3)	Microsoft
Photoshop 7.0.1	Adobe
VectorNTI 9.0.0	InforMax
ChemBioDraw Ultra 11.0.1	CambridgeSoft
MetaVue 5.0r2	Universal Imaging Corporation
MetaMorph 6.2r6	Universal Imaging Corporation
Leica Confocal Software 2.61 (Build 1537)	Leica Microsystems
Leica IM1000 Image Manager 4.0 (Release 117)	Imagic Bildverarbeitung AG

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Anlegen einer Stammkultur

Die Bakterienstämme und -mutanten wurden als Glyzerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Zu deren Herstellung wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte in 20 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 30 °C oder 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Übernachtskultur mit dem gleichen Volumen des $2 \times$ Einfriermediums für Bakterien gemischt und eingefroren.

3.1.2 Animpfen einer Flüssigkultur

Zur Herstellung einer Übernachtskultur wurden 20 ml TSB oder LB in einen sterilen Erlenmeyerkolben pipettiert und je nach Bakterienstamm mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert. Von der eingefrorenen Stammkultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Material unter einer Sterilbank entnommen und in dem vorbereiteten Kolben resuspendiert, ohne die Stammkultur dabei aufzutauen. Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 30 °C (*EIEC*) oder 37 °C (*S. Typhimurium*) und 190 rpm für mindestens 15 h über Nacht geschüttelt.

3.1.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Transformation von *E. coli* oder *S. Typhimurium* mit Plasmid-DNS durch Elektroporation wurden zunächst kompetente Zellen hergestellt, indem 200 μl einer ÜNK des Ausgangsstammes aus der Stammkultur in 20 ml LB mit entsprechenden Antibiotika verdünnt wurden. Die Kultur wurde bei 37 °C geschüttelt und beim Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 120 Klett 15-30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien bei 5525 g und 4 °C 10 min abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 10 ml eiskaltem, sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, in 250 μl 10%igem Glyzerinwasser aufgenommen und in 100 μl Aliquots bei -80 °C eingefroren.

3.1.4 Herstellung von Aliquots für die Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion wurden von den entsprechenden Stammkulturen Injektionsaliquots hergestellt. Dazu wurde zunächst eine Übernachtskultur in 20 ml LB-Medium mit Antibiotikum angelegt.

Nach 16 Stunden wurden von dieser Kultur 400 μl in einen Klettkolben mit 40 ml LB-Medium und Antibiotika überimpft und bei 37 °C unter Schütteln weiter inkubiert. Beim Erreichen einer OD von 130 Klett wurde die Kultur 10 min bei 5525 g und 4 °C abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml eiskaltem $1 \times$ PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 20 ml 20%iger Glyzerinlösung (eiskalt) resuspendiert, in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurde ein Aliquot aufgetaut und die Lebendbakterienzellzahl durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Agarplatten mit Antibiotika ermittelt.

3.1.5 Isolierung des Lipopolysaccharids (LPS)

Zur Untersuchung der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien wurde 1 ml einer ÜNK in LB bei 18.000 g 90 sec lang abzentrifugiert, einmal mit PBS Ca^{2+} Mg^{2+} gewaschen und in 75 μl PBS und 25 μl $4 \times$ Laemmli-Puffer aufgenommen. Durch 10 minütiges Kochen bei 100 °C wurden die Bakterien lysiert. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurden die Proteine

durch Zugabe von 25 µg Proteinase K eine Stunde lang verdaut, wobei der Ansatz gelegentlich durchmischt wurde. 5 µl der isolierten LPS-Fraktion wurden anschließend in einem etwa DIN A4-Seiten großen und 1 mm dicken 20%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Silberfärbung entwickelt.

3.1.6 Ermittlung des bakteriellen Wachstums im Minimalmedium

Als Minimalmedium wurde das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 2 mM Glutamin (Gibco) verwendet. Diesem wurden verschiedene Kohlenhydrate oder C₃-Substrate in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Um das Wachstum der verwendeten Bakterienstämme und in dieser Arbeit hergestellten Mutanten darin zu ermitteln, wurden zunächst Übernachtskulturen in TSB (*E. coli*) oder LB (*S. Typhimurium*) angeimpft und bei 30 (*E. coli*) oder 37 °C (*S. Typhimurium*) geschüttelt. Nach 16 h wurden die Bakterien zweimal mit PBS gewaschen, das Pellet in PBS resuspendiert, 1:100 in frischem Minimalmedium verdünnt und weiter bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die erreichte Zelldichte wurde indirekt durch stündliche Messung der OD₆₀₀ gegen steriles Kulturmedium als Leerwert bestimmt.

3.1.7 Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität

Der Status der Katabolitrepression wurde durch die Aktivität der β-Galaktosidase bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine ÜNK bei 30 °C 1:100 in 20 ml frischem TSB supplementiert mit 5 mM Laktose verdünnt und für etwa 2 h bei 37 °C und 190 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ ≈ 1 weiter geschüttelt. Ein Aliquot von etwa 10⁹ Bakterien wurde durch Zentrifugation bei 18.000 g für 5 min pelletiert und in 1 ml Na⁺/K⁺-Phosphatpuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Inkubation mit 50 µl Toluol und 50 µl Natriumdeoxycholat für 30 min bei 37 °C lysiert. Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde durch Mischung von 50 µl des Zelllysats mit 950 µl Na⁺/K⁺-Phosphatpuffer und 100 µl ONPG ermittelt. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl Na₂CO₃ gestoppt und die OD₄₂₀ gegen den Leerwert (1 ml Na⁺/K⁺-Phosphatpuffer, 100 µl ONPG, 40 µl Na₂CO₃) gemessen.

Die Proteinkonzentration im Zelllysats wurde mittels eines Bradford-Assays bestimmt und daraus die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase mit Hilfe des Lambertschen Gesetzes in µmol min⁻¹ mg_{Protein}⁻¹ berechnet. Demnach ergibt sich für die Konzentration des gebildeten o-Nitrophenols:

$$c = \frac{OD_{420}}{\varepsilon * d} \quad \begin{array}{l} \text{molarer Extinktionskoeffizient } \varepsilon \text{ von o-Nitrophenol: } 4,5 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Schichtdicke } d \text{ der Küvette: } 1 \text{ cm} \end{array}$$

und für die gebildete Menge $n = c * V$:

$$n = \frac{OD_{420} * V}{\varepsilon * d} \quad \text{Volumen } V \text{ des Reaktionsansatzes: } 1,14 \text{ ml}$$

für die spezifische Aktivität ergibt sich dann:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{OD_{420} * V}{\varepsilon * d * t * m_{\text{Protein}}} \quad \begin{array}{l} \text{Reaktionszeit } t: 15 \text{ min} \\ \text{Masse } m \text{ des eingesetzten Proteins} \end{array}$$

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit 20-30 Plasmiden pro Zelle nur eine niedrige Kopienzahl besitzen (Lee, C. *et al.*, 2006a; Lee, C. L. *et al.*, 2006b), wurde zur Isolierung das „PureYield™ Plasmid Midiprep System“ von Promega verwendet. Dazu wurde eine Flüssigkultur des Trägerstammes in 250 ml LB mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 190 rpm in einem 1 l Schikanekolben heftig geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde die Kultur bei 10.000 g für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 12 ml Resuspensionslösung aufgenommen. Nach Zugabe von 12 ml Lysispuffer und 5 maligem Invertieren wurden die Bakterien 3 min lang lysiert. Durch Zugabe von 20 ml Neutralisationslösung und anschließendem Invertieren wurde die Lyse gestoppt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14.000 g für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch eine Filtersäule weiter geklärt, wobei das Filtrat direkt mit einer Säule zur Bindung der DNS aufgefangen wurde.

Die gebundene DNS wurde mit 5 ml Endotoxin- und 20 ml Säulenwaschpuffer gereinigt und mit 600 µl nukleasefreiem Wasser durch anlegen eines Vakuums in ein Eppendorfreaktionsgefäß eluiert. Das Isolat wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung chromosomaler DNS

4 ml einer ÜNK wurden bei 5525 g und 4 °C für 10 min pelletiert, mit 1,5 ml STE-Puffer gewaschen und bei 18.000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µl STE-Puffer gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µg Lysozym und 60 µg RNase wurden die Bakterien 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 17,5 µl 10% SDS hinzugefügt, erneut gründlich gemischt und für 15 min auf 65 °C erhitzt. Proteine wurden durch Zugabe von 500 µg Proteinase K für 2 h bei 50 °C degradiert.

Zur Extraktion der DNS wurde der Ansatz mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und anschließend zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, ohne dabei die weiße Interphase abzunehmen, und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr zu erkennen war. Um die DNS zu fällen, wurden 2,5 Vol. EtOH abs. (-20 °C) und $\frac{1}{20}$ Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,2) zugegeben, durch Invertieren gemischt (nicht vortexen!) und bei 18.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in destilliertem Wasser gelöst.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Spezifische DNS-Sequenzen wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Dabei kamen je nach Anforderung unterschiedliche Enzyme zum Einsatz. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in den entsprechenden Abschnitten.

Bei Verwendung von chromosomaler DNS als Matrize wurde entweder eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gepickt und direkt im fertigen, aliquotierten PCR-Ansatz resuspendiert oder eine Kolonie wurde zur Isolierung der DNS in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen, 10 min auf 100 °C erhitzt und anschließend weitere 10 min auf Eis gestellt. Kurz vor der Verwendung wurden die Zelltrümmer im Lysat durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 18.000 g in der Tischzentrifuge entfernt. Diente dagegen ein Plasmid als Vorlage, wurden davon etwa 100 ng eingesetzt.

Für die PCR wurden folgende Ansätze nach Vorgabe des Herstellers der jeweils verwendeten Polymerase pipettiert:

	Moltag-Polymerase (Molzym)	iProof-Polymerase (Bio-Rad)	Pfu-Polymerase (Promega)
10 × PCR-Puffer	5 µl	--	5 µl
5 × PCR-Puffer	--	10 µl HF-Puffer	--
10 µM Primer 1	2 µl	2 µl	2 µl
10 µM Primer 2	2 µl	2 µl	2 µl
20 mM dNTP-Mix	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
PCR-Enhancer	1 µl	--	--
DNS-Matrize	2 µl Zellysat oder Kolonie von Agarplatte	2 µl Zellysat oder 100 ng Plasmid-DNS	2 µl Zellysat
5 U/µl Polymerase	0,25 µl	--	--
2 U/µl Polymerase	--	0,3 µl	0,5 µl
H ₂ O _{dest} (ad 50 µl)	37,3 µl	34,2 µl	38 µl

und die Reaktionen mit folgenden Parametern durchgeführt:

	Moltag-Polymerase (Molzym)	iProof-Polymerase (Bio-Rad)	Pfu-Polymerase (Promega)
Deckelheizung	105 °C	105 °C	105 °C
Vorheizen	95 °C 5 min	98 °C 30 sec	94 °C 5 min
Denaturieren	95 °C 30 sec	98 °C 30 sec	94 °C 30 sec
Annealing	3-5 °C unter der T _m des Primers 30 sec	55-65 °C (Gradient) oder 3-5 °C über der T _m des Primers 20 sec	55-65 °C (Gradient) 45 sec
Elongation	72 °C 45-60 sec/kb	72 °C 30 sec/kb	68 °C 2 min/kb
Anzahl der Zyklen	30	35	35
Abkühlen	72 °C 5 min	72 °C 5 min	68 °C 7 min
Aufbewahrung	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞

3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel

Zur Überprüfung der amplifizierten DNS-Fragmente wurden diese je nach erwarteter Größe in einem 0,8-1,5%igen Agarosegel aufgrund ihrer negativen Ladung elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden 1,2-2,25 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer 3 min in der Mikrowelle auf höchster Stufe aufgekocht. Nach 20 minütigem Abkühlen bei 4 °C auf ca. 50 °C wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und das Gel gegossen. Luftblasen sind mit einer Kanüle entfernt worden. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit TAE-Puffer überschichtet.

PCR-Proben, die nicht weiter benötigt wurden, wurden mit 10 µl 6 × Ladepuffer versetzt und von jedem Ansatz anschließend 10 µl auf das Gel aufgetragen. Sollte das amplifizierte Fragment jedoch für Deletionen oder Ligationen eingesetzt werden, wurde ein Aliquot von 5 µl entnommen, mit 2 µl 6 × Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurden 10 µl des „GeneRuler 1 kbp Ladder“ von Fermentas verwendet. Die Auftrennung der DNS erfolgte bei 160 V für 40 min. Danach wurde das Gel unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert.

3.2.5 Bestimmung der DNS-Konzentration und des Reinheitsgrades

DNS besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zur Bestimmung des DNS-Gehalts einer Probe genutzt werden kann. Dazu wurde die optische Dichte von 1 µl der zu untersuchenden Lösung gegen das reine Lösungsmittel sowohl bei 260 als auch bei 280 nm mit Hilfe des NanoDrop Spectrophotometers bestimmt. Die Konzentration der DNS errechnete sich dann nach folgenden Formeln (wurde vom Gerät selbst durchgeführt):

$$\begin{array}{ll} \text{doppelsträngige DNS:} & c_{\text{dsDNS}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 50 \\ \text{einzelssträngige DNS:} & c_{\text{ssDNS}} [\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * 33 \end{array}$$

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ diente hierbei als Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.2.6 Deletion von Genen in *E. coli* und *S. Typhimurium* nach Datsenko und Wanner

Die Bakterien wurden üblicherweise bei 30 oder 37 °C in LB-Medium mit 190 rpm geschüttelt oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Falls notwendig wurden Antibiotika oder andere Zusätze in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: 100 µg Ampicillin/ml, 30 µg Chloramphenicol/ml, 50 µg Kanamycin/ml, 0,2 % (w/v) L-Arabinose. Zusätzlich wurden alle hergestellten *EIEC*-Mutanten auf TSB-Agarplatten mit 0,01 % (w/v) Kongorot plattiert und bei 37 °C inkubiert, um ihre Fähigkeit zur Bindung des Farbpigments zu überprüfen. Nur rote Kolonien wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet (Bahrani *et al.*, 1997).

Mutanten wurden nach der von Datsenko und Wanner (2000) entwickelten Methode hergestellt. Dazu wurde zunächst mit Hilfe zweier Oligonukleotide (65-mer) die Chloramphenicol- bzw. Kanamycinresistenzkassette von pKD3 bzw. pKD4 in einer PCR unter Benutzung der iProof-Polymerase amplifiziert. Zu diesem Zweck enthielten die 3'-Enden der Oligonukleotide die Primerbindestellen, während die 5'-Enden die Homologieregionen darstellten, welche für die site-spezifische Rekombination durch die λ -Red-Rekombinase an einem definierten Genlokus benötigt wurden. Da aufgrund der Länge der Oligonukleotide Sekundärstrukturen unvermeidlich waren, wurde die Annealingtemperatur zwischen 55 und 65 °C variiert. Von jedem PCR-Ansatz wurden 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Größe der amplifizierten Resistenzkassette zu überprüfen. 12 gleiche Ansätze wurden anschließend mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen auf einer Säule vereinigt und in 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Das eingesetzte Plasmid wurde durch einen Restriktionsverdau mit 40 U *DpnI* für 2 h degradiert, der Ansatz danach erneut gereinigt und in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Aufbewahrung des fertigen Konstrukts erfolgte bei -20 °C.

Der zu mutierende Stamm wurde zunächst mit dem temperatursensitiven Hilfsplasmid pKD46 transformiert und bei -80 °C eingefroren. Für die Deletion wurde eine Übernachtskultur dieses Stammes bei 30 °C angeimpft, am nächsten Morgen 1:100 in 20 ml frischen LB-Mediums verdünnt, dem Ampicillin und L-Arabinose zugesetzt waren, und bei 30 °C mit 190 rpm weiter geschüttelt. Nach 1,5 h wurde nochmals die gleiche Menge an L-Arabinose hinzugegeben. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 90-120 Klett wurden von dieser Kultur elektrokompente Zellen hergestellt, die nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem, destilliertem Wasser in 150 µl 10%igem Glycerinwasser resuspendiert wurden. 5-10 µl des gereinigten, linearen PCR-Produkts wurden durch Anlegen einer Spannung von 1,8 kV in die so frisch hergestellten kompetenten Zellen elektroporiert, die durch die Induktion mit L-Arabinose das auf dem Hilfsplasmid pKD46 kodierte λ -Red-Rekombinasesystem exprimierten.

Die transformierten Zellen wurden in 900 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Hälfte des Ansatzes wurde anschließend auf LB-Agarplatten supplementiert

mit Chloramphenicol oder Kanamycin sowie mit Arabinose ausplattiert und bei 30 °C für 1-2 Tage weiter inkubiert. Die verbliebene Hälfte wurde über Nacht bei RT inkubiert, danach ebenfalls ausplattiert und bei 30 °C inkubiert.

Die Kolonien auf den Agarplatten wurden durch eine PCR mit der Moltaq-Polymerase auf die korrekte Insertion der Resistenzkassette hin überprüft. Dazu wurde jedes Ende der Kassette mit einem Oligonukleotid, das spezifisch für das integrierte Resistenzgen war (c1, c2 bzw. k1, k2), in Kombination mit einem Oligonukleotid, das im 5'- oder 3'-Bereich außerhalb der Deletionsstelle hybridisierte (20-mer), amplifiziert. Positiv getestete Einzelkolonien wurden in einem Verdünnungsausstrich zweimal auf Chloramphenicol- oder Kanamycin-haltigen Agarplatten weitergestrichen und bei 37 °C inkubiert, um das Hilfsplasmid pKD46 zu eliminieren. Der Verlust von pKD46 wurde durch Testausstriche auf Ampicillin-haltigen Agarplatten kontrolliert. Bei jedem Überstreichen wurde die Insertion der Resistenzkassette nochmals mittels PCR verifiziert. Von den erhaltenen Klonen wurde eine Stammkultur bei 37 °C angeimpft und am nächsten Tag bei -80 °C eingefroren.

Um das Resistenzgen wieder zu entfernen, wurden die Mutanten mit dem temperatursensitiven Hilfsplasmid pCP20 transformiert, auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C für einen Tag inkubiert. Die Kolonien wurden durch eine PCR mit der Moltaq-Polymerase und Oligonukleotiden, die im 5'- bzw. 3'-Bereich außerhalb der Deletionsstelle hybridisierten, auf den Verlust der Resistenzkassette hin überprüft. Positiv getestete Einzelkolonien wurden in einem Verdünnungsausstrich zweimal auf antibiotikafreien Agarplatten weitergestrichen und bei 37 °C inkubiert, um das Hilfsplasmid pCP20 zu eliminieren. Der Verlust von pCP20 und des Resistenzgens wurde durch Testausstriche auf Ampicillin-, Chloramphenicol- oder Kanamycin-haltigen Agarplatten kontrolliert. Bei jedem Überstreichen wurde die Deletion der Resistenzkassette nochmals mittels PCR verifiziert. Von den erhaltenen Klonen wurde eine Stammkultur bei 37 °C angeimpft und am nächsten Tag bei -80 °C eingefroren. Die Deletionsstelle wurde bei SeqLab nach Anweisung des Dienstleisters sequenziert.

3.2.7 Spaltung von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurde zunächst das zu klonierende DNS-Fragment mit Hilfe spezieller Oligonukleotide, deren 5'-Enden für die Schnittstelle eines Restriktionsenzym kodierten (30-mer), in einer PCR amplifiziert. Um die Fehlerrate bei der Amplifikation gering zu halten, wurde entweder die iProof-Polymerase oder die Pfu-Polymerase (nur bei *manXYZ* aus *EIEC* 4608-58) verwendet, da beide eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzen und somit Lesefehler selbständig korrigieren können.

Nach der Kontrolle eines Aliquots im Agarosegel wurde der PCR-Ansatz mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden dabei bis zu 12 gleiche PCR-Ansätze auf einer Säule vereinigt und in 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Die Konzentration des erhaltenen Fragments wurde photometrisch bestimmt und anschließend sowohl für das Fragment als auch für den Ursprungsvektor folgender Restriktionsverdau getrennt angesetzt:

Plasmid- oder chromosomale DNS	10 µg
bzw. zu klonierendes Fragment	gesamte aus der PCR erhaltene Menge
10 × Restriktionspuffer	1/10 des Gesamtvolumens
Enzym	3-7 U/µg _{DNA} (max. 1/10 des Gesamtvolumens)
ad nukleasefreies Wasser	

Die Ansätze wurden mit Parafilm versiegelt und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 16 h wurde die Spaltung durch Aufreinigung der Ansätze mit dem „PCR

Purification Kit“ von Qiagen gestoppt und die gespaltene DNS in 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Falls erforderlich wurde noch eine weitere Spaltung mit einem zweiten Restriktionsenzym durchgeführt. Nach der Aufreinigung des letzten Verdaus wurde das Fragment in 30 µl, das gespaltene Plasmid in 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Die Spaltung chromosomaler DNS wurde ebenfalls nach diesem Protokoll durchgeführt, für Southern-Blots jedoch nicht weiter aufgereinigt.

3.2.8 Dephosphorylierung gespaltener Plasmid-DNS

Um während der Herstellung eines rekombinanten Plasmids die Religation des gespaltenen Vektors zu verhindern, wurden dessen 5'-Enden mit Hilfe der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) von Fermentas dephosphoryliert. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

gespaltene Plasmid-DNS	48 µl
10 × Dephosphorylierungspuffer	6 µl
1 U/µl CIAP	1 µl/30 min für 3 h

Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C inkubiert, wobei nach jeweils 30 min ein weiterer Mikroliter des Enzyms hinzugefügt wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch Aufreinigung des Ansatzes mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen gestoppt und die dephosphorylierte DNS in 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert.

3.2.9 Ligation gespaltener DNS

Für die Ligation des amplifizierten Fragments mit dem dephosphorylierten Vektor wurde folgender Ansatz pipettiert:

Fragment	x µl
Vektor	y µl
10 × Ligationpuffer	1/10 des Gesamtvolumens
5 U/µl T4 DNA Ligase	1 µl
Gesamtvolumen maximal	12 µl

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die benötigten Mengen für die beiden zu ligierenden DNS-Doppelstränge nach folgender Formel berechnet:

$$Menge_{Fragment} [ng] = \frac{Menge_{Vektor} [ng] * Größe_{Fragment} [kbp] * molares\ Verhältnis \left(\frac{Fragment}{Vektor} \right)}{Größe_{Vektor} [kbp]}$$

Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor betrug dabei 6:1 oder 8:1. Die Summe der Volumina von Fragment und Vektor war maximal 10 µl. Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.2.10 Transformation von Plasmid-DNS

Zur Transformation von Plasmiden wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen von *E. coli* oder *S. Typhimurium* auf Eis aufgetaut und mit 5 µl eines Ligationsansatzes oder 1-2 µg eines isolierten Plasmids gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30-60 sec wurden die Bakterien mit 1,8-2,25 kV elektroporiert.

Der Inhalt der Elektroporationsküvette wurde zweimal mit 450 µl LB-Medium ohne Antibiotikum ausgespült, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 1 h bei 37 °C und 190 rpm geschüttelt. Schließlich wurden 50, 100 und 200 µl Aliquots der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit einem Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert und bei 30 oder 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Auf den Agarplatten gewachsene Kolonien wurden selektiert und auf eine erfolgreiche Transformation hin untersucht. *E. coli* DH5 α -Stämme, die mit einem neu klonierten Plasmid transformiert wurden, wurden mittels PCR unter Verwendung der Moltaq-Polymerase daraufhin überprüft, ob das klonierte Fragment in der gewünschten Orientierung mit dem Vektor ligiert wurde. Dazu wurde jede der beiden Ligationsstellen jeweils mit einem Oligonukleotid, das mit dem Vektor hybridisierte, in Kombination mit einem zweiten Oligonukleotid, welches spezifisch für das eingefügte Fragment war, amplifiziert. Bei positivem Befund wurde das Plasmid isoliert und bei SeqLab nach Anweisung des Dienstleisters sequenziert. Bakterien, die GFP exprimieren sollten, wurden im UV-Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Positiv getestete Einzelkolonien, welche das gewünschte rekombinante Plasmid trugen bzw. die gewünschte Eigenschaft exprimierten, wurden als Stammkultur bei -80 °C eingefroren.

3.2.11 Southern-Blot

Die gespaltene und in einem 1%igen Agarosegel zu $\frac{2}{3}$ aufgetrennte chromosomale DNS wurde unter UV-Licht mit einem daneben liegenden Lineal als Maßstab fotografiert. Anschließend wurde das Gel 12 min in Depurinierungslösung auf einem Taumler geschwenkt, bis das Bromphenolblau des Ladepuffers sich gelblich verfärbte. Nach kurzem Waschen mit destilliertem Wasser wurde es zweimal für 15 min mit Denaturierungslösung behandelt, erneut mit destilliertem Wasser abgespült und für zweimal 30 min in Neutralisierungslösung getaucht. Vor dem Transfer der DNS auf eine „positivgeladene Nylontransfermembran für Nukleinsäuren Amersham HybondTM-N⁺“ von GE Healthcare wurde das Gel erneut mit Wasser gespült. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

In einer Schale mit 20 × SSC wurde ein kleines Podest errichtet und mit einem feuchten, gelbreiten Streifen dünnen Whatman-Papiers bedeckt, der beidseitig in den Puffer ragte. Auf diesem wurde das Gel luftblasenfrei plaziert. Die zugeschnittene und in 20 × SSC eingeweichte Membran wurde auf das Gel gelegt, gefolgt von 10 Schichten dünnen Whatman-Papiers, von denen die ersten drei zuvor ebenfalls in 20 × SSC getaucht wurden. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden vor dem Aufbau der nächsten mit einer Glaspipette zur Seite herausgewalzt. Ein 5 cm hoher Stapel zugeschnittenen Handtuchpapiers bildete den Abschluß des Blots und wurde mit einem Gewicht von 500 g beschwert. Der Transfer der DNS aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei RT über Nacht durch Kapillarwirkung.

Am nächsten Tag wurden die Geltaschen auf der DNS-Seite der Membran markiert und Agarosereste durch kurzes Waschen mit 0,1 × SSC entfernt. Anschließend wurde die Membran auf ein feuchtes Whatman-Papier gelegt und die DNS durch eine zweiminütige UV-Behandlung auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung von Sonde und Blot wurde mit dem „ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System“ von GE Healthcare nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 50 ml „ECL gold Hybridisierungspuffer“ mit 1,46 g NaCl und 2,5 g „Blocking Reagenz“ unter starkem Rühren 1 h bei RT und eine weitere Stunde bei 42 °C vermischt. Zur Vorhybridisierung wurde die Membran in eine dicht verschließbare Schale überführt, mit dem vorgewärmten Hybridisierungspuffer vollständig überschichtet und 1 h bei 42 °C und leichtem Schwenken im Wasserbad inkubiert.

Zur Markierung der Sonde wurden 300 ng des mit der Moltaq-Polymerase amplifizierte und aufgereinigten DNS-Fragments in 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen und 5 min auf 110 °C erhitzt. Die Probe wurde 5 min auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert, mit 30 µl „Labelling Reagenz“ versetzt und gut vermischt. Im Anschluß wurden 30 µl Glutaraldehyd zugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Sonde für maximal 10-15 min bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Am Ende der einstündigen Vorhybridisierung wurde die markierte Sonde auf die Membran pipettiert und die Hybridisierung über Nacht bei 42 °C im Wasserbad unter leichtem Schwenken durchgeführt.

Am nächsten Morgen wurde die Membran kurz in 42 °C warmen Primärwaschpuffer überführt, um den überschüssigen Hybridisierungspuffer zu entfernen, und dann zweimal für 20 min mit einem Überschuß an Primärwaschpuffer bei 42 °C gewaschen. Es folgten zwei weitere 5 minütige Waschschrte mit Sekundärwaschpuffer. Die Entwicklung des Blots wurde mit dem „ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System“ von GE Healthcare nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte für 15 sec, 2 min, 15 min und 1 h.

3.3 Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Methode beruht auf dem Farbumschlag von Coomassie Brilliant Blau G-250, sobald dieses in saurer Lösung an Proteine bindet. Der gebildete Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, wohingegen das des ungebundenen Farbstoffs bei 465 nm liegt. Die Proteinmenge ist dabei proportional zur Absorption und wurde aus dieser mittels einer Eichgeraden aus Rinderserumalbumin (BSA) berechnet. Die Eichgerade wurde mit je 3 Replikas pro BSA-Menge für jeden Versuch wie folgt neu bestimmt:

µl BSA-Stocklösung	10*	20*	8**	12**	16**	20**
ad 30 µl H ₂ O _{dest}	20	10	22	18	14	10
= µg BSA	1	2	4	6	8	10

* Stocklösung: 100 µg/ml; ** Stocklösung: 500 µg/ml

Von den zu messenden Proben wurden Aliquots von 1 und 1,5 µl (Caspasen-Nachweis) bzw. 30 µl (β-Galaktosidasetest) entnommen und ebenfalls ad 30 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Der Leerwert wurde aus 30 µl destilliertem Wasser hergestellt. Alle Ansätze wurden mit je 970 µl eines Bradfordreagenz/Wasser-Gemisches bestehend aus 200 µl „Protein Assay Farbstoff Konzentrat“ von Bio-Rad und 770 µl destilliertem Wasser gründlich gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Durchmischen wurde die OD₅₉₅ gegen den Leerwert gemessen.

Bei der gewählten Versuchsdurchführung war die Menge des eingesetzten Farbstoffkonzentrats für Lösungen mit einer Konzentration von 1,25-25 µg Protein/ml und einer Gesamtmenge von 1-20 µg Protein geeignet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Lipopolysaccharide und Proteine wurden entsprechend ihrer Größe unter denaturierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel vertikal aufgetrennt. Folgende Trenngele wurden zu diesem Zweck luftblasenfrei gegossen:

	LPS-Gel		Proteingele	
	20%	12%	15%	
H ₂ O	3,2 ml	3,3 ml	2,3 ml	
30% Acrylamidmix	33,3 ml	4,0 ml	5,0 ml	
1,5 M Tris pH 8,8	12,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
10% SDS	0,5 ml	0,1 ml	0,1 ml	
10% APS	0,5 ml	0,1 ml	0,1 ml	
TEMED	0,02 ml	0,004 ml	0,004 ml	

und mit folgenden Sammelgelen überschichtet:

	LPS-Gel	Proteingele
	5%	5%
H ₂ O	8,248 ml	2,7 ml
30% Acrylamidmix	2,0 ml	0,67 ml
1,5 M Tris pH 6,8	1,5 ml	0,5 ml
10% SDS	0,12 ml	0,04 ml
10% APS	0,12 ml	0,04 ml
TEMED	0,012 ml	0,004 ml

Die Gele wurden mit PAGE-Puffer bedeckt und die Taschen der Proben vor dem Beladen ausgespült. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 V für 36 h (LPS) bzw. bei 90 V für 2,25-2,5 h (Proteine). Als Längenstandard bei Proteingelen wurden 5 µl des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Fermentas oder 5 µl des „Precision Plus Protein Prestained Standards Dual Color“ von Bio-Rad aufgetragen.

3.3.3 Silberfärbung des Lipopolysaccharids

Die aufgetrennten LPS-Fraktionen wurden durch eine Färbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht (modifiziert nach Tsai and Frasch, 1982). Dazu wurde das Gel mit 200 ml Fixierer überschichtet und über Nacht auf einem Taumler geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde das Gel in den Oxidierer überführt und 5 min leicht geschüttelt. Nach drei 15 minütigen Waschstufen mit destilliertem Wasser wurde das Gel mindestens 1 h lang mit Silbernitrat gefärbt. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit destilliertem Wasser entfernt und das Gel anschließend ca. 10 min in die Entwicklerlösung eingetaucht, bis die einzelnen Banden des LPS gut sichtbar waren. Dann wurde das Gel in die Stopplösung überführt und darin bei 4 °C bis zum Einscannen aufbewahrt.

3.3.4 Western-Blot

Proteingele wurden zunächst auf eine Nitrocellulosemembran für „ECL Western blotting Hybond™ ECL™“ von GE Healthcare transferiert. Dazu wurden Membran sowie Whatman-Papier entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten und im Transferpuffer eingeweicht. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

Auf die Anode der Blotkammer wurden zunächst ein dünnes, ein dickes und noch einmal ein dünnes Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt. Auf diesen Untergrund wurde

dann die Membran und auf dieser schließlich das Gel plaziert. Es folgten noch einmal ein dünnes, ein dickes und ein dünnes Whatman-Papier als Deckschicht. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden vor dem Aufbau der nächsten mit einer Glaspipette zur Seite herausgewalzt. Der aufgebaute Blot wurde noch einmal großzügig mit Transferpuffer befeuchtet und schließlich die Kathode der Blotkammer aufgesetzt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 180 mA für 2 h.

Die transferierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dazu wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran zunächst mit 5 % Magermilchpulver in TBS Tween 20 für 1 h bei RT gesättigt. Überschüssiges Milchpulver wurde durch zweimaliges Waschen auf einem Taumler mit TBS Tween 20 für jeweils 5 min entfernt. Der Primärantikörper wurde 1:1.000 in 5 ml Bindepuffer verdünnt und zusammen mit der Membran in einem 50 ml Blaudeckelröhrchen über Nacht bei 4 °C gleichmäßig rotiert. Nicht gebundener Primärantikörper wurde am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen für je 15 min mit TBS Tween 20 entfernt. Der Sekundärantikörper gekoppelt mit der Peroxidase aus Meerschweinchen wurde 1:3.000 in Bindepuffer verdünnt und die Membran darin 1 h bei RT geschwenkt. Nach drei weiteren 15 minütigen Waschrufen mit TBS Tween 20 wurde die Membran mit dem „ECL Plus Western Blotting Detection System“ von GE Healthcare nach Anweisung des Herstellers entwickelt. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte für 15 sec, 2 min, 15 min und 1 h.

3.4 Methoden der Zellkultur

3.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden im begasten Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in 80 cm² Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI 1640 und 10% FCS kultiviert. Das Medium wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen alle 2-3 Tage gewechselt.

Zum Passagieren konfluent gewachsener Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen, um Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen zu entfernen. Nach der Zugabe von 1 ml Trypsin wurde 10 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 9 ml RPMI hinzupipettiert, zweimal vorsichtig mit der Pipette gemischt und 1-1,5 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt, in der 19 ml gewärmtes RPMI vorgelegt waren.

3.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl eukaryotischer Zellen

Die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte durch eine Färbung mit Trypanblau. Dieser Farbstoff kann nicht in lebende Zellen eindringen, wodurch diese unter dem Mikroskop heller erscheinen als tote Zellen. Von der trypsinierten Zellsuspension wurden 100 µl mit dem gleichen Volumen der Färbelösung vorsichtig vermischt und mit Hilfe einer Pasteurpipette durch Kapillarwirkung unter das Deckglas der vorbereiteten Neubauer-Zählkammer gesaugt.

Zum Aussäen oder Einfrieren der Zellen wurden die vier Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten) an den Ecken des Zählgitters ausgezählt. Unmittelbar vor einer Infektion wurden zur Bestimmung der Wirtszellzahl alle 9 Großquadrate ausgezählt. Über den Mittelwert der lebenden Zellen pro Großquadrat ergibt sich die Lebendzellzahl pro ml wie folgt:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Zellen/Großquadrat} * \text{Kammerfaktor} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Kammerfaktor: } 10^4$$

$$\text{Verdünnungsfaktor: } 2$$

3.4.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren von eukaryotischen Zellen sollten diese sehr gut konfluent gewachsen sein. 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde zunächst mit 4 ml frischem Kulturmedium vermischt und die entstandene Lösung auf Eis aufbewahrt.

Die Zellen wurden einmal mit 15 ml PBS gewaschen, trypsinisiert und in 4 ml Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zelldichte mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt (es sollten mindestens 2×10^6 Zellen/ml sein) und die Suspension auf Eis gekühlt.

Zu je 0,5 ml der Zellsuspension wurden 0,5 ml der vorgekühlten DMSO-Lösung langsam hinzugegeben. Dabei wurden die Zellen immer auf Eis gehalten, da DMSO besonders bei Wärme toxisch wirkt. Die Endkonzentration des DMSO betrug 10%.

Die entstandene Zell/DMSO-Suspension wurde in Aliquots von je 1 ml, aber mindestens 1×10^6 Zellen, auf spezielle vorgekühlte Einfriergefäße verteilt, diese fest mit Zellstoff umwickelt und bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde ein Röhrchen im 37 °C Wasserbad erwärmt und die Zellen zügig in eine Kulturflasche mit 19 ml vorgewärmtem RPMI mit FCS überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium sofort gewechselt, um das toxische DMSO zu entfernen.

3.4.4 Mikroinjektion

Aussäen der Zellen

Die Caco-2-Zellen wurden, wie unter 3.4.1 beschrieben, in Suspension gebracht und die Anzahl lebender Zellen pro ml bestimmt. $2,0 \times 10^5$ Zellen wurden in eine runde Zellkulturschale ($\text{Ø} = 5\text{ cm}$) überführt und das Medium auf 4 ml aufgefüllt. Pro Bakterienstamm, der injiziert werden sollte, wurden vier Schalen vorbereitet und für 2 Tage im begasteten Brutschrank bei 37 °C inkubiert, bis sich Inseln aus 20-50 Zellen gebildet hatten.

Animpfen und Aufarbeitung der Bakterien

Für die Mikroinjektion wurde von einem Injektionsaliquot eine Verdünnungsreihe je nach Stamm und Lebendbakterienzellzahl bis 10^{-5} (*S. Typhimurium* SL1344) oder 10^{-7} (*S. Typhimurium* 12023) angelegt. Von der höchsten Verdünnungsstufe wurden dann verschiedene Volumina in KlettKolben mit 40 ml LB-Medium und Antibiotika so angeimpft, daß eine der Kulturen nach ca. 15 h Schütteln mit 190 rpm bei 37 °C eine optische Dichte von 130 Klett erreicht hatte.

Von dieser Kultur wurden 2 ml bei 18.000 g für 10 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 2 ml PBS (sterilfiltriert, eiskalt) gewaschen und in 2 ml PBS (sterilfiltriert, eiskalt) resuspendiert. Davon wurde 1 ml in eine Photometerküvette pipettiert und die OD_{600} gegen den Leerwert bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden ist damit die Dichte der Bakterien im verbleibenden Milliliter geschätzt und mit eiskaltem PBS auf etwa $4-8 \times 10^8$ Bakterien/ml eingestellt worden. Ein Aliquot der Bakteriensuspension wurde mit dem gleichen Volumen Texas Red[®]-Dextran 70.000 vermischt, so daß die Dichte der Bakterien in der Injektionslösung etwa $2-4 \times 10^8$ Zellen/ml betrug. Bis zur Injektion wurden alle Kulturen auf Eis aufbewahrt.

Durchführung der Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde am inversen Mikroskop mit Wärmetisch (auf 37 °C vorgewärmt) durchgeführt. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und durch 4 ml RPMI mit $5\text{ }\mu\text{g}$ Gentamicin/ml ersetzt. Die Injektionskapillare wurde mit $3\text{ }\mu\text{l}$ der vorbereiteten Bakterienkultur befüllt und dann etwa 200 Zellen innerhalb von 30 min injiziert. Zur

Kontrolle, ob während der Injektion die Bakterien auch durch Invasion in die Zellen eindringen, wurden 3 µl der Probe in einer weiteren Kulturschale direkt auf den Zellenrasen pipettiert.

Nach der Mikroinjektion wurden beide Schalen dreimal mit 4 ml PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und anschließend 4 ml RPMI mit 50 µg Gentamicin/ml zugegeben. Dies wurde als Zeitpunkt 0 h nach der Injektion (p. i.) definiert. Nach weiteren 30 min Inkubation im begasten Brutschrank wurde das Medium gegen RPMI mit 10 µg Gentamicin/ml ersetzt. Jeder Versuch wurde zweimal mit je 2 Replikaten pro Bakterienstamm durchgeführt.

Etwa 5 h und 24 h nach der Mikroinjektion (p. i.) wurden unter dem Mikroskop die injizierten Zellen, zu erkennen am injizierten Farbstoff, gesucht und die Anzahl der Bakterien darin bestimmt. Für die Auswertung wurden nur solche Schalen berücksichtigt, in denen 5 h p. i. bei mindestens 7 % der injizierten Zellen Bakterien zu sehen waren. Dieselben Schalen wurden dann auch nach 24 h ausgewertet.

3.4.5 Bakterielle Kulturbedingungen vor einer Infektion

Zur Induktion des auf dem Virulenzplasmid kodierten Typ III Sekretionssystems, das die für eine Invasion von eukaryotischen Zellen notwendigen Proteine sekretiert, wurden *EIEC*-Stämme 15 h über Nacht bei 30 °C in 20 ml TSB geschüttelt, am nächsten Morgen 1:100 in 20 ml frischem, vorgewärmtem TSB verdünnt und für weitere 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert (Dagberg and Uhlin, 1992; Tobe *et al.*, 1993).

Die Fähigkeit von *S. Typhimurium* zur Invasion eukaryotischer Zellen ist im Gegensatz zu *Shigella/EIEC* nicht temperaturabhängig, sondern wird von einem hohen Salzgehalt und einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck des Mediums sowie in der spätlogarithmischen Wachstumsphase der Kultur positiv beeinflusst (Lundberg *et al.*, 1999; Monack *et al.*, 2001). Um jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu den *EIEC* zu gewährleisten, wurde eine Übernachtskultur von *S. Typhimurium* 14028s bei 37 °C in 20 ml LB mit 0,5 % NaCl dennoch belüftet, nach 15 h in 20 ml frischem, vorgewärmtem LB mit 1 % NaCl im Verhältnis 1:100 verdünnt und für weitere 2,5 h bei 37 °C geschüttelt.

Beim Erreichen der spätlogarithmischen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} \approx 1$, dies entsprach abhängig vom verwendeten Photometer etwa $1 \cdot 10^9$ Bakterien pro ml) wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10 % FCS (oder ohne FCS, wenn angegeben) verdünnt und anschließend in unterschiedlichen Verhältnissen (MOI) zu den Wirtszellen gegeben (s. unten). Alle Infektionsansätze wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, um die genaue Anzahl der eingesetzten Bakterien zu bestimmen.

3.4.6 Proteinisolierung aus infizierten Zellen für Western-Blots

Zwei Tage vor einer Infektion wurden die Zellen, wie unter 3.4.1 beschrieben, in Suspension gebracht und die Anzahl lebender Zellen pro ml bestimmt. $4,0 \cdot 10^6$ HeLa- bzw. $5,0 \cdot 10^6$ Caco-2-Zellen wurden in eine runde Zellkulturschale ($\varnothing = 10$ cm) überführt und das Medium auf 13 ml aufgefüllt.

Am Tag der Infektion wurde die Anzahl der Zellen in einer der Schalen bestimmt. Die spätlogarithmischen Bakterienkulturen wurden in RPMI mit 10 % FCS verdünnt und die übrigen Schalen mit einer MOI von 50 Bakterien pro Zelle für 1 h ohne Zentrifugation bei 37 °C im begasten Brutschrank damit infiziert. Im Anschluß wurde das Infektionsmedium entfernt und durch RPMI mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien abzutöten. Dies wurde als Zeitpunkt 0 h nach der Infektion (p. i.) definiert. Nach einer weiteren Stunde wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. Als Negativkontrolle wurden an Stelle der Bakterienkultur 600 µl LB mit

1 % NaCl und als Positivkontrolle 10 μ M (HeLa) bzw. 50 μ M (Caco-2) Camptothecin eingesetzt.

10 h p. i. wurden die Gesamtproteine wie folgt isoliert (alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt): Das Gentamicin-haltige Medium wurde entfernt und die Proben einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 μ l eiskaltem Zellysepuffer bei 4 °C für 5 min lysiert, mit Hilfe eines Schabers abgekratzt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 10 mal durch eine 1 mm Kanüle aufgezogen, um die chromosomale DNS zu scheren, und anschließend zweimal für je 10 min bei 18.000 g und 4 °C zentrifugiert, wobei das Gefäß zwischendurch um 180° gedreht wurde.

100 μ l des Überstands wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Bradford-Assays abgenommen und zunächst bei -20 °C eingefroren. 650 μ l des Überstands wurden mit 217 μ l 4 \times Laemmli-Puffer vermischt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt. 37,5 μ g der isolierten Gesamtproteine wurden anschließend in einem etwa 10 \times 6 cm großen und 1 mm dicken 12%igen (Caspase-1, -8 und -9) bzw. 15%igen (Caspase-3 und -7) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels spezifischer Antikörper entwickelt.

3.4.7 Adhäsionsassay

Für eine Infektion wurden 1 \times 10⁵ Zellen/Napf in eine 24-Napf-Platte eingesät und für zwei Tage im begasten Brutschrank bei 37 °C gezüchtet, bis sich ein zu 90% konfluenter Zellrasen gebildet hatte.

Die Adhäsionsfähigkeit der Bakterien an Caco-2-Zellen wurde mit Hilfe von Cytochalasin D untersucht, um das Aktinzytoskelett der Wirtszellen zu zerstören und eine aktinabhängige bakterielle Zellinvasion zu verhindern. Dazu wurden die Zellen 30 min vor der Infektion mit frischem RPMI, das 10% FCS und 1 μ g Cytochalasin D/ml enthielt, inkubiert. Anschließend wurden die spätlogarithmisch gewachsenen Bakterien mit einer konstanten MOI von 17 Bakterien pro Zelle hinzugegeben.

Der Adhäsionsansatz wurde in der Gegenwart von 1 μ g Cytochalasin D/ml ohne Zentrifugation für 1 h im begasten Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Bakterien, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht an die Zellen adhärirt hatten, wurden durch sechsmaliges Waschen des Zellrasens mit RPMI, das 10% FCS und 1 μ g Cytochalasin D/ml enthielt, entfernt. Zur Bestimmung der Anzahl adhärenter Bakterien wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in eiskaltem, destilliertem Wasser für 10 min lysiert, um die Bakterien von den Zellen zu lösen. Eine Verdünnungsreihe in PBS wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert. Jeder Versuch wurde dreimal mit je drei Replikaten pro Bakterienstamm durchgeführt.

3.4.8 Invasions- und Replikationsassay

Die Zellen wurden zwei Tage vor der Infektion in einer Dichte von 1 \times 10⁵ Zellen/Napf in eine 24-Napf-Platte eingesät und bei 37 °C im begasten Brutschrank inkubiert. Die Bakterien wurden in RPMI mit 10% FCS (oder ohne FCS, wenn angegeben) verdünnt und für einen Invasionsassay mit einer MOI von 17 zu den Zellen gegeben. Zur Bestimmung der Replikation wurden unterschiedliche MOIs verwendet, um 1 h p. i. eine ähnliche Anzahl intrazellulärer Bakterien zu erhalten.

Die Infektion wurde bei 173 g und 37 °C für 5 min zentrifugiert, um die Invasion zu synchronisieren, und für 45 min (*EIEC*) oder 60 min (*Salmonella*) im begasten Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das Infektionsmedium entfernt und durch RPMI mit 10% FCS und 100 μ g Gentamicin/ml ersetzt, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien abzutöten. Dies wurde als Zeitpunkt 0 h p. i. definiert. Nach einer weiteren Stunde wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 μ g/ml gesenkt. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der

Infektion wurde das Gentamicin-haltige Medium entfernt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in eiskaltem, destilliertem Wasser für 10 min lysiert. Eine Verdünnungsreihe in PBS wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert. Jeder Versuch wurde dreimal mit je drei Replikaten pro Bakterienstamm durchgeführt.

3.4.9 Messung der Glukoseverwertung mit D-[U-¹⁴C₆]-Glukose

1 * 10⁷ Zellen wurden in eine 175 cm² Zellkulturflasche eingesät und für 2 Tage gezüchtet, um einen zu 90 % konfluenten Zellrasen von etwa 1,8 * 10⁷ Zellen zu erhalten. Pro Bakterienstamm und nicht infizierten Kontrollen wurden 2 Flaschen vorbereitet. Am Tag der Infektion wurde das Kulturmedium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und mit/ohne Bakterien ersetzt. Aufgrund unterschiedlicher Invasionsraten und intrazellulärer Generationszeiten der Bakterien wurde die MOI zwischen 20 (für *EIEC* HN280 WT) und 100 (für *EIEC* 4608-58 WT und *Stm* 14028s WT) variiert, um eine ungefähre Lebendzellzahl von 10⁷ intrazellulären Bakterien für *EIEC* 4608-58 und 10⁸ lebenden Bakterien für *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s pro Flasche zum Erntezeitpunkt isolieren zu können.

Die Infektion wurde für 1 h im begasten Brutschrank ohne Zentrifugation bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das Infektionsmedium entfernt, einmal mit RPMI gewaschen und die verbliebenen extrazellulären Bakterien vor dem Beginn der ¹⁴C-Markierung durch RPMI mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml abgetötet (Zeitpunkt 0 h p. i.). Nach 30 min wurde das Medium erneut durch 20 ml frisches RPMI mit 10 % FCS, 20 µg Gentamicin/ml und 200 µmol D-[U-¹⁴C₆]-Glukose (spezifische Aktivität 0,5 MBq/mmol) ersetzt.

Zu den Zeitpunkten 6,5 h p. i. (für beide *EIEC*-Stämme) bzw. 8,5 h p. i. (für *Stm* 14028s) wurden die infizierten Zellen sowie die nicht infizierten Kontrollen viermal mit 15 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 10 ml eiskaltem, destilliertem Wasser mit 0,1 % TritonX-100 für 20 min lysiert und anschließend heftig gevortext. 2,5 ml des Lysats wurden als Probe für den Gesamteinbau von ¹⁴C in Wirtszellen und Bakterien verwendet und sofort bei -80 °C eingefroren. Zelltrümmer und Zellkerne der Wirtszellen wurden durch drei Zentrifugationsschritte bei 212 g und 4 °C für je 5 min entfernt. Der Überstand mit den Bakterien und den löslichen Wirtszellbestandteilen wurde bei 5525 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der resultierende Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und als Probe für den ¹⁴C-Einbau der Wirtszellen verwendet. Die Bakterien wurden mit 5 ml RIPA-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Diese Fraktion wurde als Probe für die Analyse des bakteriellen ¹⁴C-Verbrauchs benutzt. Die Anzahl der Bakterien in den drei Fraktionen wurde vor dem Einfrieren durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Agarplatten bestimmt.

Zur Messung der aufgenommenen Radioaktivität wurden 0,1 ml des ¹⁴C-haltigen RPMI zu den Zeitpunkten 0 und 6,5 bzw. 8,5 h p. i. sowie 1 ml der vierten Waschfraktion, des Lysats, des zellulären Proteinüberstands und des Bakterienpellets mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) gut vermischt und mit einem Szintillationszähler ausgewertet. Die Aufzeichnung des radioaktiven ¹⁴C-Zerfalls erfolgte für 3 min je Probe. Als Negativkontrolle diente 1 ml RPMI mit 10 % FCS und 10 mM natürlich vorkommender Glukose.

3.4.10 ¹³C-Isotopolog-Perturbationsanalyse

1 * 10⁷ Zellen wurden in eine 175 cm² Zellkulturflasche eingesät und für 2 Tage gezüchtet, um einen zu 90 % konfluenten Zellrasen (1,8 * 10⁷ Zellen) zu erhalten. Pro Bakterienstamm wurden 5-10 Flaschen vorbereitet. Am Tag der Infektion wurde das Kulturmedium durch 20 ml RPMI 1640 mit/ohne 10 % FCS und mit/ohne Bakterien ersetzt. Aufgrund

unterschiedlicher Invasionsraten und intrazellulärer Generationszeiten der Bakterien wurde die MOI zwischen 20 (für *EIEC* HN280 WT und der entsprechenden $\Delta uhpT$ -Mutante sowie den invasiveren *ptsG*-Mutanten und der $\Delta uhpT$, *manXYZ*-Mutante von *EIEC* 4608-58) und 100 (für alle anderen Stämme) variiert, um eine ungefähre Lebendzellzahl von 10^7 - 10^8 intrazellulären Bakterien für *EIEC* 4608-58 bzw. *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s zum Erntezeitpunkt pro Flasche isolieren zu können.

Die Infektion wurde für 1 h im begasten Brutschrank ohne Zentrifugation bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das Infektionsmedium entfernt und durch 20 ml RPMI mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt, um verbliebene extrazelluläre Bakterien vor dem Beginn der ^{13}C -Markierung abzutöten (Zeitpunkt 0 h p. i.). Nach 30 min wurde das Medium erneut durch frisches RPMI mit 10% FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM D-[U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert.

Zu den Zeitpunkten 6,5 h p. i. (für beide *EIEC*-Stämme) bzw. 8,5 h p. i. (für *Stm* 14028s) wurden die infizierten Zellen mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 10 ml eiskaltem, destilliertem Wasser mit 0,1% TritonX-100, 10 mM Na-Azid, 5 µg Tetracyclin/ml und 50 µg Chloramphenicol/ml für 20 min lysiert und anschließend heftig gevortext. Zelltrümmer und Zellkerne der Wirtszellen wurden durch drei Zentrifugationsschritte bei 212 g und 4 °C für je 5 min entfernt. Der Überstand mit den Bakterien und den löslichen Wirtszellproteinen wurde bei 5525 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der resultierende Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und als Probe für die Analyse der aus den Wirtszellen stammenden Aminosäuren verwendet. Die Bakterien wurden mit 5 ml RIPA-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Diese Fraktion wurde als Probe für die Analyse der bakteriellen Aminosäuren benutzt. Die Anzahl der Bakterien in den einzelnen Fraktionen wurde vor dem Einfrieren durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Agarplatten bestimmt.

Die Erstellung der Isotopologenprofile wurde von Dr. Eva Eylert und Dr. Wolfgang Eisenreich am Institut für Chemie, Abteilung Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt. Dazu wurde die gesamte Fraktion der bakteriellen oder der Wirtszellproteine in 0,5 ml 6 M HCl für 24 h bei 105 °C hydrolysiert und die erhaltenen Aminosäuren in ihre *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Derivate überführt. Der ^{13}C -Überschuß pro C-Atom und die Isotopologzusammensetzung der einzelnen Hydrolysate wurden, wie in Eylert *et al.* (Eylert *et al.*, 2008) beschrieben, mittels des Shimadzu QNP-Plus 2000 Systems analysiert.

3.5 Tierexperimente

3.5.1 Haltung von BALB/cOlaHsd-Mäusen

Versuchstiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in Isolatoren gehalten und *ad libitum* mit autoklaviertem Wasser und Trockenfutter versorgt. Die Haltung der Tiere und Durchführung der Versuche erfüllte die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und Auflagen der Regierung von Unterfranken.

Weibliche, 5 Wochen alte BALB/cOlaHsd-Mäuse wurden zur Eingewöhnung bereits eine Woche vor Versuchsbeginn geliefert und in Gruppen zu maximal 5 Tieren pro Käfig aufgeteilt. Die Tiere wurden alle 3-4 Tage in saubere Käfige umgesetzt und mit frischem Wasser und Futter versorgt.

3.5.2 Bestimmung der Bakterienzahl in Leber, Milz und Tumor

14 Tage vor der Infektion wurde ein konfluent gewachsener Monolayer von 4T1-Zellen, wie unter 3.4.1 beschrieben, mit Trypsin in Suspension gebracht, aber nicht in RPMI aufgenommen, sondern 2 mal mit je 10 ml endotoxinfreiem PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Anschließend wurde eine Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in endotoxinfreiem PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ eingestellt. Hiervon wurden 6 Wochen alten BALB/c-Mäusen auf der abdominalen rechten Seite $5 \cdot 10^4$ Zellen (= 100 μl der Suspension) subkutan implantiert. Die Tiere wurden bis zur Ausbildung des 4T1-Tumors nach etwa 2 Wochen weiter unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten.

Am Tag der Infektion wurde 1 ml einer Bakterienkultur aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase 4 mal mit endotoxinfreiem PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und anschließend eine Bakteriendichte von $5 \cdot 10^7$ Bakterien/ml in endotoxinfreiem PBS $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ eingestellt. $5 \cdot 10^6$ Bakterien (= 100 μl der Suspension) wurden intravenös in die Schwanzvene injiziert. Im weiteren Verlauf des Versuches wurden zu bestimmten Zeitpunkten 3 Tiere pro Bakterienstamm getötet und Leber, Milz sowie der Tumor entnommen und gewogen. Zur Zerkleinerung wurden Leber und Milz in 5 bzw. 3 ml PBS mit einem Gewebehomogenisator zerrieben, der Tumor zerschnitten und in Portionen von maximal 0,5 g mit je 1 ml PBS in einem Lysing Matrix D-Röhrchen für 30 sec auf Stufe 6,5 homogenisiert. Die einzelnen Gewebehomogenisate wurden nochmals für 5 sec mit Ultraschall (Stufe 6) behandelt, um die restlichen Zellen zu zerstören. Die Anzahl der Bakterien in den einzelnen Organen wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf LB-Agarplatten bestimmt und in die Einheit Bakterien/g_{Gewebe} umgerechnet.

3.5.3 Histologie und Immunfluoreszenzfärbung

Der Tumor wurde, wie unter 3.5.2 beschrieben, gesetzt und die Mäuse entsprechend infiziert. Nach der Entnahme des Tumors zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurde dieser sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Färbung wurde das Gewebe über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Taumler in 4 % PFA aufgetaut und fixiert. Nach drei Waschrissen mit 10 ml PBS für je 30 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ wurde das Organ von links nach rechts halbiert und mit der Schnittfläche nach unten in 5% Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt in PBS eingebettet. Zur vollständigen Aushärtung der Agarose wurden die Präparate eine Stunde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und anschließend am Vibratom 100 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden in PBS mit 0,3 % TritonX-100 aufbewahrt. Unspezifische Bindestellen wurden vor der Antikörperbehandlung durch eine einstündige Vorinkubation in PBS mit 0,3 % TritonX-100 und 5 % Ziegenserum bei RT gesättigt. Die Primärantikörper, Höchst 33342 und Phalloidin-FITC wurden entsprechend in PBS mit 0,3 % TritonX-100 verdünnt. Die Bindung erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ unter leichtem Schwenken. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3-5 mal für je 10 min bei RT mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper und Streptavidin-Cy3 wurden ebenfalls in PBS mit 0,3% TritonX-100 verdünnt und die Präparate für 4 h bei RT unter leichtem Schwenken damit inkubiert. Nach fünf weiteren zehnminütigen Waschrissen wurden die Gewebeschnitte für 30 min in 60%iges Glycerin in PBS transferiert und schließlich in 80%igem Glycerin in PBS auf einem Objektträger eingebettet. Das Deckglas wurde mit Nagellack versiegelt und die Präparate im Dunkeln bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Betrachtung am konfokalen Mikroskop gelagert (Weibel *et al.*, 2008).

3.5.4 magnetische Zellsortierung

Zwei Wochen vor der Infektion wurde ein konfluent gewachsener 4T1-Monolayer, wie unter 3.5.2 beschrieben, präpariert und jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen bei 4 Mäusen pro Gruppe beidseitig an der Brust subkutan implantiert. Nach einer Entwicklungsdauer der Tumore von 14 Tagen wurden die Mäuse, wie unter 3.5.2 beschrieben, infiziert.

Die Tumore wurden zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion entnommen, gewogen und in 4 ml Dispase/DNase I-Lösung auf Eis gekühlt. Das Gewebe wurde mit einer Schere in möglichst feine Stücke zerkleinert und die Tumormatrix sowie die freigesetzte, chromosomale DNA anschließend durch eine einstündige Inkubation bei 37 °C im begasten Brutschrank verdaut. Die freigesetzten Zellen wurden mit Hilfe eines 70 µm und darauf folgend eines 40 µm Siebes separiert und vereinzelt. Diese erste Fraktion wurde als „Gesamtumor -Gentamicin“ bezeichnet. Aus der so gewonnenen Suspension an Tumorzellen und Bakterien wurden 200 µl zur Bestimmung der Zell- und Bakterienzahl entnommen. Schließlich wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von 300 µg Gentamicin/ml für 1 h bei 37 °C abgetötet. Diese zweite Fraktion wurde als „Gesamtumor +Gentamicin“ bezeichnet. Auch hier wurden 200 µl zur Bestimmung der Bakterienzahl entnommen.

Anschließend wurden die Zellen durch magnetische Sortierung (MACS[®]) in F4/80⁻ und F4/80⁺ Zellen getrennt. Dazu wurde die Suspension zur Entfernung von Dispase und DNase I für 10 min bei 4 °C und 202 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 µl frischen MACS-Puffer resuspendiert. Pro 10^8 Zellen in der Suspension wurden 10 µl des Primärantikörpers hinzugegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Zugabe der gleichen Menge an Sekundärantikörper und eine weitere Inkubation für 15 min bei 4 °C. Die markierte Zellsuspension wurde auf eine mit 500 µl MACS[®]-Puffer vorinkubierte und mit einem Permanentmagneten verbundene MACS[®]-MS Säule von Miltenyi Biotec pipettiert. Nach dem Durchfluß der Suspension wurde die Säule nochmals mit 1 ml MACS[®]-Puffer gespült. Diese so erhaltene dritte Fraktion wurde mit „F4/80“ bezeichnet. Zur Gewinnung der F4/80⁺-Zellen wurde die Säule vom Magneten getrennt und das darin verbliebene Restvolumen von etwa 500 µl zusammen mit den Zellen mittels eines Stempels in ein Eppendorfreaktionsgefäß gepreßt. Von jeder erhaltenen Subfraktion wurde ebenfalls die Gesamtzahl an Tumorzellen durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer sowie die Anzahl lebender Bakterien durch Lyse der Zellen (heftiges Vortexen) und Ausplattieren einer Verdünnungsreihe in PBS mit 0,1 % TritonX-100 auf LB-Agarplatten bestimmt. Aus den ermittelten Zahlen wurde für jede Fraktion die Anzahl der Bakterien in der Einheit Bakterien/Tumorzelle errechnet (Galmbacher, 2008).

3.6 Statistische Methoden

Sofern nicht anders angegeben repräsentieren die Datenpunkte in den Diagrammen den Mittelwert aus drei Einzelmessungen. Die Balken geben die Standardabweichung dieser drei Messungen wieder. Die Berechnung und Darstellung erfolgte mit OriginPro 8G.

Die statistische Auswertung erfolgte in Excel 2003 mit dem zweiseitigen, heteroskedastischen Student-t-Test. Als signifikant wurden dabei *P*-Werte < 0,05 angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Replikation von *S. Typhimurium* 14028s im Zytoplasma von Epithelzellen nach Mikroinjektion oder Infektion

4.1.1 Der Stamm *S. Typhimurium* 14028 AL01 exprimiert ein R-Form LPS

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, daß *S. Typhimurium* 14028s Wildtyp (*Stm* 14028s WT) nach Mikroinjektion effizient im Zytoplasma von humanen Caco-2-Epithelzellen replizieren kann. Dabei konnten 5 h nach der Injektion (p. i.) von *Stm* 14028s WT in etwa 40-50 % der Zellen, in denen Bakterien gefunden wurden, deutlich mehr als 30 Bakterien beobachtet werden. Die hohe Anzahl an Bakterien, die innerhalb der 5 stündigen Replikationsphase erreicht wurde, läßt auf eine schnelle Vermehrung von *Salmonella* im Zytoplasma von Caco-2-Zellen schließen (Götz, 2005). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, die bei Infektionsexperimenten feststellten, daß eine *sifA*-Mutante von *Stm* SL1344 besser in HeLa-Epithelzellen repliziert als der entsprechende Wildstamm (Stein *et al.*, 1996). Als Grund für dieses Verhalten fanden Beuzón *et al.* (2000) heraus, daß eine *sifA*-Mutante von *Stm* 12023 in der Lage ist, die Membran der SCV zu lysieren und ins Zytoplasma der Wirtszelle zu entkommen.

Diese Resultate stehen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen früherer Mikroinjektionen, bei denen ein ebenfalls als *S. Typhimurium* 14028s Wildtyp bezeichneter Stamm nur in weniger als 1 % der injizierten Zellen replizieren konnte (Goetz *et al.*, 2001). Daher wurde die Mikroinjektion in Caco-2-Zellen mit dem damals verwendeten Bakterienstamm, der im folgenden als *S. Typhimurium* 14028 AL01 bezeichnet wird, unter den Bedingungen, wie sie in der Arbeit von Götz A. (2005) beschrieben sind, wiederholt. Zunächst wurde das Plasmid pKSBC16-*P_{sod}-gfp* (Goetz M. und Bubert A., nicht veröffentlicht) in diesen Stamm eingeführt. Das unter dem listeriellen *sod*-Promotor konstitutiv exprimierte GFP ermöglichte es, die Bakterien nach der Mikroinjektion unter dem Fluoreszenzmikroskop zu detektieren und ihre Anzahl im Zytoplasma der Wirtszellen zu bestimmen. Gleichzeitig mit den Bakterien wurde der nicht membrangängige Farbstoff Texas Red[®]-Dextran 70.000 (Molecular Probes) in die Zellen injiziert, der es erlaubte, die injizierten Zellen später wieder zu identifizieren. Wachstumsversuche in M9-Minimalmedium mit 0,1-9 % (w/v) Dextran 70.000 als einziger Kohlenstoffquelle zeigten, daß das Glukosepolymer nicht von *S. Typhimurium* degradiert werden kann (Daten nicht gezeigt).

Im Zytoplasma replizierte *Stm* 14028 AL01 durchschnittlich nur in etwa 1 % der injizierten Caco-2-Zellen deutlich, d. h. es wurden mehr als 32 Bakterien 5 h p. i. beobachtet. In rund $\frac{2}{3}$

der injizierten Zellen war hingegen keine Replikation zu erkennen (Abb. 2). Damit bestätigte sich auch das frühere Ergebnis von Goetz M. *et al.* (2001). Absolut gesehen wurden nur in 2 von insgesamt 198 Zellen mit Bakterien mehr als 32 Bakterien gefunden. Zur Überprüfung, ob zusätzlich eine Infektion der Zellen während der Dauer der Mikroinjektion stattgefunden hat, wurden in einer getrennten Schale die Salmonellen direkt auf den Zellrasen pipettiert. In diesen Kontrollen wurden nie mehr als 4 Bakterien pro Zelle gezählt (Daten nicht gezeigt). In den Injektionsschalen und den Infektionskontrollen waren aber auch sehr viele extrazelluläre, teilweise adhärenente Bakterien erkennbar, die sich selbst durch mehrmaliges waschen mit PBS nicht entfernen ließen. Erschwerend war bei Verwendung dieses Stammes die Glaskapillare häufig verstopft, wodurch die Effizienz der Mikroinjektion gegenüber den vorangegangenen Versuchen signifikant zurückging.

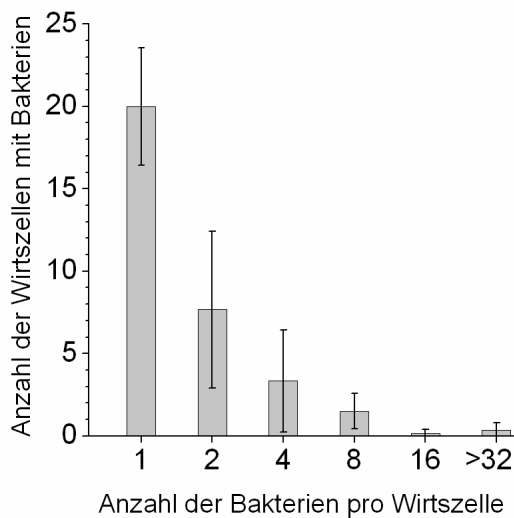


Abb. 2: Replikation von *S. Typhimurium* 14028 AL01 im Zytoplasma von Caco-2-Zellen nach Mikroinjektion. Injiziert wurde eine ÜNK bei 130 Klett-Einheiten. 5 h p. i. wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt ist die Anzahl an erfolgreich injizierten Zellen aufgeschlüsselt nach der Anzahl der intrazellulären Bakterien. Die Angaben geben den Mittelwert ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen mit je zwei Replikas wieder.

Im daraufhin betrachteten Phasenkontrastbild waren bei *Stm* 14028s WT zu über 99 % einzelne, homogen verteilte und äußerst bewegliche Bakterien zu sehen. Im Gegensatz dazu bildeten die Zellen des Stammes *Stm* 14028 AL01 Aggregate aus 5-10, teilweise aber auch mehr Bakterien (Abb. 3). Dieser Phänotyp trat sowohl im M9-Minimal- als auch im LB-Vollmedium unabhängig von der Wachstumsphase auf und erinnert an die Morphologie einer *EIEC* 12860 *slyA*-Mutante (Spory, 2001). Analysen des *slyA*-Gens mit *Salmonella*-spezifischen PCR-Primern ergaben jedoch keinen Hinweis auf einen Defekt dieses Gens.

Auch die Form der Kolonien auf LB-Agarplatten war nicht mit der des Wildtyps identisch und besaß mit rauhen an Stelle von glatten Rändern ein klassisches Merkmal von Rau-Mutanten. Daher wurde das LPS isoliert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Längenpolymorphismus des O-Antigens, der durch die Verknüpfung einer unterschiedlichen

Anzahl an Tetrasaccharidmonomeren durch die O-Antigen-Polymerase Rfc entsteht (Collins and Hackett, 1991), war bei *Stm* 14028s WT deutlich ausgeprägt (Abb. 4, Spuren 1 und 2).

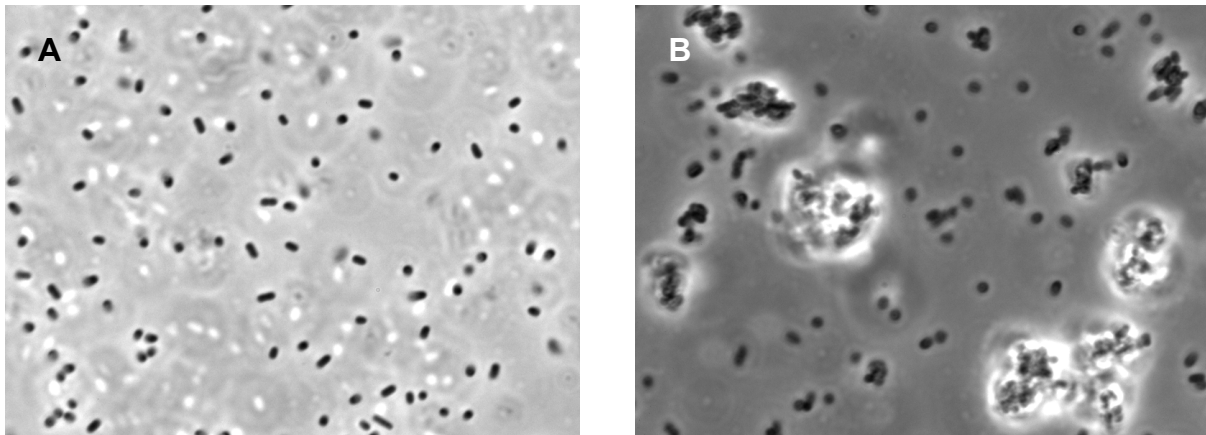


Abb. 3: Phasenkontrastaufnahmen von *S. Typhimurium* 14028s WT (A) und AL01 (B). Die Aufnahmen zeigen Kulturen, die 27 h in M9-Minimalmedium mit 50 mM Glukose und 1% Casaminoacids gewachsen sind. Deutlich zu erkennen ist die Bildung von Aggregaten im Stamm AL01.

Seitenketten bestehend aus etwa 1-5 und 15-35 O-Antigen-Untereinheiten traten überwiegend auf, während Zwischengrößen nur in geringeren Mengen nachweisbar waren. Das LPS-Pattern entsprach dem der Stämme *Stm* SL1344 WT und *Stm* LT2 WT (Spuren 6 und 7; Goldman and Leive, 1980; Goldman and Hunt, 1990). Das Muster der *Stm* 14028s *slyA::amp*-Mutante wies zwar leichte Veränderungen auf, aber auch hier waren insbesondere die längeren Seitenketten am häufigsten vorhanden (Spur 5).

Demgegenüber bestehen die O-Antigen-Seitenketten einer als semi-rauh bezeichneten *rfc*-Mutante nur aus einem einzigen Tetrasaccharidmonomer (Collins and Hackett, 1991). Entsprechend war die LPS-Fraktion von *Stm* 14028s Δrfc (Anhang 6) überwiegend aus kürzeren Lipopolysacchariden einheitlicher Länge zusammengesetzt (Spur 8). Im Wildstamm ligiert die O-Antigenligase RfaL die polymerisierten Seitenketten mit dem äußeren Core des LPS (MacLachlan *et al.*, 1991). Durch deren Deletion wurde die LPS-Struktur von *Stm* 14028s $\Delta sifA$, *rfaL* (Anhang 6) auf das Lipid A, die innere sowie die äußere Kernzone reduziert (Spur 9). In der LPS-Fraktion von *Stm* 14028 AL01 konnten demnach keine O-Antigene mehr detektiert werden (Spur 3). Sie war in ihrer Größe und Zusammensetzung vielmehr identisch mit der von *Stm* 14028s $\Delta sifA$, *rfaL* und der des Rauh-Stammes *Stm* 14028r (Spur 4). Das LPS des in der vorangegangenen Arbeit injizierten *E. coli* K-12 bestand ebenfalls nur aus der Polysaccharidkernregion gebunden an Lipid A (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe des Plasmids pAG125, das für die O-Antigen-Ligase RfaL aus *Stm* 14028s WT unter der Kontrolle des konstitutiven, listeriellen *sod*-Promotors kodiert (Anhang 1), konnte

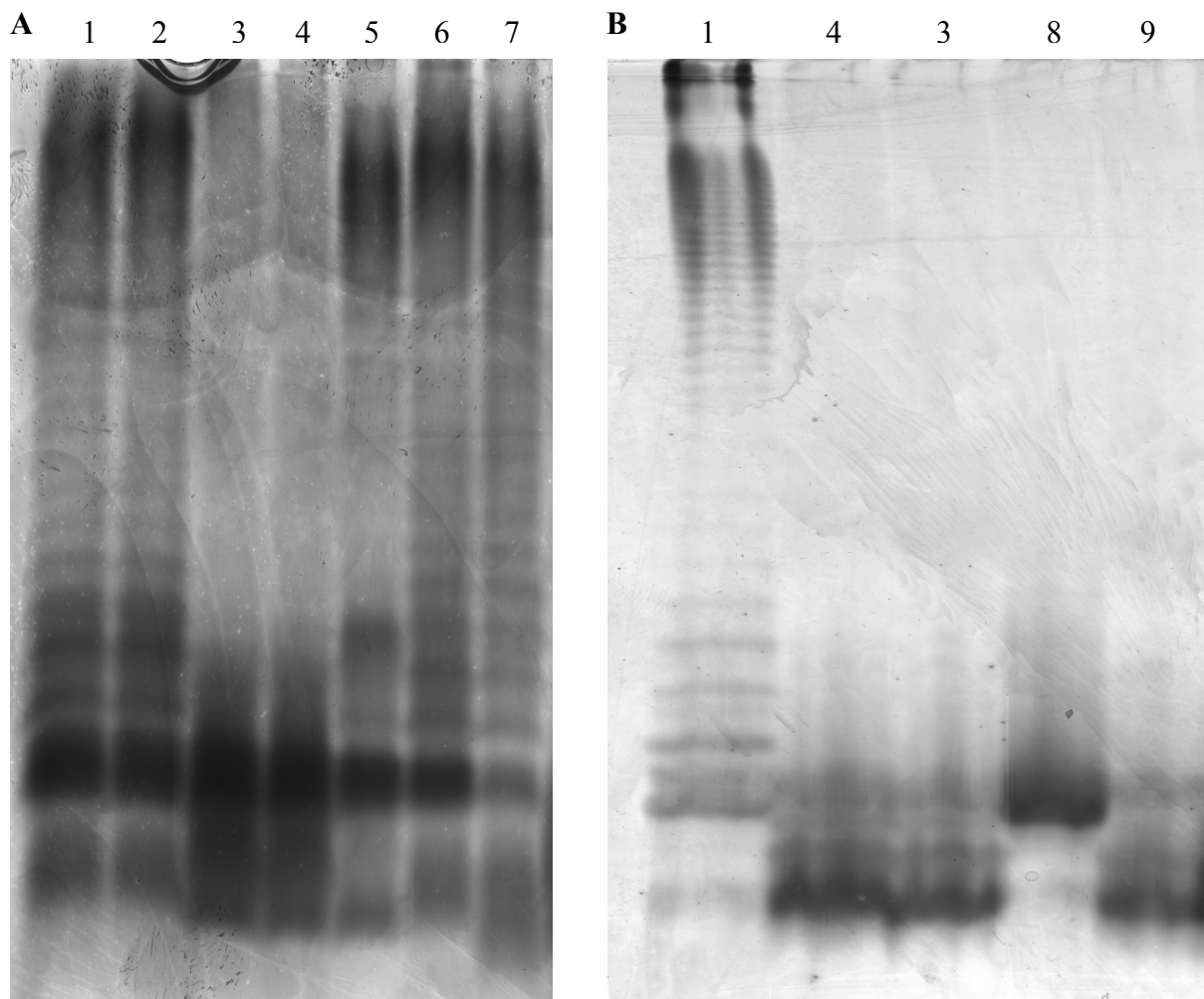


Abb. 4: LPS-Muster von verschiedenen *S. Typhimurium*-Stämmen und -Mutanten. Die LPS-Proben auf dem rechten Gel (B) wurden im Vergleich zu denen auf dem linken Gel (A) weiter aufgetrennt, um eine bessere Auflösung der einzelnen Banden zu erreichen.

(1) 14028s WT (M. Hensel, Erlangen). (2) 14028s WT (Institutssammlung, S. J. Libby, Seattle). (3) 14028 AL01 (A. Ludwig). (4) 14028r (Institutssammlung, S. J. Libby, Seattle). (5) 14028s *slyA::amp* (Daniels *et al.*, 1996). (6) SL1344 WT (A. Ludwig, Frankfurt). (7) LT2 type strain (DSMZ). (8) 14028s Δrfc . (9) 14028s $\Delta sifA$, *rfaL*.

die S-Form der Kolonien bei *Stm* 14028s $\Delta sifA$, *rfaL* wiederhergestellt werden. Eine Komplementierung der anderen beiden Rauh-Stämme, *Stm* 14028 AL01 und *Stm* 14028r, war mit diesem Plasmid aber nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Eine Komplementierung durch Zugabe von 10 mM Galaktose, Glukose oder Mannose in das Kulturmedium war ebenfalls nicht erfolgreich, so daß ein Defekt in der Synthese dieser Zucker als Ursache ebenfalls nicht in Frage kam. Daher wurden die an der O-Antigensynthese beteiligten Gene (*rfa*- und *rfb*-Gencluster) sowie einige weitere Gene (*rfaE*, *rfaH*, *hnr*, *rpoS*, *fis*, *envZ* und *ompR*) von *Stm* 14028s WT und beiden Rauh-Mutanten sequenziert. Ein anschließender Vergleich der Sequenzen miteinander und der publizierten Sequenz von *Stm* LT2 (McClelland *et al.*, 2001) zeigte, daß sowohl bei *Stm* 14028 AL01 als auch bei *Stm* 14028r die Insertion eines Desoxythymidins an Position 76 des offenen Leserasters von *rfbP* kodierend für die Undekaprenylphosphat-galaktosephosphotransferase stattgefunden hat. Diese katalysiert die

Verknüpfung des ersten Galaktoserestes des Tetrasaccharidmonomers mit dem Membrananker Undekaprenylphosphat (Wang, L. *et al.*, 1996). Infolge der Baseninsertion traten zahlreiche Stoppcodons bei der Translation auf. Weitere im Vergleich zur publizierten Referenzsequenz von *S. Typhimurium* LT2 gefundene Mutationen hatten zwar teilweise auch Auswirkungen auf die jeweiligen Proteine, traten aber sowohl im Wildstamm von *Stm* 14028s als auch in den Rauh-Mutanten auf. Daher konnten sie nicht für deren Phänotyp verantwortlich sein. Eine Komplementierung mit dem wildtypischen *rfbP* war jedoch nicht erfolgreich, da die konstitutive Expression vom listeriellen *sod*-Promotor aus einen toxischen Effekt auf die Mutanten hatte.

Ungeachtet der unterschiedlichen Genotypen waren alle *rfbP* oder *rfaL* Rauh-Mutanten sowohl auf LB-Agarplatten als auch in Flüssigkultur morphologisch identisch. Nach Mikroinjektion replizierte auch *Stm* 14028r kaum (Daten nicht gezeigt). Dagegen vermehrte sich eine nicht invasive *invG*-Mutante von *Stm* 12023 (Penheiter *et al.*, 1997) mit vollständigem O-Antigen in etwa 30% der Zellen, in denen 5 h nach der Injektion Bakterien gefunden wurden, stark (Abb. 5).

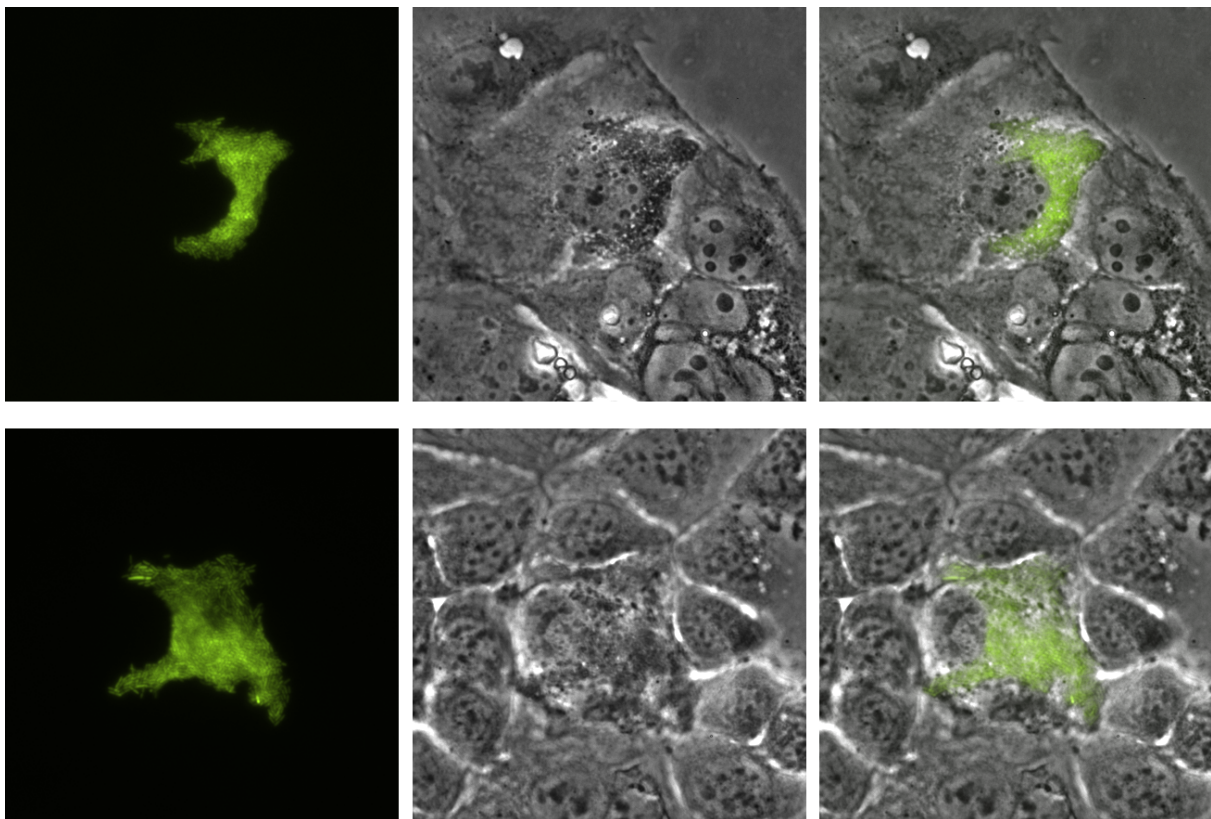


Abb. 5: Mikroinjektion von *S. Typhimurium* 12023 *invG::mTn5* pFPV25.1 in Caco-2-Zellen. 5 h nach der Injektion konnten bereits Zellen, in denen sich die Bakterien stark vermehrt hatten, beobachtet werden. Links: Fluoreszenzaufnahmen der GFP-markierten Bakterien; Mitte: Phasenkontrastaufnahmen der Zellen; Rechts: Überlagerungen.

4.1.2 Rauh-Mutanten zeigen eine erhöhte Adhärenz an Caco-2-Zellen

Eine Ursache für den festgestellten Replikationsdefekt der Rauh-Mutanten könnte die eingesetzte Gentamicinmenge von 5 µg/ml während der Mikroinjektion gewesen sein. Fehlt wie bei deep rough-Mutationen außer dem O-Antigen auch der äußere Core des LPS, weisen solche Bakterien oftmals auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber hydrophoben Antibiotika auf (Nikaido, 1976). Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Gentamicin ergab jedoch keinen Unterschied zwischen *Stm* 14028 AL01, *Stm* 14028r sowie dem Wildstamm. Bis zu einer Gentamicinkonzentration von 1 µg/ml konnten alle Stämme im LB-Medium replizieren. 5 µg Gentamicin/ml inhibierten das Wachstum bis zu 8 h lang, wohingegen ab einer Konzentration von 10 µg/ml auch nach 24 h keine Vermehrung der Bakterien mehr feststellbar war (Daten nicht gezeigt).

Die schon während der Mikroinjektion von *Stm* 14028 AL01 und *Stm* 14028r beobachtete erhöhte Adhärenz von Rauh-Mutanten an Caco-2-Zellen wurde durch einen Cytochalasin D-Assay bestätigt. Bei gleicher eingesetzter Bakterienmenge adhärten etwa 8-9 mal mehr Bakterien von *Stm* 14028r an die Wirtszellen als wildtypische Keime. Jedoch replizierten bei einer Infektion von Caco-2-Zellen im Gegensatz zu den glatten Varianten weder *Stm* 14028r noch eine Δ *sifA*-Mutante dieses Stammes (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Resultate wurde ausschließlich der von Prof. M. Hensel aus Erlangen bezogene Wildstamm (Abb. 3A und Abb. 4, Spur 1) für die nachfolgenden Deletionen und Experimente mit *S. Typhimurium* 14028s verwendet.

4.1.3 Konstruktion der *S. Typhimurium* 14028s Δ *sifA*-Mutante

Die Deletion von *sifA* sowie alle nachfolgenden wurden nach der von Datsenko und Wanner (2000) entwickelten Methode durchgeführt. Da SifA zur Ausübung seiner biologischen Funktion ein C-terminales Hexapeptid zur Verankerung in der Membran benötigt (Boucrot *et al.*, 2003), wurde die Deletion von AS 5-336 durchgeführt.

Durch die Deletion nach dieser Methode bleibt im Anschluß an die Entfernung der Resistenzkassette eine 84 bp lange Sequenz zurück, die in allen sechs möglichen Leserastern Stoppcodons enthält. Des weiteren kodiert die Sequenz für eine neue Ribosomenbindestelle (RBS) und ein neues Startcodon zur Translation nachgeschalteter Gene (Datsenko und Wanner, 2000). Die Position der RBS und des neuen Startcodons wurde so gewählt, daß sie *in-frame* mit dem ursprünglichen Leseraster des deletierten Gens lagen und so die Translation

am ursprünglichen Stoppcodon terminiert wurde. Die neue Sequenz nach der Deletion von *sifA* ist in Anhang 6 dargestellt.

4.1.4 Infektion mit *S. Typhimurium* 14028s Δ *sifA* aktiviert die Caspasen 9 und 3 in HeLa-Zellen

Infiziert man humane HeLa-Zellen mit *S. Typhimurium* 12023 WT bzw. *sifA::mTn5*, so zeigt die *sifA*-Mutante 8 h nach der Infektion (p. i.) eine vergleichbare Replikation wie der Wildtyp, nach 16 h aber eine um etwa den Faktor 5 erhöhte Vermehrung (Beuzon *et al.*, 2002). Allerdings steigt auch 10 h p. i. bei den Zellen, die mit *Stm* SL1344 Δ *sifA* infiziert sind, der Anteil an Annexin-V positiven Zellen stark an (Götz, 2005). Dieses Anzeichen für Apoptose wurde zunächst durch die Ermittlung der Anzahl lebender intrazellulärer Bakterien und anschließend durch die Überprüfung der Aktivierungszustände der Caspasen-1, -3, -7, -8 und -9 näher untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Kulturen aus der spätlogarithmischen Phase ($OD_{600} = 0,9-1,0$) infiziert (MOI = 10, Infektionsdauer = 1 h).

Stm 14028s WT und Δ *sifA* drangen mit gleicher Effizienz in die Zellen ein und infizierten zum Zeitpunkt 0 h p. i. etwa $\frac{1}{3}$ aller HeLa-Zellen. Nach der Internalisierung der Bakterien benötigten beide Stämme eine lag-Phase von etwa 1-3 h bevor sie sich nahezu exponentiell in den Zellen vermehren konnten. In dieser logarithmischen Phase von 3-8 h p. i. betrug die Generationszeit des Wildstammes 123 ± 29 min, wohingegen die der Δ *sifA*-Mutante mit 105 ± 24 min etwas kürzer war (Abb. 6A). Nach 12 h, und damit früher als von Beuzón *et al.* (2002) beschrieben, hatte sich der Δ *sifA*-Stamm aber sehr viel stärker in den Zellen vermehrt als der Wildtyp. Jedoch ging die Anzahl lebender intrazellulärer Bakterien im Anschluß daran bei der Mutante deutlich zurück, während sie beim Wildtyp weiter anstieg (Abb. 6B).

Die Reduktion der Kohlenhydrataufnahme durch Deletion der Gene *ptsG*, *manXYZ* und *uhpT* in Wildstamm und Δ *sifA*-Mutante hatte nur geringen bis keinen Einfluß auf die intrazelluläre Replikation der resultierenden Mutanten in HeLa-Zellen. Insbesondere verhinderte dies nicht den Rückgang der Anzahl an lebenden intrazellulären Bakterien bei der Δ *sifA*-Mutante 24 h nach der Infektion (Daten nicht gezeigt).

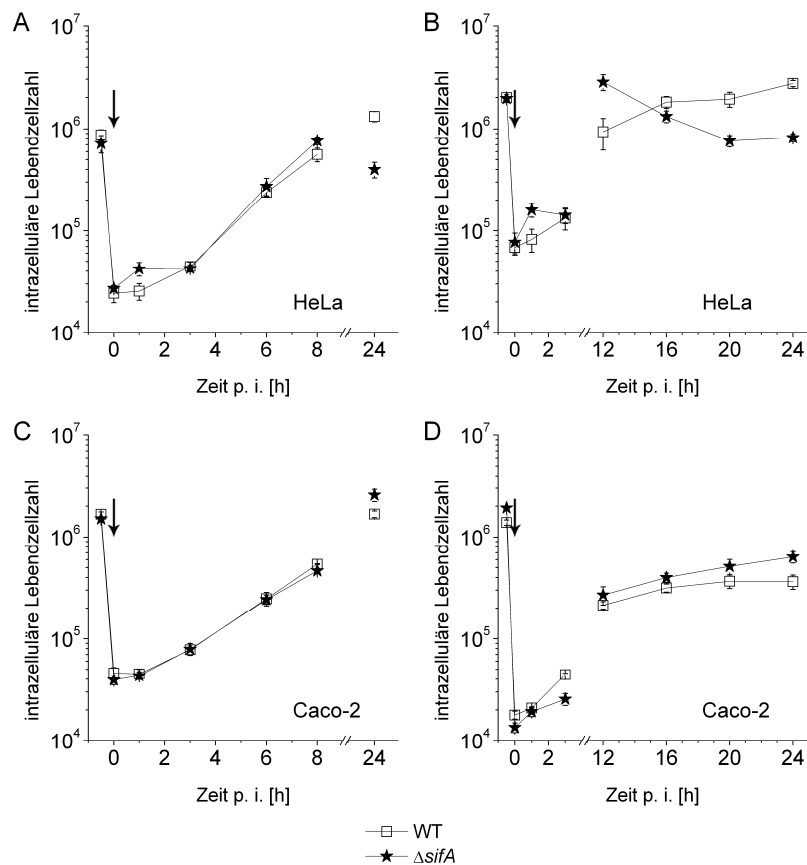


Abb. 6: Replikation von *S. Typhimurium* 14028s WT und $\Delta sifA$ in HeLa-Zellen (oben) und Caco-2-Zellen (unten). Bis zum Zeitpunkt 8 h p. i. war die Replikation von WT und Mutante in beiden Zelllinien in etwa identisch (A, C). 12 h p. i. hatte sich die Mutante in HeLa-Zellen jedoch stärker vermehrt als der Wildtyp, anschließend wurde aber ein merklicher Rückgang bei der Anzahl lebender Bakterien beobachtet (B), der in Caco-2-Zellen nicht auftrat (D). Pfeile markieren den Zeitpunkt der Gentamicinzugabe.

Dieser Rückgang wurde vermutlich durch den einsetzenden Tod der HeLa-Zellen infolge der Infektion mit der $\Delta sifA$ -Mutante verursacht. *S. Typhimurium* kann während der Infektion von Makrophagen den Tod der Wirtszelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch verschiedene Mechanismen induzieren: Innerhalb der ersten Stunde der Infektion durch SPI-1-abhängige Aktivierung der Caspase-1 (Hersh *et al.*, 1999). Ebenfalls SPI-1-vermittelt, aber Caspase-1-unabhängig nach 3 Stunden (Jesenberger *et al.*, 2000) oder unter Beteiligung der SPI-2 nach 12-24 h (van der Velden *et al.*, 2000). Dagegen sind HeLa- und aus der Ratte stammende IEC-6-Epithelzellen normalerweise durch die Wirkung des SPI-1-Effektorproteins SopB vor dem programmierten Zelltod geschützt (Knodler *et al.*, 2005). Erst nach einer Infektionsdauer von 24-28 h mit *S. dublin* kann in humanen HT-29-Darmepithelzellen Apoptose durch Aktivierung der Caspase-3 beruhend auf unbekannt Genen der SPI-2 und des *spv*-Lokus beobachtet werden (Paesold *et al.*, 2002).

In HeLa-Zellen, die mit der $\Delta sifA$ -Mutante infiziert wurden, traten jedoch bereits 10 h p. i. erste Anzeichen von Apoptose auf. Wie aus Abb. 7A hervorgeht, führte die Infektion von HeLa-Zellen mit *Stm* 14028s WT oder $\Delta sifA$ nicht zu einer verstärkten proteolytischen

Spaltung der Procaspasen-8, -1 und -7. Zudem konnten die aktiven Formen der Caspasen-8 und -7 nicht nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Aktivierung entsprach bei diesen drei Proteasen dem der Negativkontrolle, weshalb ein extrazelluläres Signal als Auslöser für den Zelltod unwahrscheinlich ist. Ebenso zeigten HeLa-Zellen, die mit *Stm* 14028s WT infiziert wurden, keine Anzeichen einer Induktion der Apoptose über den intrinsischen Weg. Caspase-9 war in den infizierten Zellen im selben Maße aktiv wie in der Negativkontrolle, aktive Caspase-3 konnte in beiden Proben nicht detektiert werden (Abb. 7A, Spuren 1 und 2). Die Infektion der HeLa-Zellen mit der Δ *sifA*-Mutante steigerte jedoch die Menge des aktiven Fragments p35 der Initiatorcaspase-9 deutlich über das Niveau der Positivkontrolle (10 μ M Camptothecin) hinaus. Die Aktivität der nachgeschalteten Effektorcaspase-3 war bei Infektion mit der Mutante ebenfalls signifikant gegenüber den Zellen aus der Negativ- und der Wildtyp-Kontrolle erhöht (Abb. 7A, Spur 3).

In infizierten Caco-2-Zellen war dagegen bei keiner der untersuchten Caspasen nach einer Infektionsdauer von 10 h eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen (Abb. 7B). Selbst in der Positivkontrolle konnte keine signifikante Induktion der Caspase-9 festgestellt werden, obwohl die eingesetzte Konzentration von Camptothecin mit 50 μ M 5 mal höher war als bei HeLa-Zellen. Dies lag vermutlich an einer teilweisen Differenzierung der konfluent gewachsenen Caco-2-Zellen und der damit verbundenen verringerten Sensitivität auf den Topoisomerase I-Wirkstoff Camptothecin (Ulukan *et al.*, 2001). Sowohl bei Infektion mit *Stm* 14028s WT als auch Δ *sifA* war insbesondere die aktive Form der Caspase-3 nicht nachweisbar, obwohl auch hier die Δ *sifA*-Mutante etwas besser replizierte als der WT (Abb. 6C und D).

Die beobachtete Apoptose in HeLa-Zellen könnte eine Reaktion der Wirtszellen auf die zytoplasmatisch replizierenden Salmonellen darstellen. Es ist aber auch denkbar, daß *S. Typhimurium* nicht an die Replikation im Zytoplasma angepaßt ist und durch einen zusätzlichen evtl. in Kombination mit einem nicht sekretierten Faktor die Apoptose induziert. Unabhängig davon scheinen Caco-2-Zellen aber auf Salmonellen, die sich im Zytoplasma vermehren, weniger sensitiv zu reagieren. Aus diesem Grund und weil M-Zellen während der ersten Phase einer Infektion sowohl für enteroinvasive *E. coli* als auch für *S. Typhimurium* die natürliche Eintrittspforte in den Wirtsorganismus sind, wurden die nachfolgenden Infektionsexperimente in humanen Caco-2-Darmepithelzellen durchgeführt.

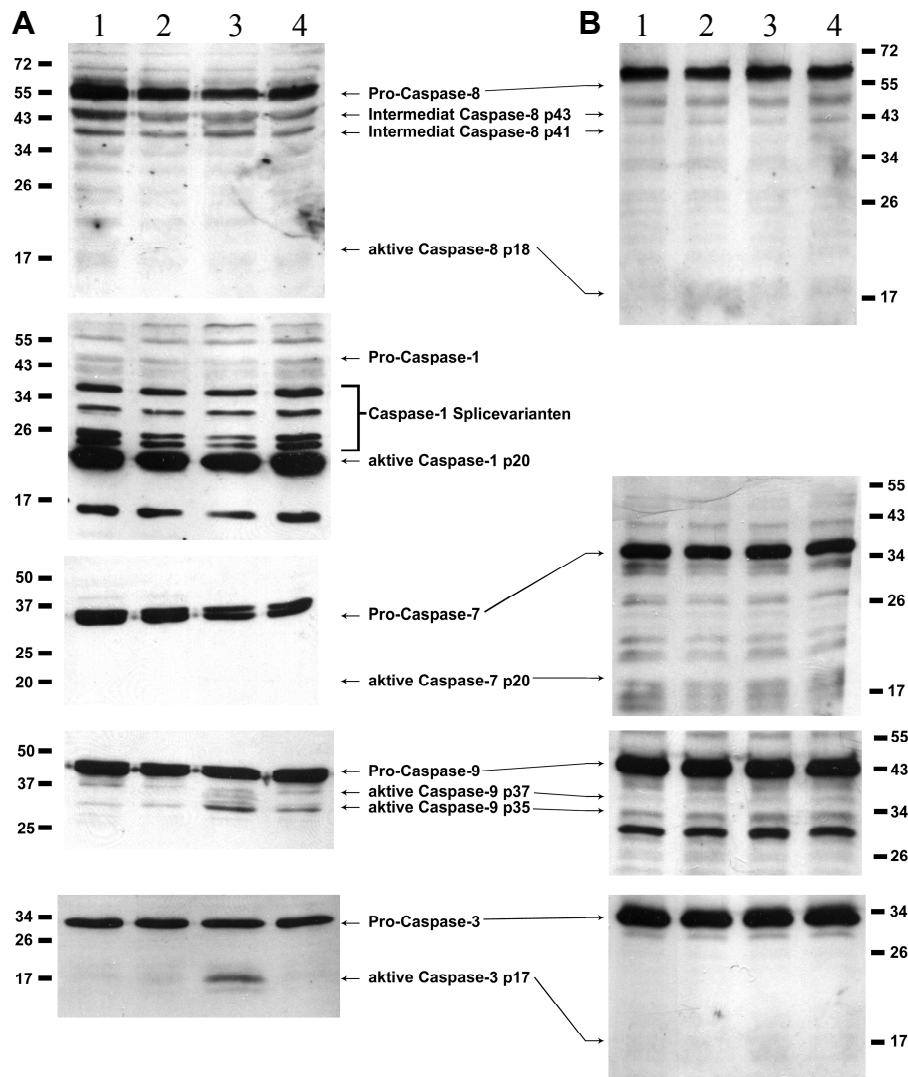


Abb. 7: Aktivitätszustände der Caspasen-8, -1, -7, -9 und -3 in HeLa- (A) und Caco-2- (B) Epithelzellen nach Infektion mit *S. Typhimurium* 14028s WT und $\Delta sifA$. (1) Negativkontrolle LB. (2) WT. (3) $\Delta sifA$. (4) Positivkontrolle Camptothecin. Die Zellen wurden 1 h mit einer MOI von 50 infiziert. 10 h p. i. wurden die Gesamtproteine isoliert und 37,5 μ g Protein für die Western-Blot Analyse in einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten wurden die Caspasen mit spezifischen Antikörpern detektiert. Neben den Gelen sind außen die Größen des Längenstandards [kDa] und in der Mitte jene Fragmente der Caspasen angegeben, welche von den verwendeten Antikörpern erkannt werden können (Angaben aus dem Datenblatt des jeweiligen Herstellers entnommen).

4.2 Wachstum von *E. coli* und *S. Typhimurium* im Minimalmedium auf unterschiedlichen Kohlenhydraten und C₃-Substraten

4.2.1 *EIEC* 4608-58 und *EIEC* HN280 gehören zu unterschiedlichen phylogenetischen *E. coli*-Gruppen

S. Typhimurium 14028s gehört ebenso wie der Stamm LT2 anhand der biochemischen Charakterisierung des LPS zur Gruppe B der Gattung *Salmonella*. Demnach enthält das Tetrasaccharidmonomer des O-Antigens Abequose als letzten Zucker (Luk *et al.*, 1993; Oliver *et al.*, 2002). Zur genaueren Einordnung der verwendeten klinischen Isolate enteroinvasiver *E. coli* (*EIEC*) wurden deren phylogenetische *E. coli*-Gruppen nach den Kriterien von Clermont *et al.* (2000) mittels PCR bestimmt.

Demnach war *EIEC* 4608-58 (Sansonetti *et al.*, 1982) *chuA*⁺, *yja*⁻ und TspE4.C2⁻. Das Vorhandensein von *chuA* und Fehlen von *yja* ist charakteristisch für Mitglieder der phylogenetischen Gruppe D (Clermont *et al.*, 2000). Dagegen konnte keines dieser drei DNS-Fragmente in *EIEC* HN280 (Nicoletti, M. *et al.*, 1988) nachgewiesen werden. Die Merkmalskombination *chuA*⁻ und TspE4.C2⁻ ist aber charakteristisch für Stämme der Gruppe A (Clermont *et al.*, 2000), in die auch *E. coli* K-12 eingeordnet wird (Herzer *et al.*, 1990).

4.2.2 Konstruktion der Glukose- und Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten von *E. coli* und *S. Typhimurium*

Zur Untersuchung des bakteriellen Kohlenstoffmetabolismus während der Infektion eukaryotischer Zellen wurden zunächst definierte Aufnahmemutanten konstruiert, indem jene Gene deletiert wurden, deren Proteine den Transport von Glukose (Glc), Mannose (Man) oder Glukose-6-phosphat (Glc6P) in die Bakterienzelle katalysieren. Dadurch kommt es nicht zur Ansammlung möglicher toxischer Intermediate aus dem Stoffwechsel in der Bakterienzelle, wie dies bei einer *galE*-Mutante der Fall ist (Germanier and Furer, 1971). Zu den wichtigsten Transportern für eine Reihe natürlich vorkommender Zucker zählen in Bakterien die Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferasesysteme (PTS). Für 6 von den 14 in *E. coli* bekannten Kohlenhydrat-spezifischen PTS Proteinen existieren Untersuchungen, die den Transport von Glukose unter bestimmten Voraussetzungen belegen (Review Postma *et al.*, 1993). Von diesen jedoch stellt PtsG das Protein mit der höchsten Affinität für Glukose dar, gefolgt von ManXYZ (Curtis and Epstein, 1975; Stock *et al.*, 1982; Erni and Zanolari, 1985; 1986). Glukose-6-phosphat wird dagegen nur über UhpT aufgenommen (Island *et al.*, 1992).

Bei *EIEC/E. coli* K-12 wurde *ptsG* von Aminosäure (AS) 6-474, *manXYZ* ab AS 2 von *manX* bis 282 von *manZ* und *uhpT* von AS 6-461 deletiert. Bei *Stm* 14028s umfaßte die Deletion von *ptsG* die AS 4-474, für *manXYZ* die AS 4 von *manX* bis 274 von *manZ* und in *uhpT* die AS 3-459. In *Stm* 14028s wurde zusätzlich *glk* von AS 4-319 deletiert. Die neuen Basenabfolgen nach der Deletion von *ptsG*, *manXYZ* und *uhpT* sowie *glk* sind in Anhang 6 für *Stm* 14028s und Anhang 7 für *EIEC/E. coli* K-12 dargestellt.

4.2.3 Die Aufnahme von Glukose durch enteroinvasive *E. coli* erfolgt überwiegend durch zwei PTS-Transporter

Der Phänotyp dieser Mutanten wurde zunächst in RPMI 1640 unter Zugabe von 10 mM Glukose, Mannose oder Glukose-6-phosphat charakterisiert. Dieses Medium wurde gewählt, da es auch für die Kultivierung von humanen Caco-2-Zellen und während der Infektion mit den untersuchten Bakterien eingesetzt wurde. Die Konzentration der Kohlenhydrate entspricht in etwa der von Glukose im menschlichen Blut, die zwischen 3 und 8 mM beträgt, im Darm aber auch höhere Werte erreichen kann.

Die Wildstämme der beiden untersuchten klinischen *EIEC*-Isolate, *EIEC* 4608-58 und *EIEC* HN280, replizierten im RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 2 mM L-Glutamin und 10 mM Glukose mit ähnlichen Generationszeiten von $48 \pm 0,2$ min bzw. 49 ± 1 min wie ein *E. coli* K-12 Wildstamm ($46 \pm 0,5$ min) und erreichten ähnliche Zelldichten von $OD_{600} = 1,5-1,6$ (Abb. 8).

Die Deletion von *ptsG*, das für EIICB des wichtigsten Glukose-spezifischen PTS-Transporters kodiert (Postma *et al.*, 1993), verlangsamte erwartungsgemäß bei allen drei Stämmen das Wachstum der resultierenden Mutanten auf Glukose. Dabei verlängerten sich die Verdopplungszeiten der beiden *EIEC* $\Delta ptsG$ -Mutanten mit 70 ± 1 min (*EIEC* 4608-58) und 89 ± 1 min (*EIEC* HN280) jedoch weniger stark als die der *E. coli* K-12 Mutante mit 133 ± 1 min. Die *ptsG*-Deletionsmutante von *EIEC* 4608-58 wuchs bis zu einer maximalen Zelldichte von $OD_{600} = 1,2$ und bildete damit wesentlich mehr Biomasse als die Mutanten der anderen beiden Stämme, die sich nur bis zu einer OD_{600} von 0,8 vermehrten. Jedoch erreichte die *ptsG*-Deletionsmutante von *EIEC* HN280 diese in deutlich kürzerer Zeit als die Mutante von *E. coli* K-12 (Abb. 8). Vermutlich können die alternativen Systeme in beiden *EIEC*-Stämmen Glukose effizienter aufnehmen als in *E. coli* K-12.

Das Wachstum aller $\Delta ptsG$ -Mutanten im Minimalmedium mit Mannose oder Glukose-6-phosphat als Substrat wurde im Vergleich zu den Wildstämmen durch diese Deletion nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

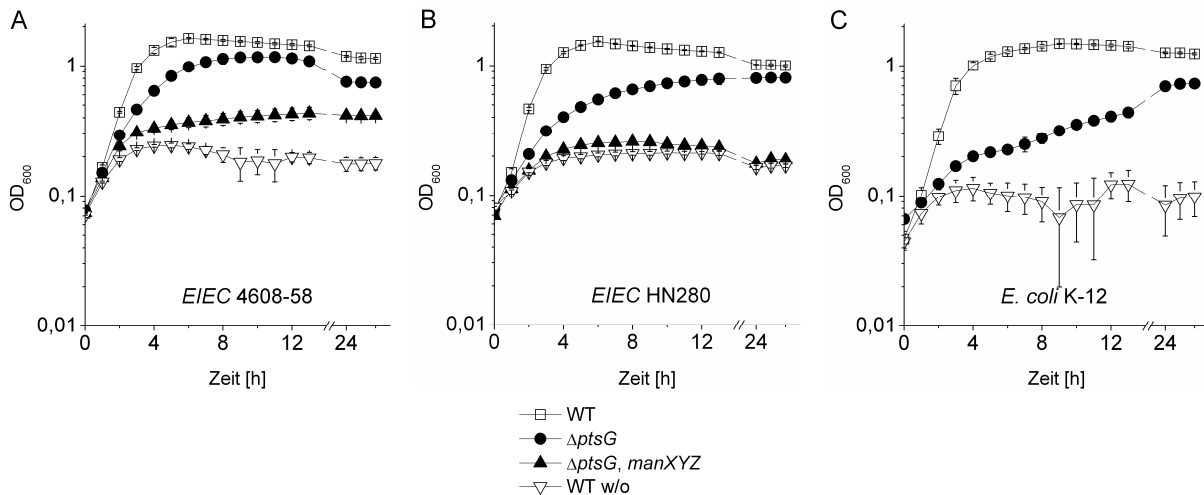


Abb. 8: Wachstum von *EIEC* 4608-58 (A), *EIEC* HN280 (B) und *E. coli* K-12 (C) Wildstämme (WT) und Glukoseaufnahmemutanten ($\Delta ptsG$; $\Delta ptsG, manXYZ$) in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose. Als Kontrolle diente jeweils das Wachstum des Wildstammes in RPMI 1640 ohne Zugabe von Kohlenhydraten (w/o). Die im Text angegebenen Generationszeiten wurden während des exponentiellen Wachstums innerhalb der ersten 3 h als Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen errechnet.

Zur weiteren Reduktion der Glukoseaufnahme wurde im nächsten Schritt sowohl in den beiden *EIEC*-Wildstämmen als auch in deren $\Delta ptsG$ -Mutanten *manXYZ* deletiert, das für EIIAB, IIC und IID des wichtigsten Mannose-spezifischen PTS kodiert, aber ebenfalls Glukose transportieren kann (Curtis and Epstein, 1975; Stock *et al.*, 1982). Alle Wildstämme replizierten nur langsam in RPMI 1640 mit 10 mM Mannose; eine exponentielle Phase war dabei nicht zu identifizieren. Die Generationszeiten waren mit 68 ± 1 min (*EIEC* 4608-58) bzw. 85 ± 2 min (*EIEC* HN280) länger als bei Zugabe von Glukose und die Zelldichten erreichten maximale OD₆₀₀-Werte von 0,6-0,8, wobei auch hier wieder *EIEC* 4608-58 WT besseres Wachstum zeigte als *EIEC* HN280 WT oder *E. coli* K-12 WT (Abb. 9).

Beide *EIEC* $\Delta manXYZ$ -Mutanten waren nicht mehr in der Lage, sich mit Mannose als Substrat zu vermehren (Abb. 9A, B). Die geringe Zunahme der Zelldichte entsprach der bei den Wildstämmen in RPMI ohne Kohlenhydrate. Das Wachstum auf Glukose oder Glukose-6-phosphat wurde durch die Deletion von *manXYZ* nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

Dagegen konnte bei den $\Delta ptsG, manXYZ$ -Doppelmutanten beider *EIEC*-Stämme nur noch sehr geringe oder keine Replikation mehr in Gegenwart von Glukose oder Mannose beobachtet werden. Lediglich die $\Delta ptsG, manXYZ$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 war noch in der Lage, sich in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose langsam zu vermehren und erreichte dabei innerhalb von 13 h eine Dichte von OD₆₀₀ = 0,4 (Abb. 8A, B). Allerdings kam auch dieses Wachstum nach einer Absenkung der Glukosekonzentration auf 2 mM zum Erliegen (Daten nicht gezeigt), woraus sich schließen läßt, daß noch weitere Transportsysteme für Glukose in diesem Stamm existieren, deren Affinität für Glukose aber gering ist. Da die vermutete

Glukosekonzentration in humanen Zellen wahrscheinlich im mikromolaren Bereich liegt, tragen diese Aufnahmesysteme während einer Infektion aber vermutlich nicht zur Versorgung der Bakterien mit Glukose bei. Beide $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutanten replizierten bei Zugabe von Glukose-6-phosphat zum Minimalmedium mit beinahe denselben Generationszeiten wie die entsprechenden *EIEC*-Wildstämme (Daten nicht gezeigt).

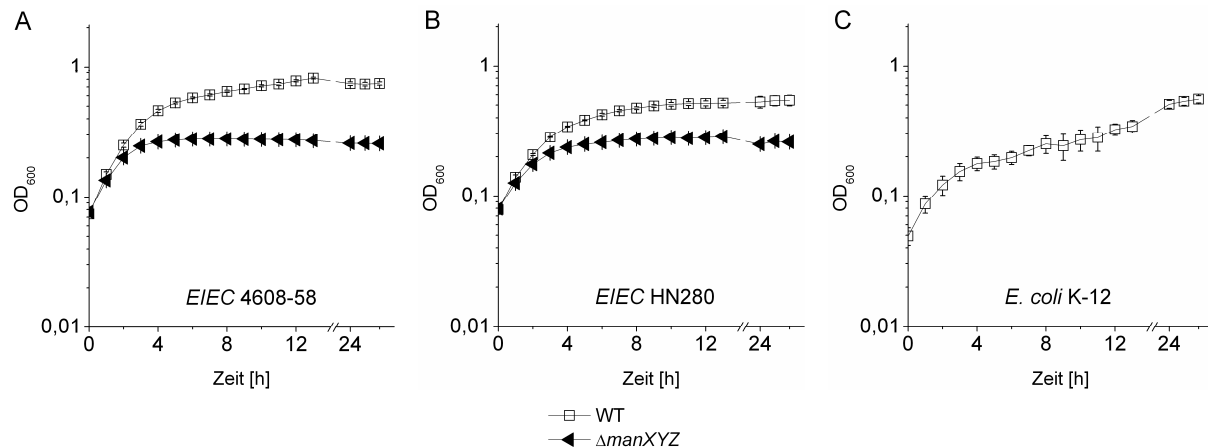


Abb. 9: Wachstum von *EIEC* 4608-58 (A), *EIEC* HN280 (B) und *E. coli* K-12 (C) Wildstämme (WT) und Mannoseaufnahmemutanten ($\Delta manXYZ$) in RPMI 1640 mit 10 mM Mannose. Die im Text angegebenen Generationszeiten wurden während des Wachstums innerhalb der ersten 2 h als Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen errechnet.

4.2.4 Der Phänotyp der *uhpT*-Deletionsmutanten unterscheidet sich zwischen den beiden *EIEC*-Stämmen

Chico-Calero *et al.* (2002) identifizierten im Genom von *Listeria monocytogenes* das Gen für den Hexosephosphattransporter *hpt*, dessen Transkription durch den Virulenzgenregulator PrfA induziert wird (Ripio *et al.*, 1997). Durch Deletion von *hpt* fanden sie weiterhin heraus, daß dieses grampositive Bakterium Glukose-6-phosphat für die intrazelluläre Replikation im Zytoplasma der Wirtszelle aufnimmt. Da das Genom von *E. coli* ebenso wie das von *S. Typhimurium* ebenfalls ein Gen enthält, das für einen Antiporter von Glukose-6-phosphat kodiert (Island *et al.*, 1992), wurde auch dieses deletiert.

Beide *EIEC*-Wildstämme vermehrten sich in RPMI mit 10 mM Glukose-6-phosphat mit Verdopplungszeiten von 48 ± 1 min (*EIEC* 4608-58) und 47 ± 1 min (*EIEC* HN280) ebenso gut wie ein *E. coli* K-12 WT (45 ± 1 min). Die Zelldichten blieben mit OD₆₀₀-Werten von 1,3 (*E. coli* K-12) bis 1,4 (*EIEC*) nur leicht unter denen, die in Glukose-haltigem RPMI erreicht wurden (Abb. 10).

Die $\Delta uhpT$ -Mutanten von *EIEC* HN280 und *E. coli* K-12 waren nicht mehr in der Lage, mit Glukose-6-phosphat zu wachsen, was darauf hindeutet, daß UhpT der einzige Transporter für diesen Zucker in diesen Stämmen ist (Abb. 10B, C). Dagegen konnte die entsprechende

$\Delta uhpT$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 immer noch unter diesen Bedingungen replizieren, wenn auch die Generationszeit mit $81 \pm 0,4$ min signifikant verlängert war. Die dabei erreichte Dichte entsprach nach 13 h mit einer OD_{600} von 1 der des Wildstammes, der zu diesem Zeitpunkt jedoch schon die Absterbephase erreicht hatte (Abb. 10A).

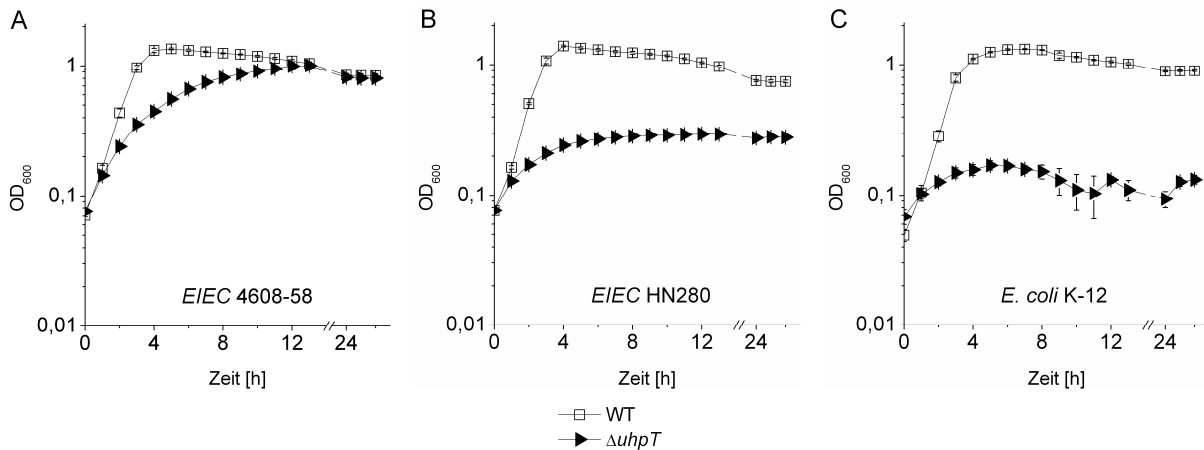


Abb. 10: Wachstum von *EIEC* 4608-58 (A), *EIEC* HN280 (B) und *E. coli* K-12 (C) Wildstämme (WT) und Glukose-6-phosphataufnahmemutanten ($\Delta uhpT$) in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose-6-phosphat. Die im Text angegebenen Generationszeiten wurden während des exponentiellen Wachstums innerhalb der ersten 3 h als Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen errechnet.

Eine Genduplikation von *uhpT* in diesem Stamm konnte durch Southern-Blot Analysen ausgeschlossen werden. Unter Verwendung zweier Sonden, die die Nukleotide 50-622 bzw. 216-1179 der kodierenden *uhpT*-Sequenz darstellten, wurde in *EcoRI* verdauter chromosomaler DNS des Wildstammes jeweils genau eine Hybridisierungsbande detektiert, die bei der $\Delta uhpT$ -Mutante fehlte (Daten nicht gezeigt).

Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigten, daß der zu UhpT homologe Glukose-6-phosphat-Sensor UhpC in Abwesenheit von UhpT ebenfalls dazu in der Lage ist, Glukose-6-phosphat zu transportieren (Schwoppe *et al.*, 2002; 2003). Die Deletion von *uhpC* in *EIEC* 4608-58 WT und $\Delta uhpT$ beeinflusste jedoch nicht das Wachstum dieser Mutanten in Gegenwart von 10 mM Glukose-6-phosphat. GlpT, ein Glyzerin-3-phosphat-Antiporter, und PgtP, ein putatives PEP transportierendes Protein (Welch *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2007), die beide ebenfalls Homologien mit UhpT aufweisen (Eiglmeier *et al.*, 1987; Goldrick *et al.*, 1988), wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Glukose-6-phosphat zu transportieren. Jedoch hatte die Deletion dieser Gene im Wildstamm und in der $\Delta uhpT$ -Mutante keinen Effekt auf die Aufnahme von Glukose-6-phosphat. Auch die Zugabe von Phosphomycin, das vorwiegend über GlpT und in geringerem Maße auch durch UhpT aufgenommen wird (Review Lin, 1970), inhibierte das Wachstum von *EIEC* 4608-58 $\Delta uhpT$, *glpT* nicht (Daten nicht gezeigt).

Dasselbe Ergebnis wurde auch nach der Deletion eines offenen Leserasters mit der Bezeichnung Z0461 aus *E. coli* O157:H7 EDL933 gefunden (Perna *et al.*, 2001), das noch nicht näher charakterisiert wurde, aber im Gegensatz zu *ipgH* (Venkatesan *et al.*, 1996) mittels PCR in *EIEC* 4608-58 nachgewiesen werden konnte. Selbst nach einer Herabsetzung der Konzentration von Glukose-6-phosphat im Medium auf 2 mM war es der $\Delta uhpT$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 immer noch möglich, sich zu vermehren (Daten nicht gezeigt).

Erwartungsgemäß verhielten sich die $\Delta uhpT$ -Mutanten beider *EIEC*-Stämme und von *E. coli* K-12 in Glukose- oder Mannose-haltigem RPMI wie die zugehörigen Wildstämme (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 Wachstum von *EIEC*-Mutanten mit Deletionen in den wichtigsten Aufnahmesystemen für Glukose und Glukose-6-phosphat im Minimalmedium

Die Deletion von *ptsG*, *manXYZ* und *uhpT* verhinderte das Wachstum von *EIEC* HN280 auf 10 mM Glukose, Mannose oder Glukose-6-phosphat vollständig (Abb. 11 unten).

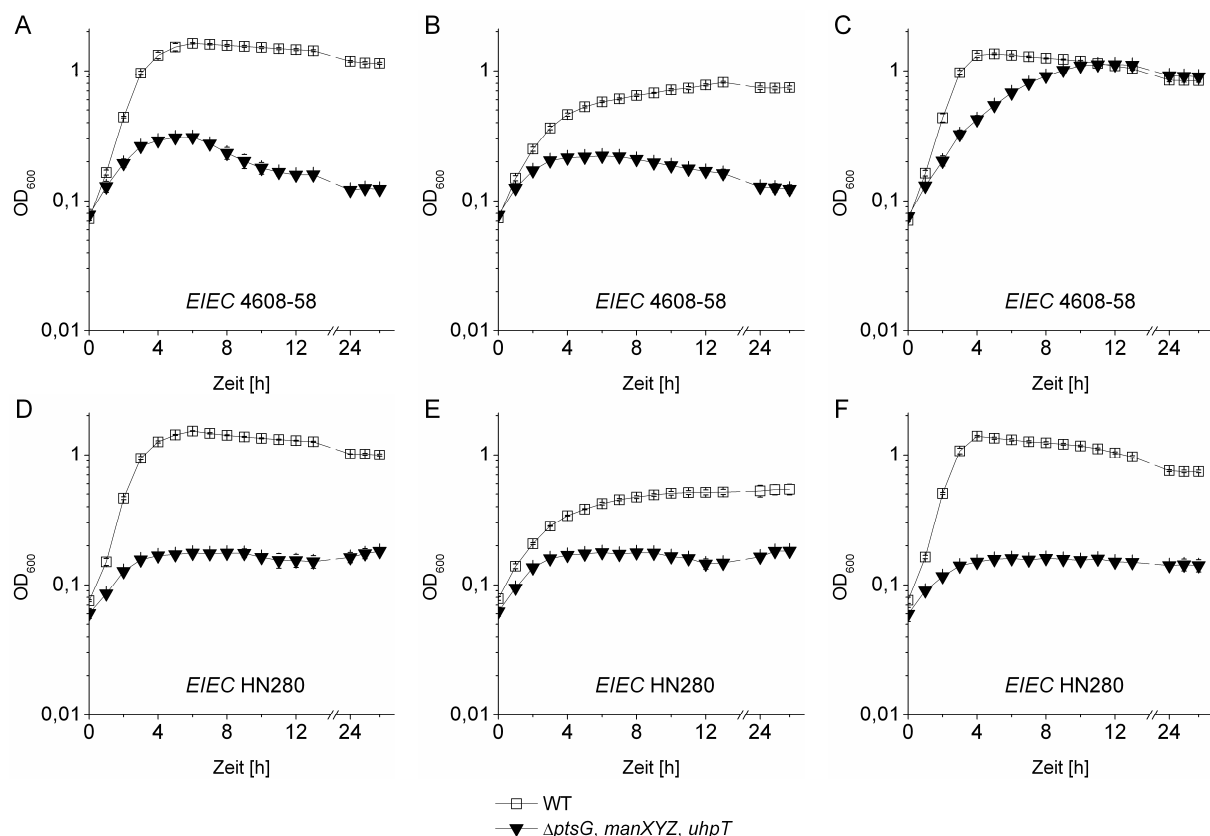


Abb. 11: Wachstum von *EIEC* 4608-58 (oben) und *EIEC* HN280 (unten) Wildstämme (WT) und Glc/Glc6P-Aufnahmemutanten ($\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$, $\Delta uhpT$) in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose (links), Mannose (Mitte) oder Glukose-6-phosphat (rechts).

Die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 replizierte in RPMI mit 10 mM Glukose oder Mannose ebenfalls langsamer, erreichte dabei aber infolge einer partiellen Autolyse nicht dieselbe Zelldichte wie die $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante (Abb. 11A, B). Die Autolyse trat auch bei Kultivierung der Mutante im Vollmedium Tryptic Soy Broth nach 24 h auf (Daten nicht gezeigt), konnte aber im Minimalmedium durch Zugabe von 10 % FCS verhindert werden (Abb. 12).

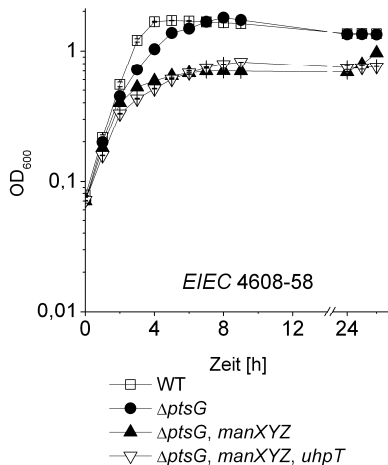


Abb. 12: Wachstum von *EIEC* 4608-58 WT sowie Glc- und Glc/Glc6P-Aufnahmemutanten in Gegenwart von 10 % FCS. Durch Zugabe von 10 % FCS zum Kulturmedium RPMI 1640 mit 10 mM Glukose konnte die Autolyse von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ verhindert werden.

In Gegenwart von 2 oder 10 mM Glukose-6-phosphat vermehrte sich die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 hingegen mit derselben Generationszeit wie die $\Delta uhpT$ -Mutante (Abb. 11C). Dies schließt die Existenz extrazellulärer Phosphatasen aus, die durch Hydrolyse von Glukose-6-phosphat Glukose für das Wachstum zur Verfügung stellen könnten.

Die Deletion von $ptsG$, $manXYZ$ und $uhpT$ hatte bei beiden *EIEC*-Stämmen nahezu keinen Einfluß auf das Wachstum mit 10 mM Glukonat oder Fruktose (Daten nicht gezeigt).

4.2.6 *trans*-Komplementierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$

Um die Wachstumsdefekte von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ zu komplementieren und um polare Effekte auszuschließen, die bei der Deletion dieser drei Gene hätten entstehen können, wurden drei Plasmide konstruiert, die jeweils für eines der deletierten Gene unter der Kontrolle seines eigenen Promotors kodierten (Anhang 2-4).

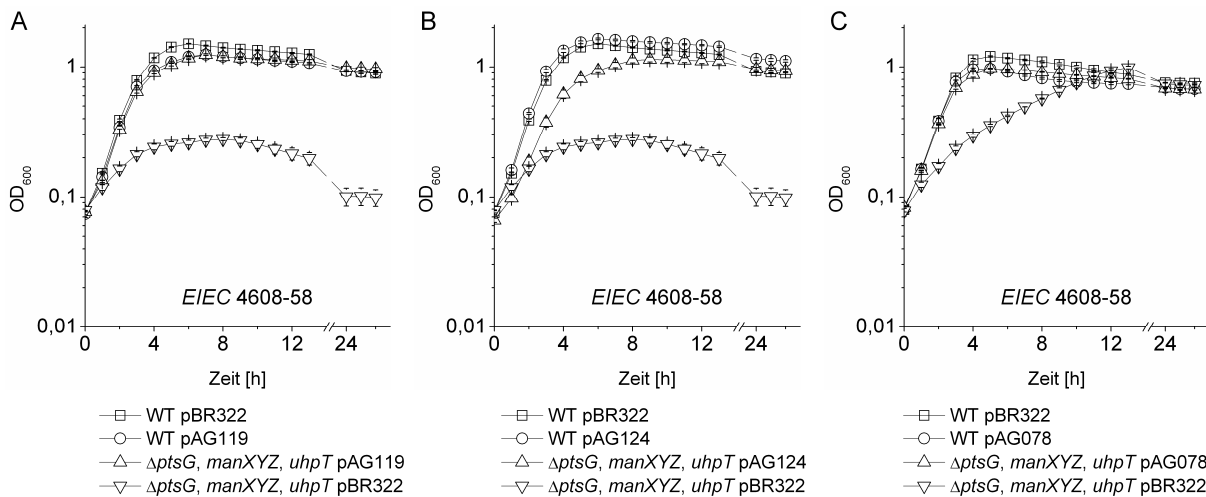


Abb. 13: Komplementierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$. Die Glc/Glc6P-Aufnahmemutante von *EIEC* 4608-58 wurde mit den Plasmiden pAG119 kodierend für P_{ptsG} -*ptsG* (A), pAG124 kodierend für P_{manXYZ} -*manXYZ* (B) und pAG078 kodierend für P_{uhpT} -*uhpT* (C) *trans*-komplementiert. Die *trans*-komplementierten Stämme wurden in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose (A, B) oder Glukose-6-phosphat (C) kultiviert. Als Kontrollen eingesetzt wurden der WT und die Mutante transformiert mit dem Vektor pBR322 sowie der WT transformiert mit dem jeweiligen Expressionsplasmid.

Bei Kultivierung in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose replizierte die Mutante annähernd mit derselben Generationszeit und erreichte die gleiche Zelldichte wie der Wildstamm, wenn sie mit pAG119 komplementiert wurde (Abb. 13A). Bei Transformation mit pAG124 vermehrte sie sich bei Zugabe von Mannose wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt) und auf gleichem Niveau wie die *ptsG*-Mutante, wenn Glukose als einziges Kohlenhydrat zur Verfügung stand (Abb. 13B). Ebenso konnte das wildtypische Wachstum in Glukose-6-phosphat-haltigem Medium durch Einführung des Plasmids pAG078 wiederhergestellt werden (Abb. 13C).

Bei Kultivierung im Vollmedium verhinderten alle 3 Plasmide ebenfalls die Autolyse der komplementierten Stämme nach einer Wachstumszeit von 24 h (Daten nicht gezeigt).

4.2.7 Wachstumseigenschaften der *ptsG*-, *manXYZ*- und/oder *glk*- oder *uhpT*-Mutanten von *S. Typhimurium* 14028s

Ähnliche Mutationen, wie für die beiden *EIEC*-Stämme beschrieben, wurden auch in *S. Typhimurium* 14028s WT und $\Delta sifA$ eingeführt. Da die Deletion von *sifA* unter extrazellulären Bedingungen keinen Einfluß auf die Aufnahme und Verwertung von Kohlenhydraten durch *S. Typhimurium* 14028s während des Wachstums in M9-Minimalmedium mit 1 % (w/v) Glukose oder Glukose-6-phosphat bzw. RPMI mit 10 mM Glukonat (Daten nicht gezeigt) oder Glukose (Anhang 10) hatte, wird in der folgenden Beschreibung nicht weiter auf die *sifA*-Stämme eingegangen.

Im Minimalmedium mit 10 mM Glukose replizierte *Stm* 14028s Wildtyp mit einer Generationszeit von 38 ± 1 min bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 1,5$. Die Deletion von *ptsG* verlangsamte die Verdopplungszeit geringfügig auf 53 ± 1 min. Die Mutante zeigte aber im Gegensatz zu *E. coli* keine Verringerung bei der maximal erreichten Zelldichte (Abb. 14A). Das Wachstum von *Stm* 14028 $\Delta ptsG$ in Mannose- oder Glukose-6-phosphat-haltigem Medium blieb im Vergleich zum Wildstamm ebenfalls unverändert (Daten nicht gezeigt).

Die zusätzliche Deletion von *manXYZ* in der *ptsG*-Mutante hatte ein stark verlangsamtes Wachstum in RPMI mit 10 mM Mannose zur Folge (wie in Abb. 14B für die $\Delta manXYZ$ -Mutante gezeigt). Mit Glukose als Substrat wurde die Generationszeit auf 63 ± 1 min ebenfalls weiter verlängert. Die erreichte Zelldichte in der stationären Phase verringerte sich jedoch im Vergleich zum Wildtyp nicht (Abb. 14A), auch nicht nach einer Verringerung der Glukosekonzentration auf 2 mM (Daten nicht gezeigt). Erst die Deletion der Glukokinase *glk*, welche über nicht PTS Proteine aufgenommene Glukose phosphoryliert (Meyer *et al.*, 1997), verhinderte bei *Stm* 14028s $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *glk* das Wachstum auf Glukose nahezu vollständig (Abb. 14A), wohingegen das Fehlen von *glk* alleine keine Auswirkungen hatte (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von Glukose-6-phosphat verhielt sich die $\Delta ptsG$, *manXYZ*-Doppelmutante hingegen annähernd wie der Wildstamm (Daten nicht gezeigt).

Bei Verwendung von Glukose-6-phosphat für die Kultivierung wuchs der Wildstamm von *Stm* 14028s mit einer Verdopplungszeit von 41 ± 2 min bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,4$. Die Deletion von *uhpT* führte wie erwartet zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums in diesem Medium (Abb. 14C), nicht aber bei Zugabe von Glukose oder Mannose (Daten nicht gezeigt).

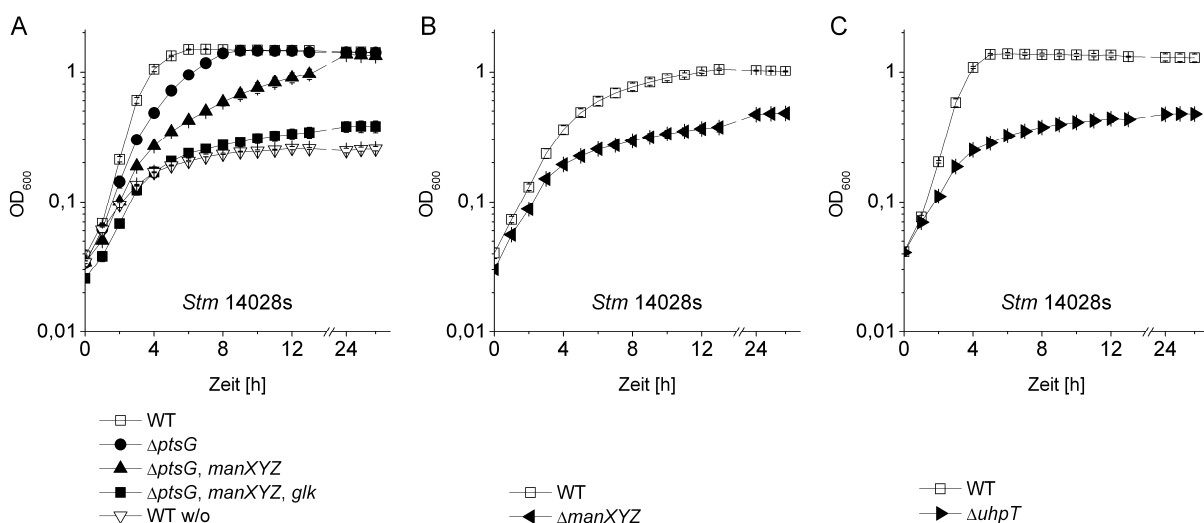


Abb. 14: Wachstum von *S. Typhimurium* 14028s WT und Kohlenhydrat-Aufnahmemutanten in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose (A), Mannose (B) oder Glukose-6-phosphat (C). Die im Text angegebenen Generationszeiten wurden zwischen der ersten und dritten Stunde des Wachstums ermittelt und stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen dar.

Das Wachstumsverhalten von *Stm* 14028s $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ in Glukose-haltigem Medium ähnelte dem der $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante (Abb. 15A). Auch bei einer Herabsetzung der Glukosekonzentration auf 2 mM konnte die Mutante immer noch replizieren (Daten nicht gezeigt). Mit Mannose oder Glukose-6-phosphat hingegen war das Wachstum stark reduziert (Abb. 15B, C), mit Glukonat als Substrat aber ähnlich wie beim Wildstamm (Daten nicht gezeigt).

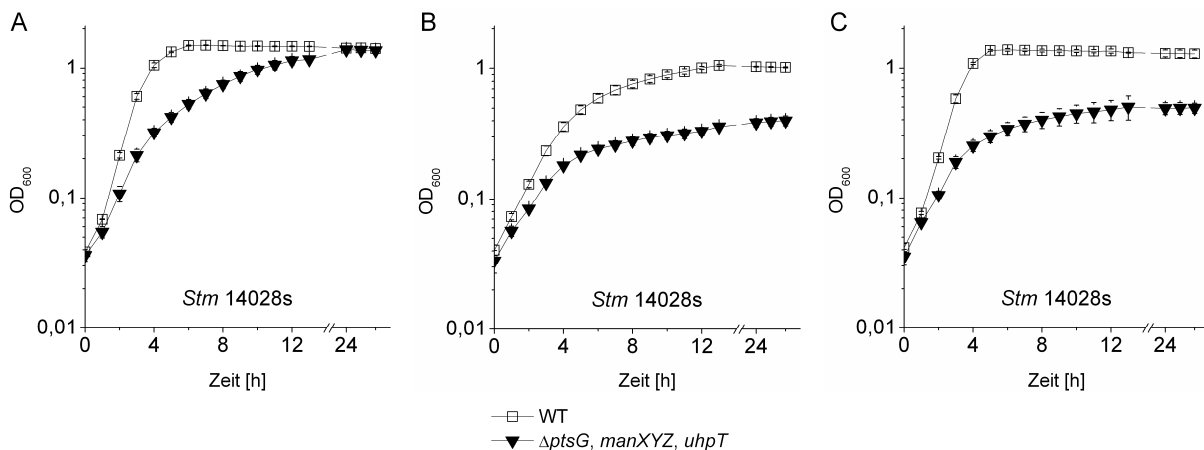


Abb. 15: Wachstum von *Stm* 14028s $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ in RPMI 1640 mit 10 mM Glukose (A), Mannose (B) oder Glukose-6-phosphat (C).

4.2.8 Wachstum der beiden *EIEC*-Stämme und *S. Typhimurium* 14028s auf C₃-Substraten

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen legten nahe, daß *Listeria monocytogenes* während seines intrazellulären Infektionszyklus nicht ausschließlich Glukose-6-phosphat verwertet, sondern Glyzerin und möglicherweise andere C₃-Substrate bevorzugt (Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2008). Allerdings inhibiert in *E. coli* das durch die Aufnahme von Glukose dephosphorylierte EIIA^{Glc} den Abbau von einigen nicht PTS Substraten (z. B. Glyzerin), indem es an Transporter oder Schlüsselenzyme (z. B. Glyzerinkinase) bindet und diese damit inaktiviert (Review Lengeler and Jahreis, 2009). Dennoch wurde die Fähigkeit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und hergestellten Mutanten untersucht, mit Glyzerin, Laktat, Pyruvat und PEP zu wachsen.

Alle Wildstämme sowie ihre $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten konnten in RPMI 1640 mit 10 mM Glyzerin, Laktat oder Pyruvat wachsen. Die Generationszeiten variierten dabei zwischen 60 min für *Stm* 14028s, 70 min für *EIEC* 4608-58 und 80 min für *EIEC* HN280 mit nur geringen Abweichungen bei den Glc/Glc6P-Aufnahmemutanten, wie in Abb. 16 für *EIEC* 4608-58 dargestellt. Die höchste Zelldichte wurde dabei stets bei Wachstum auf

Glycerin erreicht, gefolgt von Laktat und Pyruvat. Interessanterweise zeigte *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ in Gegenwart dieser C₃-Substrate oder anderer Zucker als Glukose oder Mannose keine Autolyse mehr.

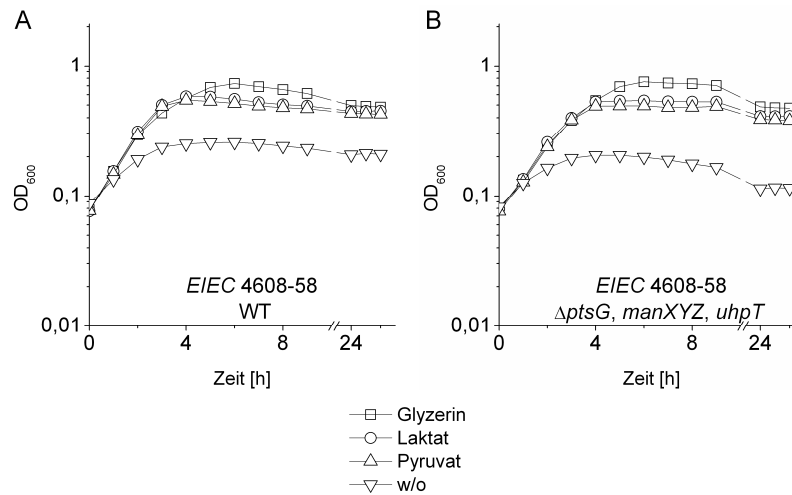


Abb. 16: Wachstum von *EIEC* 4608-58 WT (A) und Glc/Glc6P-Aufnahmemutante (B) in RPMI 1640 auf unterschiedlichen C₃-Substraten bei einer Konzentration von 10 mM. Ähnliche Ergebnisse, wie hier für *EIEC* 4608-58 gezeigt, wurden auch für die Wildstämme und Mutanten von *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s gefunden. Ohne Zugabe eines C₃-Substrates (w/o) zeigte *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ eine stärkere Autolyse als der Wildstamm.

Unerwartet replizierte zumindest auch *EIEC* HN280 WT in Gegenwart von 20 mM PEP (Abb. 17). Bislang ist nur für *S. Typhimurium*, aber nicht für *E. coli* bekannt, daß extrazelluläres PEP aufgenommen werden kann (Yu and Hong, 1986). Wie bereits erwähnt, wurde vor kurzem im Genom zweier pathogener *E. coli*-Stämme ein zum *pgt*-Operon von *Salmonella* homologes System annotiert (Welch *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2007). Durch site-spezifische Mutagenese des wildtypischen UhpT aus *E. coli* konnten Hall *et al.* (1999) zwar dessen Substratspezifität für Glukose-6-phosphat hin zu PEP verändern, eine funktionelle Charakterisierung des natürlich vorkommenden Transportsystems steht jedoch noch aus.

Stm 14028s replizierte in RPMI mit 20 mM PEP, einer Konzentration, die bezogen auf den eingesetzten Kohlenstoff äquimolar zu 10 mM Glukose ist, mit einer Generationszeit von etwa 36 ± 1 min und erreichte dabei eine Zelldichte von $OD_{600} = 1,3$ innerhalb von 8 h (Abb. 17).

In beiden *EIEC*-Stämmen wurde mittels PCR und Sequenzierung ein zum PgtP von *S. Typhimurium* LT2 homologes Protein identifiziert (Anhang 8 und 9). Die Aminosäuresequenz des putativen PgtP von *EIEC* 4608-58 war zu 87,7 % identisch und zu 93,1 % ähnlich mit der von PgtP aus *Stm* LT2. Dennoch wuchs dieser Stamm nur mit einer Verdopplungszeit von 62 ± 2 min für zwei Stunden und anschließend deutlich langsamer

unter diesen Bedingungen. Die Zelldichte erreichte aber nach 24 h einen ähnlichen Wert wie bei *Stm* 14028s (Abb. 17).

Obwohl die Gensequenz von *pgtP* aus *EIEC* HN280 an der Aminosäureposition 50 des offenen Leserasters ein Stoppcodon enthielt, war die Generationszeit von *EIEC* HN280 (putatives PgtP zu 87,5% identisch und 92,9% ähnlich mit *Stm* LT2) mit 54 ± 2 min sehr viel kürzer im Vergleich zu *EIEC* 4608-58. Die erreichte Zelldichte war nach 8 h Wachstum mit einer $OD_{600} = 1,2$ nahezu identisch zu der von *Stm* 14028s (Abb. 17).

Die Deletion von *uhpT* hatte bei allen Stämmen keinen Einfluß auf das Wachstum mit 20 mM PEP (Daten nicht gezeigt).

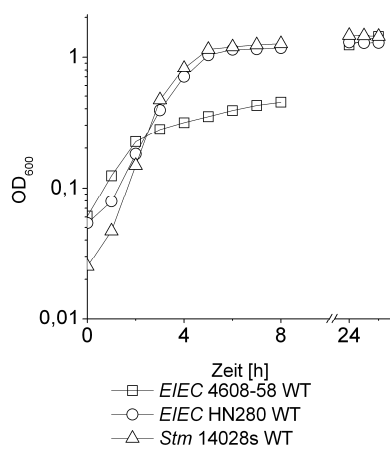


Abb. 17: Replikation von *EIEC* 4608-58 WT, *EIEC* HN280 WT und *Stm* 14028s WT in RPMI 1640 mit 20 mM PEP. Dasselbe Wachstumsverhalten, wie hier für die Wildstämme dargestellt, wurde auch für die jeweiligen $\Delta uhpT$ -Mutanten gefunden. Die im Text angegebenen Generationszeiten wurden von 0-2 h (für *EIEC* 4608-58) bzw. von 1-3 h (für *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s) berechnet.

4.3 Infektion von Caco-2-Zellen mit *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s sowie deren Kohlenhydrataufnahmemutanten

4.3.1 Die Deletion von *ptsG* erhöht die Adhärenz von *EIEC* 4608-58 an Wirtszellen

Der Phosphorylierungsgrad von $EIIA^{Glc}$ reguliert maßgeblich die Aktivität der Adenylatzyklase und damit den Status der Katabolitrepression in *E. coli* und *Salmonella* (Harwood *et al.*, 1976; Bettenbrock *et al.*, 2007). Zusätzlich wird die Katabolitrepression durch die Aufnahme von nicht PTS Zuckern (z. B. Glc6P) moduliert (Dumay *et al.*, 1996; Hogema *et al.*, 1997) und kann ihrerseits wieder direkt oder indirekt (z. B. über den Regulator Mlc) die Expression von Virulenzgenen beeinflussen (Poncet *et al.*, 2009).

Daher wurden zunächst die Auswirkungen der Mutationen in *ptsG*, *manXYZ* und/oder *uhpT* auf die Katabolitrepression, Adhärenz und Internalisierung der Bakterien an Hand von Caco-2-Zellen untersucht. Bei *EIEC* 4608-58 stieg durch die Deletion von *ptsG* die Aktivität der β -Galaktosidase, die als Maß für die Lockerung der Katabolitrepression betrachtet werden kann, um das 14fache an und nahm tendenziell in den Doppelmutanten $\Delta ptsG$, *uhpT* und $\Delta ptsG$, *manXYZ* weiter zu. Gleichzeitig erhöhte sich bei *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$ auch die Adhärenz signifikant um den Faktor 3,5. Ähnliche Anstiege verzeichneten auch die $\Delta ptsG$, *uhpT*- und $\Delta ptsG$, *manXYZ*-Doppelmutanten. Die Deletion von *uhpT* oder *manXYZ* alleine hatte dagegen keine Auswirkungen auf Katabolitrepression oder Adhärenz (Abb. 18).

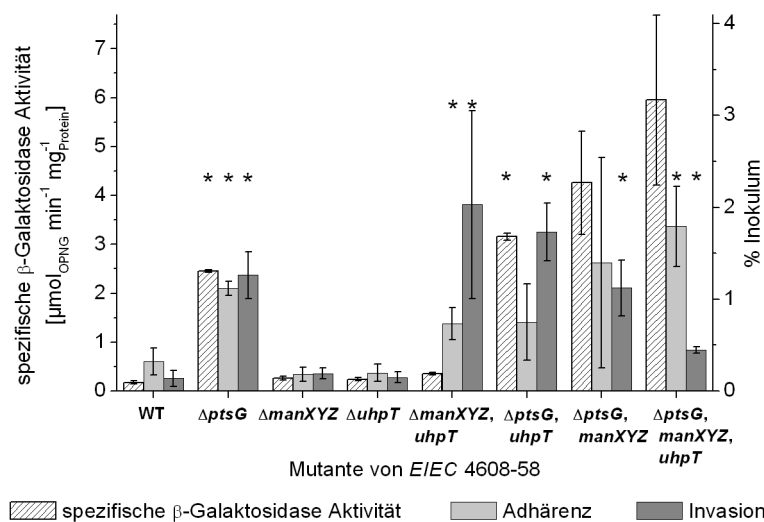


Abb. 18: Adhärenz und Internalisierung von *EIEC* 4608-58 WT und Mutanten bei Caco-2-Zellen. Auf der rechten Ordinatenachse ist die Zahl der adhären (t = 0 h p. i.) oder aufgenommenen (t = 1 h p. i.) Bakterien als Prozentsatz der eingesetzten Bakterienmenge aufgetragen (100% $\approx 3 \cdot 10^6$ lebende Bakterien). Zusätzlich wurde die Aktivität der β -Galaktosidase nach einer 2 stündigen Induktion mit Laktose gemessen (linke Ordinatenachse), um den Status der Katabolitrepression bei WT und Mutanten zu erfassen. Stern *: $P < 0,05$.

Entsprechend drangen bei den beiden letztgenannten Einfachmutanten ähnlich viele Bakterien in Caco-2-Zellen ein wie wildtypische Keime, wohingegen es bei den drei *ptsG*-Mutanten 8-12 mal so viele waren (Abb. 18). Dies konnte auch bei murinen 4T1-Brustkrebszellen beobachtet werden, jedoch auf niedrigerem Niveau (Daten nicht gezeigt).

Die gleichzeitige Deletion von *manXYZ* und *uhpT* hatte keinen signifikanten Einfluß auf die β -Galaktosidaseaktivität, jedoch war der Anstieg der Adhärenz bei *EIEC* 4608-58 Δ *manXYZ*, *uhpT* um den Faktor 2 ebenso signifikant wie die Zunahme der intrazellulären Bakterien zum Zeitpunkt 1 h p. i. um das 15fache (Abb. 18).

Eine weitere Erniedrigung der Katabolitrepression konnte bei *EIEC* 4608-58 Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT* beobachtet werden. Entsprechend stieg auch die Menge der adhärennten Bakterien bei dieser Mutante um das 6fache gegenüber dem Wildtyp an. Die Anzahl der aufgenommenen Bakterien ging jedoch im Gegensatz zur erhöhten Adhärenz unerwartet zurück, lag aber immer noch etwa 3 mal höher als beim WT (Abb. 18).

EIEC HN280 ist als Laktose-negativ beschrieben (Nicoletti, M. *et al.*, 1988). Entsprechend konnte keine funktionelle β -Galaktosidase in diesem Stamm gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Der Wildstamm war etwa 5 mal adhärenter und invasiver als *EIEC* 4608-58 WT. Die *ptsG*-Mutante zeigte aber im Gegensatz zu *EIEC* 4608-58 keine erhöhte Adhärenz und Internalisierung bei Caco-2-Zellen ebenso wie die meisten anderen Mutanten. Bei der Δ *ptsG*, *manXYZ*- und der Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante wurde jedoch ein starker Rückgang bei diesen Werten beobachtet (Tabelle 1).

	<i>EIEC</i> HN280		<i>Stm</i> 14028s	
	Adhärenz +Glc +FCS	Adhärenz -Glc -FCS	Internalisierung	Internalisierung
WT	1,63 \pm 1,22 %	2,51 \pm 0,65 %	1,37 \pm 0,58 %	1,93 \pm 0,74 %
Δ <i>ptsG</i>	2,72 \pm 1,62 %	2,23 \pm 1,12 %	1,19 \pm 0,59 %	1,73 \pm 0,74 %
Δ <i>manXYZ</i>	2,21 \pm 1,39 %	2,63 \pm 0,48 %	1,36 \pm 0,72 %	nicht bestimmt
Δ <i>uhpT</i>	1,76 \pm 1,04 %	2,64 \pm 0,62 %	1,19 \pm 0,64 %	2,09 \pm 1,21 %
Δ <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i>	2,51 \pm 1,49 %	2,68 \pm 0,42 %	0,98 \pm 0,19 %	nicht bestimmt
Δ <i>ptsG</i> , <i>uhpT</i>	2,79 \pm 1,08 %	2,65 \pm 1,13 %	1,22 \pm 0,34 %	1,82 \pm 0,91 %
Δ <i>ptsG</i> , <i>manXYZ</i>	0,16 \pm 0,02 %	0,13 \pm 0,03 % *	0,22 \pm 0,07 % *	nicht bestimmt
Δ <i>ptsG</i> , <i>manXYZ</i> , <i>uhpT</i>	0,19 \pm 0,11 %	0,63 \pm 0,10 % *	0,07 \pm 0,02 % *	1,80 \pm 0,86 %

Tabelle 1: Adhärenz und Internalisierung von *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s sowie deren Mutanten bei Caco-2-Zellen. Die Werte der adhärennten oder internalisierten Bakterien sind als Prozentsatz der für die Infektion eingesetzten Bakterienmenge angegeben ($100\% \approx 3 \cdot 10^6$ lebende Bakterien). Stern *: $P < 0,05$.

Um auszuschließen, daß die stark eingeschränkte Replikationsfähigkeit in Glukose-haltigem RPMI während der einstündigen Infektionszeit für die Unterschiede zum Wildstamm verantwortlich ist, wurde der Versuch zusätzlich in Glukose- und FCS-freiem Medium durchgeführt. Obwohl das Wachstumsverhalten innerhalb der ersten Stunde von *EIEC* HN280 WT und Mutanten unter diesen Bedingungen annähernd gleich war (Daten nicht gezeigt), veränderten sich die Relationen bei Adhärenz und Internalisierung kaum (Tabelle 1).

Bei *Stm* 14028s wurde kein signifikanter Unterschied für Adhärenz und Internalisierung zwischen Wildstamm und Kohlenhydrataufnahmemutanten gefunden (Tabelle 1). Dieselben Ergebnisse wurden auch für die *Stm* 14028s Δ *sifA*-Stämme gefunden (Daten nicht gezeigt).

Alle Wildstämme und Mutanten reagierten sensitiv auf 5 µg Gentamicin/ml, wodurch eine schlechtere Abtötung der Mutanten in Folge langsameren Wachstums ausgeschlossen werden konnte.

4.3.2 Die Replikation der Glukose- und Glukose/Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten in Caco-2-Zellen ist nur geringfügig verlangsamt

Studien an BALB/c-Mäusen zeigten, daß *S. Typhimurium* SR-11 für eine erfolgreiche systemische Infektion weder Glukoneogenese noch den Glyoxylatzyklus benötigt. Die entsprechenden Δ *fpb*, *glpX*- (beide kodieren für eine Fruktose-1,6-bisphosphatase) und Δ *aceA*- (Isocitratlyase) Mutanten behielten bei oraler Verabreichung ihre volle Virulenz. Eine Δ *ppsA*, *pckA*- (Phosphoenolpyruvatsynthase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) Mutante, die kein PEP aus Pyruvat und Oxalacetat synthetisieren kann, war leicht attenuiert. Insgesamt deuteten die Befunde darauf hin, daß möglicherweise Kohlenhydrate eine Rolle bei der Kolonisierung von Mäusen spielen (Tchawa Yimga *et al.*, 2006).

Um die intrazelluläre Replikation der Mutanten mit dem entsprechenden Wildstamm vergleichen zu können, wurde die Zahl der für die Infektion eingesetzten Bakterien entsprechend der Effizienz ihrer Internalisierung durch Caco-2-Zellen angepaßt. Dadurch wurde 1 h p. i. zu Beginn der intrazellulären Replikationsphase die Anzahl der intrazellulären Bakterien bei den Mutanten mit höherer Invasionseffizienz reduziert. Dies sollte verhindern, daß die Menge der vorhandenen Wirtszellen das intrazelluläre Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildstamm vorzeitig begrenzen konnte. Zur Internalisierung wurden Bakterien aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase in RPMI mit oder ohne 10 % FCS resuspendiert. Die intrazelluläre Replikation wurde über einen Zeitraum von 8 h p. i. verfolgt. Wurde die Internalisierung der Bakterien in Gegenwart von 10 % FCS durchgeführt, replizierte *EIEC* 4608-58 WT ebenso wie die entsprechenden Δ *manXYZ*- und Δ *uhpT*-

Mutanten im Anschluß daran mit einer mittleren Generationszeit von 47 ± 8 min im Zeitraum von 1-6 h p. i., wie in Abb. 19A für den WT gezeigt. Das Wachstum der $\Delta ptsG$ -Mutante erfolgte im Zeitraum von 1-3 h p. i. mit derselben Verdopplungszeit von 33 ± 4 min wie beim Wildstamm (35 ± 4 min). In den folgenden 3 h verlangsamte es sich aber bei der Mutante signifikant stärker als beim Wildtyp (77 ± 12 min gegen 53 ± 6 min; $P < 0,05$) (Abb. 19A). Die zusätzliche Deletion von *manXYZ* oder *uhpT* hatte bei den daraus resultierenden $\Delta ptsG$, *manXYZ*- sowie $\Delta ptsG$, *uhpT*-Mutanten aber keinen weiteren Effekt (Daten nicht gezeigt).

EIEC 4608-58 $\Delta manXYZ$, *uhpT* zeigte in Caco-2-Zellen überraschenderweise denselben Phänotyp bei der intrazellulären Replikation wie die *ptsG*-Mutante, wohingegen die mittlere Generationszeit der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante mit 215 ± 36 min ($P < 0,05$) extrem verlängert war (Abb. 19A).

Wurde die Internalisierung der Bakterien jedoch in FCS-freiem RPMI durchgeführt, näherten sich die Verdopplungszeiten der meisten Mutanten der des Wildstammes an. Auch die $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante replizierte von 1-6 h p. i. mit 72 ± 7 min ($P < 0,05$) merklich besser (Abb. 19B). Auffällig war ebenfalls, daß die Effizienz der Internalisierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta manXYZ$, *uhpT* unter diesen Bedingungen nochmals deutlich anstieg.

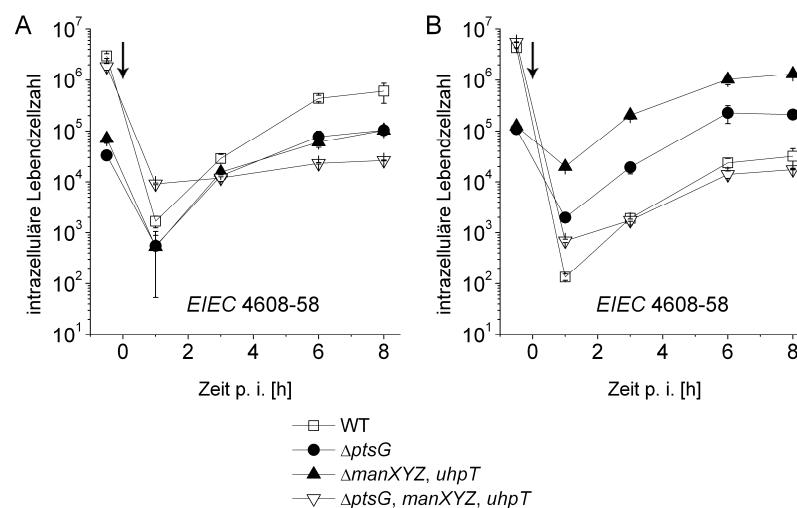


Abb. 19: Intrazelluläre Replikation von *EIEC* 4608-58 WT und Kohlenhydrataufnahmemutanten in Caco-2-Zellen. Die Internalisierung der Bakterien wurde in Gegenwart (A) oder Abwesenheit (B) von 10% FCS mit unterschiedlichen Bakterienmengen durchgeführt, um 1 h p. i. die Anzahl der intrazellulären Bakterien bei höher invasiven Mutanten zu reduzieren. Der Zeitpunkt 0 h p. i. (Pfeil) markiert die Zugabe von Gentamicin. Jedes Experiment wurde 3 mal mit je 3 Replikas durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch.

Eine deutlich erhöhte Aufnahme der Bakterien in Gegenwart von 10% FCS konnte auch bei Komplementierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT* mit pAG119 ($P1_{ptsG-ptsG}$) beobachtet werden. Dadurch wurde ebenfalls die intrazelluläre Replikationsfähigkeit der Mutante unter diesen Bedingungen teilweise wiederhergestellt ebenso wie bei

Komplementierung mit pAG124 ($P_{manXYZ-manXYZ}$). In beiden Fällen hatte sich die Anzahl der intrazellulären Bakterien nach 6 h verzehnfacht. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten sich die korrespondierenden Doppelmutanten etwa um den Faktor 25 und der Wildstamm um das 46fache vermehrt. Lediglich die Komplementierung mit pAG078 ($P_{uhpT-uhpT}$) war nicht erfolgreich. Wurde der Hexosephosphattransporter jedoch mit Hilfe des listeriellen *sod*-Promotors überexprimiert (pAG123; Anhang 5), konnte auch hier mit einer Verfünffachung der Bakterienzahl nach 6 h eine Verbesserung der intrazellulären Replikation erzielt werden. Die entsprechende Doppelmutante und der WT vermehrten sich um den Faktor 8 bzw. 31. Kontrollen der Dreifachmutanten, die mit pBR322 oder pMW- P_{sod} transformiert wurden, verdoppelten sich lediglich in dem genannten Zeitraum und zeigten damit dasselbe Verhalten wie der Stamm ohne zusätzliches Plasmid (Daten nicht gezeigt).

EIEC HN280 WT replizierte in Caco-2-Zellen im Zeitraum von 1-6 h p. i. mit einer mittleren Generationszeit von 55 ± 3 min ebenso die meisten aus diesem Stamm hergestellten Mutanten. Nur die intrazellulären Verdopplungszeiten der $\Delta ptsG$, *manXYZ*- und der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante verlängerten sich auf etwa 70 ± 9 min (Abb. 20A). Bei Abwesenheit von FCS während der Infektionsphase verkürzte sich die Replikationszeit der Glc/Glc6P-Mutante aber nur minimal (Abb. 20B).

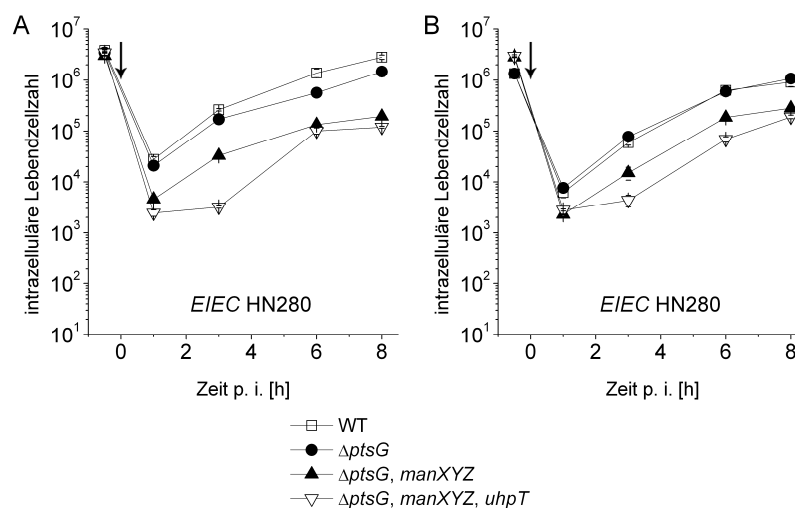


Abb. 20: Intrazelluläre Replikation von *EIEC* HN280 WT und Kohlenhydrataufnahmemutanten in Caco-2-Zellen. Die Internalisierung der Bakterien wurde in Gegenwart (A) oder Abwesenheit (B) von 10 % FCS durchgeführt. Der Zeitpunkt 0 h p. i. (Pfeil) markiert die Zugabe von Gentamicin. Jedes Experiment wurde 3 mal mit je 3 Replikas durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch.

Sowohl *EIEC* 4608-58 als auch *EIEC* HN280 erreichten 8 h p. i. die stationäre Phase, ohne daß Anzeichen von Apoptose zu erkennen waren. Bis 24 h p. i. stieg die Zahl der intrazellulären Bakterien bei beiden Stämmen nur noch leicht an (Daten nicht gezeigt).

Auch bei *Stm* 14028s replizierten die $\Delta manXYZ$ -, Δglk - und die $\Delta uhpT$ -Mutante ebenso gut in Caco-2-Zellen wie der Wildstamm (wie in Abb. 21B für Δglk gezeigt). Dagegen vermehrten sich die $\Delta ptsG$ -, $\Delta ptsG$, $manXYZ$ - und $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten etwas langsamer (Abb. 21A). Erstaunlicherweise war die festgestellte Generationszeit von *Stm* 14028s $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk in Caco-2-Zellen identisch mit der der $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante (Abb. 21B), obwohl eine ähnliche $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk -Mutante von *S. Typhimurium* 4/74 in Raw 264.7-Makrophagen eine sehr viel größere Wachstumsbeeinträchtigung zeigt (Bowden *et al.*, 2009). Wie erwartet waren die Generationszeiten von *S. Typhimurium* 14028s für die Replikation in der SCV mit Werten zwischen 150 und 170 min deutlich länger als solche, die für die beiden *EIEC*-Wildstämme und die meisten ihrer Mutanten festgestellt wurden. Bei den *sifA*-Mutanten von *Stm* 14028s wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. Auch hier war das Wachstum der im Zytoplasma der Wirtszellen replizierenden Glukose und/oder Glukose-6-phosphataufnahmemutanten nur geringfügig bis gar nicht im Vergleich zum $\Delta sifA$ -Stamm verlangsamt (Daten nicht gezeigt).

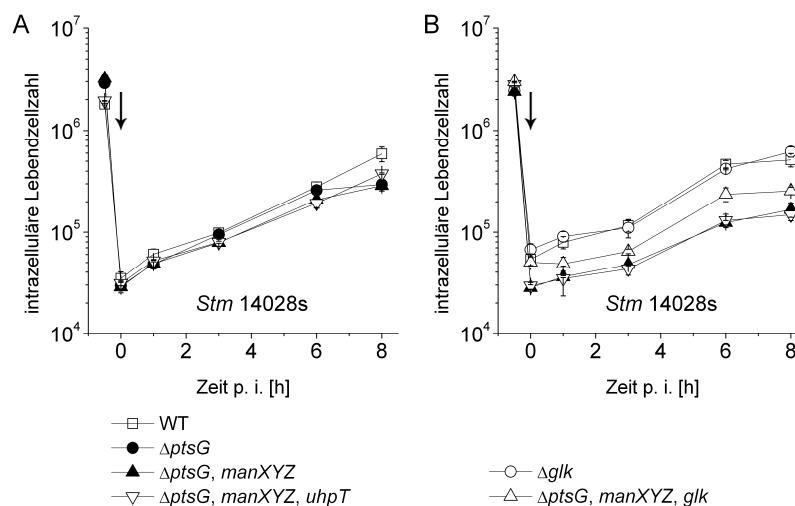


Abb. 21: Intrazelluläre Replikation von *Stm* 14028s WT (A, B) sowie von diesem abgeleitete Kohlenhydrataufnahmemutanten in Caco-2-Zellen. Die Internalisierung der Bakterien wurde stets in Gegenwart von 10 % FCS durchgeführt. Der Zeitpunkt 0 h p. i. (Pfeil) markiert die Zugabe von Gentamicin. Jedes Experiment wurde 3 mal mit je 3 Replikas durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentativer Versuch.

Stm 14028s WT und $\Delta sifA$ befanden sich 8 h p. i. zwar noch nicht in der stationären Phase, replizierten aber bis 24 h p. i. langsamer (Daten nicht gezeigt). Anzeichen von Apoptose waren auch 24 h p. i. nicht erkennbar.

Das Wachstumsverhalten der untersuchten Mutanten von *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *S. Typhimurium* 14028s in Caco-2-Zellen läßt vermuten, daß sowohl die beiden *EIEC*-Stämme als auch *Stm* 14028s zu einem gewissen Teil Glukose und/oder Glukose-6-phosphat

während der intrazellulären Replikation aufnehmen, diese aber nicht als ausschließliche Kohlenstoff- und/oder Energiequellen in dieser Zelllinie herangezogen werden.

4.4 Virulenz von *EIEC* 4608-58 WT und Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT* in tumortragenden BALB/c-Mäusen

4.4.1 Die Replikation von *EIEC* 4608-58 Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT* ist im 4T1-Maustumormodell leicht attenuiert

Von allen untersuchten Kohlenhydrataufnahmemutanten veränderte sich die intrazelluläre Generationszeit von *EIEC* 4608-58 Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT* in Caco-2-Zellen unter Zellkulturbedingungen am stärksten im Vergleich zum Wildstamm. Daher wurde diese Mutante im Maustumormodell untersucht. Dazu wurden 6 Wochen alten BALB/c-Mäusen auf der abdominalen rechten Seite $5 \cdot 10^4$ 4T1-Tumorzellen subkutan implantiert. Nach 14 Tagen wurden $5 \cdot 10^6$ Bakterien aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase intravenös in die Schwanzvene injiziert. Im weiteren Verlauf des Versuches wurden zu bestimmten Zeitpunkten Leber, Milz und Tumor entnommen, die darin enthaltene Bakterienanzahl durch Ausplattieren bestimmt sowie histologische Schnitte des Tumors für die Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie angefertigt (Weibel *et al.*, 2008).

Am ersten Tag nach der Infektion kolonisierte *EIEC* 4608-58 WT die Leber mit etwa 10^5 - 10^6 Bakterien pro g Gewebe. Trotz eines Rückgangs an Tag 3 blieb die Zahl über 14 Tage hinweg im Gegensatz zu *E. coli* K-12 WT (Weibel *et al.*, 2008) beinahe unverändert. Allerdings traten hierbei große Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchstieren auf. Die Leber aus einer von drei Mäusen war stets deutlich höher mit Keimen belastet als bei den anderen beiden. Bei *EIEC* 4608-58 Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT* hingegen ging die Zahl der lebenden Bakterien pro g Leber innerhalb einer Woche von anfänglich 10^2 auf 0 zurück (Abb. 22).

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die Milz. Vom Wildstamm wurden über den gesamten Versuchszeitraum hinweg etwa 10^3 Bakterien pro g Milz isoliert. Bei Mäusen, die mit der Glc/Glc6P-Aufnahmemutante infiziert worden sind, war sie jedoch innerhalb von 3 Tagen keimfrei (Abb. 22).

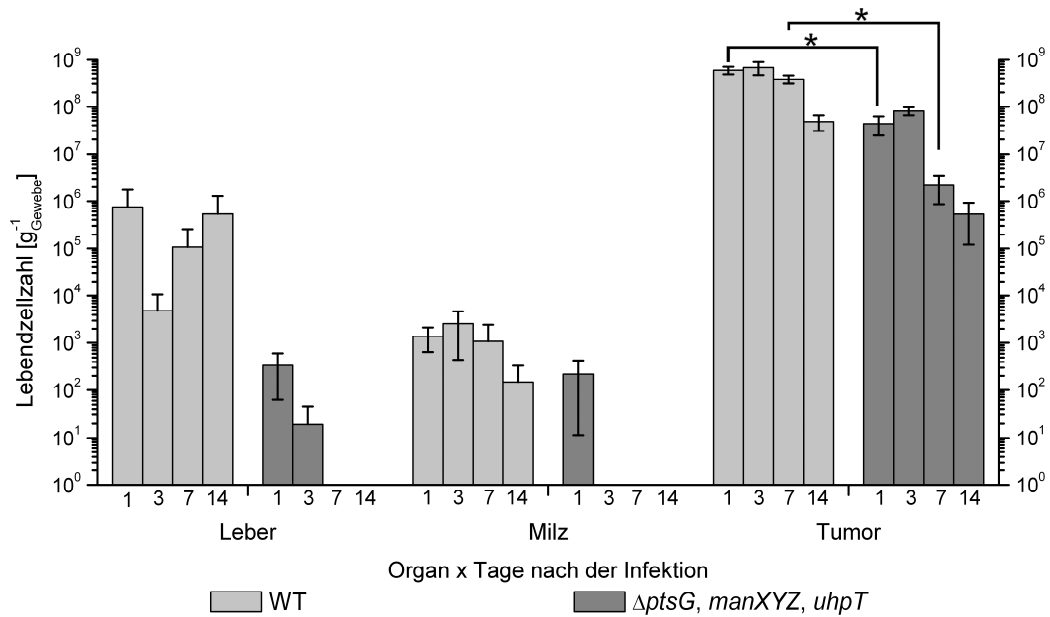


Abb. 22: Lebendzellzahlen von *EIEC* 4608-58 WT und $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$ während der Infektion tumortragender BALB/cOlaHsd-Mäuse. Pro Gruppe wurden 3 Mäuse mit je $5 \cdot 10^6$ Bakterien intravenös infiziert. Leber, Milz und Tumor wurden 1, 3, 7 und 14 Tage nach der Infektion entnommen und zur Bestimmung der Lebendzellzahl pro Gramm Gewebe auf Agarplatten ausplattiert. Stern *: $P < 0,05$.

Beide Stämme konnten den Tumor über 2 Wochen hinweg erfolgreich kolonisieren. Am ersten Tag nach der Infektion war er bereits mit $6 \cdot 10^8$ Bakterien des Wildstammes pro g Gewebe befallen. Diese Lebendzellzahl war signifikant höher als die der $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$ -Mutante ($4 \cdot 10^7$ lebende Bakterien/g) und lag ebenfalls über der von *E. coli* K-12 WT aus vergleichbaren Versuchen (Weibel *et al.*, 2008). Bis Tag 3 stieg die Belastung des Tumorgewebes aber bei beiden enteroinvasiven *E. coli* im Gegensatz zu *E. coli* K-12 WT (Weibel *et al.*, 2008) kaum noch an, so daß zwar die beiden Wildstämme, aber nicht die Mutante etwa gleiche Keimzahlen pro Gramm Tumorgewebe erreichten. Beide Pathogene hatten die stationäre Phase der Tumorkolonisierung also schon am ersten Tag nach der Infektion erreicht, wenn auch auf unterschiedlichen Niveaus. Die Lebendzellzahl der *EIEC*-Mutante reduzierte sich nach 7 Tagen deutlich um 95 %, während sie beim *EIEC*-Wildtyp nur um 37 % und bei *E. coli* K-12 WT um etwa 90 % (Weibel *et al.*, 2008) zurückging. Zwei Wochen nach der Infektion konnte auch bei *EIEC* 4608-58 WT ein Rückgang von über 90 %, bei der $\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$ -Mutante aber bereits um 99 % festgestellt werden (Abb. 22). Auch hier war der Rückgang bei der Mutante größer als bei *E. coli* K-12 WT (Weibel *et al.*, 2008).

Die Persistenz von *EIEC* 4608-58 WT in BALB/c-Mäusen war insgesamt betrachtet etwas höher als bei *E. coli* K-12 WT (Weibel *et al.*, 2008), die der Glc/Glc6P-Aufnahmemutante jedoch zumindest im Tumor deutlich geringer.

4.4.2 Die Verteilung von *EIEC* 4608-58 im 4T1-Tumormodell entspricht annähernd der von *E. coli* K-12

Zuvor veröffentlichte Studien zeigten, daß auch nicht pathogene Bakterien wie *E. coli* Nissle 1917 oder *E. coli* K-12 bei intravenöser Verabreichung murine Tumore erfolgreich kolonisieren können. Dabei werden die Bakterien aber im nekrotischen Zentrum des Tumors von tumorassoziierten Makrophagen eingeschlossen (Stritzker *et al.*, 2007; Weibel *et al.*, 2008).

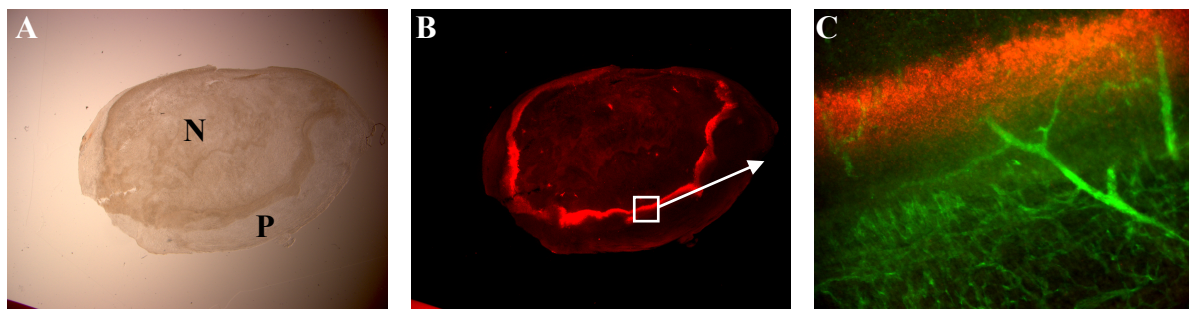


Abb. 23: Stereoskopische Fluoreszenzaufnahmen muriner 4T1-Tumore infiziert mit *EIEC* 4608-58 WT. Zu sehen sind histologische Schnitte des Tumors 3 Tage nach der Infektion. Die Bakterien wurden mit einem anti-LPS Antikörper rot, die Blutgefäße mit einem anti-CD31 Antikörper grün gefärbt. (A) Hellfeldaufnahme des Gesamtumors. N: nekrotischer Bereich, P: proliferierendes Gewebe. (B) Fluoreszenzaufnahme der Bakterien. (C) Verteilung der Blutgefäße.

Im Gegensatz zu diesen apathogenen Stämmen von *E. coli* konnte *EIEC* 4608-58 WT nicht phagozytische murine 4T1-Zellen *in vitro* infizieren und in diesen replizieren. Darüber hinaus war die Invasionseffizienz der *ptsG*-Mutante auch bei diesem Zelltyp im Vergleich zum Wildstamm höher (Daten nicht gezeigt). Dennoch kolonisierten beide *in vivo* lediglich den nekrotischen Bereich von 4T1-Tumoren in BALB/c-Mäusen. Wie in Abb. 23 für den Wildstamm gezeigt, waren die Bakterien überwiegend an der Grenze zwischen dem nekrotischen und dem proliferierenden Gewebe zu finden. Dort endeten auch die versorgenden Blutgefäße des Tumors. Obwohl *E. coli* fakultativ anaerob wachsen kann (Clements *et al.*, 2002), war das anoxische Zentrum des Tumors nur dünn mit *EIEC* 4608-58 WT besiedelt. Ein Eindringen in das proliferierende Gewebe oder die äußeren Schichten des Tumors konnte dagegen trotz der Fähigkeit zur aktiven Invasion nie beobachtet werden, so daß die Verteilung weitestgehend der von apathogenen *E. coli*-Stämmen (Stritzker *et al.*, 2007; Weibel *et al.*, 2008) entsprach. Entsprechend den Daten der Lebendzellzahlbestimmung konnten bei *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT* an Tag 3 auch durch mikroskopische Analyse deutlich weniger Bakterien detektiert werden als beim Wildstamm (Daten nicht gezeigt).

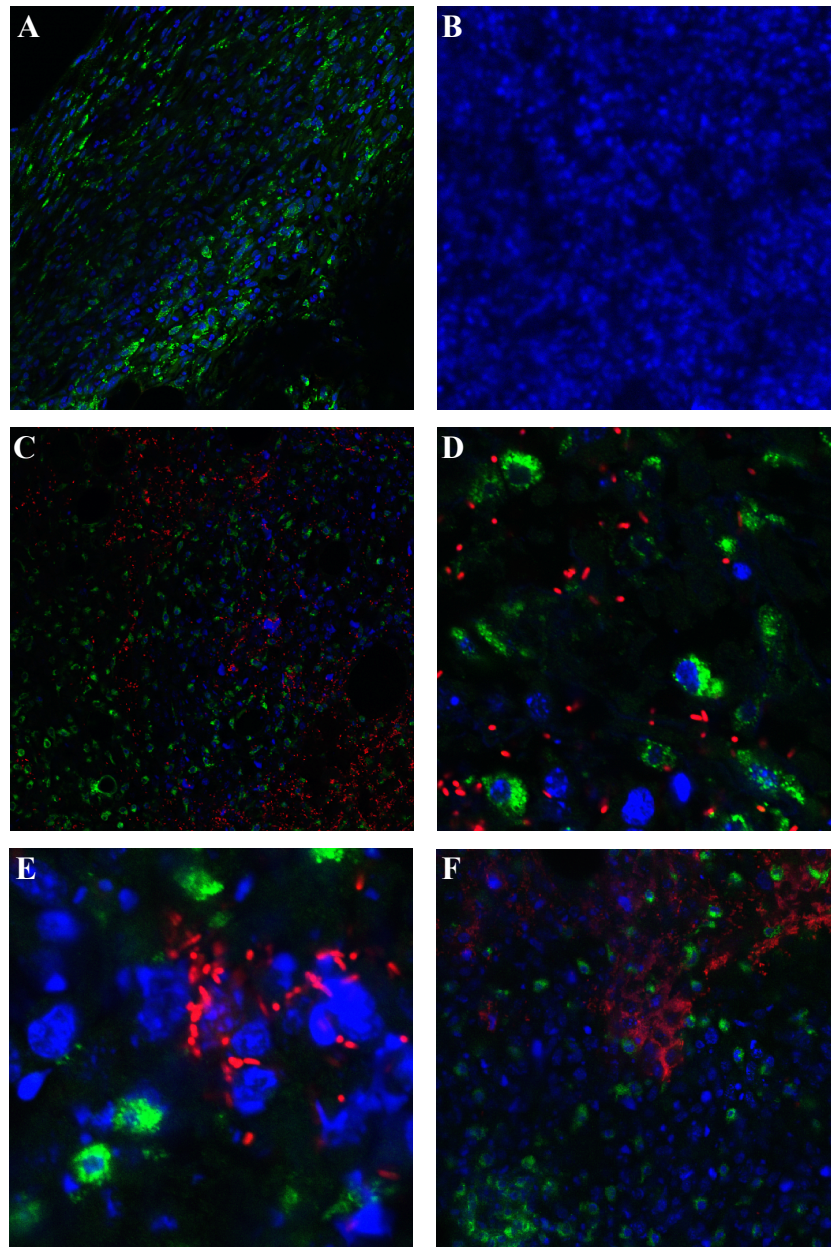


Abb. 24: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen eines murinen 4T1-Tumors infiziert mit *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$. Der Tumor wurde 3 Tage nach der Infektion entnommen. Die Kerne der murinen Zellen wurden mit Höchst 33342 blau, Makrophagen zusätzlich mit einem anti-CD68 Antikörper grün gefärbt. Die Bakterien wurden mittels eines anti-LPS Antikörpers detektiert und rot markiert.

Auch bei einer genaueren Lokalisation der Bakterien mittels konfokaler Mikroskopie wurden kaum intrazelluläre Bakterien gefunden (Abb. 24). In der Peripherie des Tumors waren ausschließlich murine Zellen (blau) zu finden, die entweder $CD68^-$ oder $CD68^+$ (grün) waren, jedoch keine Bakterien (Abb. 24A). Die darunter liegenden Schicht war nahezu frei von $CD68^+$ Zellen. Dennoch war auch diese Region nicht von Bakterien besiedelt (Abb. 24B). Erst am Übergang in den nekrotischen Bereich und im Zentrum traten wieder $CD68^+$ Zellen und zum ersten Mal auch Bakterien (rot) auf (Abb. 24C).

Diese kolonisierten den nekrotischen Bereich überwiegend im extrazellulären Raum (Abb. 24D). Nur vereinzelt konnten Bakterien beobachtet werden, die mit CD68⁻ oder CD68⁺ Zellen assoziiert waren (Abb. 24E, F). Eine Differenzierung zwischen extra- und intrazellulären Bakterien war aber aufgrund der starken Zerstörung des Gewebes auch bei einer Färbung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin-FITC nur schwer möglich.

Die Beschränkung von *EIEC* 4608-58 WT auf das nekrotische Zentrum des Tumors ist möglicher Weise darin begründet, daß dieser Stamm *in vitro* weder in murinen J-774A.1-Makrophagen noch in humanen mit all-trans Retinsäure und 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ differenzierten U-937-Lymphoblasten (Caron *et al.*, 1994) replizieren konnte. Lediglich in un- oder mit PMA differenzierten U-937-Lymphoblasten konnte eine Vermehrung des Wildstammes, aber nicht der entsprechenden Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In der Arbeit von Galmbacher (2008) konnte gezeigt werden, daß *Shigella flexneri* M90T Δ *aroA* in murinen 4T1-Tumoren überwiegend tumorassoziierte Makrophagen (TAM) infiziert und deren Zelltod durch Induktion der Caspase-1 auslöst. In der Folge wird die Anzahl an TAMs signifikant reduziert und es kommt zur Stagnation des Tumorwachstums.

Zur genaueren Quantifizierung von extra- und intrazellulären Bakterien und deren Verteilung auf F4/80⁻ und F4/80⁺ Zellen wurden daher tumortragende Mäuse mit *EIEC* 4608-58 WT, *EIEC* 4608-58 Δ *icsA*, *uhpT* oder *E. coli* K-12 WT intravenös infiziert. Im Gegensatz zum vorherigen Versuch wurden hier jeweils $1 \cdot 10^4$ 4T1-Zellen beidseitig an der Brust subkutan implantiert. Nach einer Entwicklungsdauer der Tumore von 14 Tagen wurden die Mäuse, wie oben beschrieben, infiziert. Die Tumore wurden 6 h bzw. 7 Tage nach der Infektion entnommen und deren Matrix durch Behandlung mit Dispase verdaut. In der so gewonnenen Suspension an Tumorzellen und Bakterien wurden die extrazellulären Bakterien durch Inkubation mit Gentamicin abgetötet. Anschließend wurden die Zellen durch Sortierung (MACS[®]) in F4/80⁻ und F4/80⁺ Zellen getrennt. Von jeder erhaltenen Fraktion wurde die Gesamtzahl an Tumorzellen durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer sowie die Anzahl lebender Bakterien durch Lyse der Zellen und Ausplattieren bestimmt (Galmbacher, 2008).

Nach 6 h konnten bei *EIEC* 4608-58 WT im Gesamttumor etwa $2 \cdot 10^4$ Bakterien pro Tumorzelle isoliert werden und damit etwas mehr als bei *EIEC* 4608-58 Δ *icsA*, *uhpT* ($\approx 10^6$) und *E. coli* K-12 ($\approx 10^5$). Nach der Behandlung mit Gentamicin waren bei allen drei verwendeten Stämmen weder im Gesamttumor noch in den beiden Subfraktionen lebende

Bakterien nachweisbar. Dies läßt vermuten, daß 6 h nach der Infektion der Mäuse alle Bakterien im Tumor extrazellulär vorlagen (Abb. 25).

Nach 7 Tagen erhöhte sich erwartungsgemäß die Zahl der Bakterien im Gesamttumor bei *EIEC* 4608-58 WT auf $5,1 \cdot 10^{-2}$ Bakterien pro Tumorzelle. Dies war signifikant mehr als bei der Mutante ($8,5 \cdot 10^{-3}$; $P < 0,05$) und nur etwas mehr als bei *E. coli* K-12 ($3,9 \cdot 10^{-2}$). Durch die Inkubation mit 300 µg Gentamicin/ml verringerte sich die Lebendzellzahl beim *EIEC* Wildstamm deutlich auf $2,4 \cdot 10^{-4}$ Bakterien pro Tumorzelle ($P < 0,05$). Demnach waren nur etwa 0,5% der Bakterien intrazellulär. Der Rückgang war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen beiden Stämmen ($1,7 \cdot 10^{-5}$ bzw. $1,1 \cdot 10^{-5}$ Bakterien pro Tumorzelle).

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die Subfraktion der F4/80⁻ Zellen. Auch hier konnten mehr Bakterien von *EIEC* 4608-58 WT intrazellulär nachgewiesen werden als bei der Mutante oder *E. coli* K-12. In den F4/80⁺ Zellen hingegen war die Keimzahl der beiden Wildstämme gleich hoch, die der Δ *icsA*, *uhpT*-Mutante jedoch etwas niedriger.

Im Gegensatz zu *Shigella flexneri* M90T Δ *aroA*, der hauptsächlich in den F4/80⁺ tumorassoziierten Makrophagen nachgewiesen wurde (Galmbacher, 2008), unterschieden sich die ermittelten Lebendzellzahlen zwischen den F4/80⁻ und F4/80⁺ Zellen bei beiden *EIEC*-Stämmen kaum. Lediglich bei *E. coli* K-12 konnten mehr Bakterien in den F4/80⁺ als den F4/80⁻ Zellen detektiert werden.

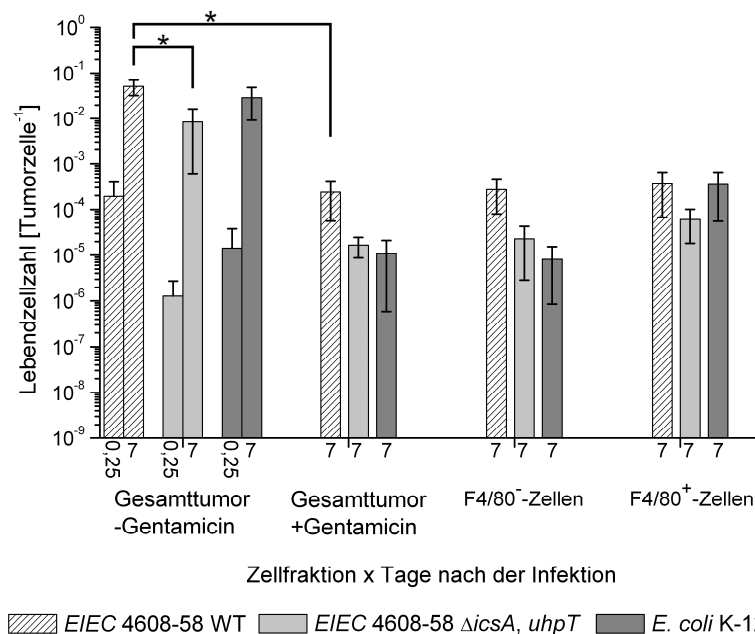


Abb. 25: Quantifizierung und Verteilung von *EIEC* 4608-58 WT, *EIEC* 4608-58 Δ *icsA*, *uhpT* und *E. coli* K-12 WT im 4T1-Tumor. Pro Gruppe wurden jeweils 4 Mäuse mit je $5 \cdot 10^6$ Bakterien intravenös infiziert. Für jede Fraktion ist die Anzahl lebender Bakterien pro Tumorzelle dargestellt. Stern *: $P < 0,05$.

4.5 ¹³C-Isotopolog-Perturbationsanalyse von *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *S. Typhimurium* 14028s nach Infektion von Caco-2-Zellen

4.5.1 Glukoseverwertung im Anabolismus von Caco-2-Zellen und Bakterien während der Infektion

Die unerwartet starke Attenuierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ im Maustumormodell könnte entweder auf eine erhöhte Sensitivität dieser autolytischen Mutante gegenüber dem murinen Immunsystem zurückzuführen sein oder aber auch auf die verlangsamte Vermehrung aufgrund der Deletion der Glukose- und Glukose-6-phosphat-Transporter. Um daher den intrazellulären Metabolismus von *EIEC* 4608-58 wie auch von *EIEC* HN280 und *S. Typhimurium* 14028s eingehender zu untersuchen, wurden Markierungsexperimente mit uniform markierter ¹⁴C₆-Glukose ([U-¹⁴C₆]-Glukose) und ¹³C₆-Glukose ([U-¹³C₆]-Glukose) während der Infektion von Caco-2-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden durchschnittlich $1,8 \cdot 10^7$ Zellen in einer 175 cm² Zellkulturflasche abhängig von der Invasionseffizienz und der intrazellulären Generationszeit des verwendeten Bakterienstammes mit einer MOI von 20-100 infiziert, so daß zum Erntezeitpunkt 6,5 h p. i. für beide *EIEC*-Stämme bzw. 8,5 h p. i. für *Stm* 14028s ungefähr 10^7 - 10^8 lebende Bakterien (c. f. u.) pro Flasche isoliert werden konnten (Tabelle 2). Da die Bakterien nicht durch Zentrifugation mit den Zellen in Kontakt gebracht werden konnten, wurde die MOI im Vergleich zur Bestimmung der intrazellulären Lebendzellzahl erhöht und mehrere Flaschen pro Bakterienstamm infiziert. Die Angaben in Tabelle 2 beziehen sich jeweils auf eine infizierte Flasche und stellen Mittelwerte aus mehreren Versuchen dar.

		WT	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG$, $manXYZ$	$\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$
<i>EIEC</i> 4608-58	MOI	100	--	--	100
	c. f. u. 1 h p. i.	$5,6 \cdot 10^5$	--	--	$5,6 \cdot 10^5$
	6,5 h p. i.	$3,4 \cdot 10^7$	--	--	$1,3 \cdot 10^6$ †
<i>EIEC</i> HN280	MOI	20	20	75	75
	c. f. u. 1 h p. i.	$1,9 \cdot 10^6$	--	--	$9,7 \cdot 10^5$
	6,5 h p. i.	$2,3 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^7$
<i>Stm</i> 14028s	MOI	100	100	100	100
	c. f. u. 1 h p. i.	$3,1 \cdot 10^7$	--	--	$2,3 \cdot 10^7$
	8,5 h p. i.	$1,1 \cdot 10^8$	$7,3 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$	$8,7 \cdot 10^7$

Tabelle 2: Infektionsbedingungen für die Isotopolog-Perturbationsanalyse. Die Angaben beziehen sich auf jeweils eine infizierte 175 cm² Zellkulturflasche und stellen Mittelwerte aus mehreren Versuchen dar. Bei jedem Versuch wurden jeweils 2-10 Flaschen pro Stamm infiziert. †Dieser Wert bezieht sich auf eine Infektion mit FCS behandelten Bakterien.

Am Ende der Replikationsphase wurden die Bakterien durch Zentrifugation von den Wirtszellen getrennt. Zur besseren Interpretation der ab Kapitel 4.5.2 beschriebenen ¹³C-Markierungsdaten, die mit [U-¹³C₆]-Glukose erstellt wurden, wurde zunächst der

Verbrauch von ^{14}C -Glukose im Anabolismus der Caco-2-Wirtszellen und der enterobakteriellen Wildstämme während der 6,5 stündigen (*EIEC*) bzw. 8,5 stündigen (*Stm* 14028s) Infektion mit Hilfe von $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]$ -Glukose bestimmt. Dabei wurde eine externe Konzentration von 10 mM $[\text{U-}^{14}\text{C}_6]$ -Glukose (0,5 MBq/mmol) gewählt.

Unter diesen Bedingungen verbrauchten $1,8 \cdot 10^7$ Caco-2-Zellen in einer 175 cm² Zellkulturflasche ungefähr 3-4 μmol , also etwa 2 % der extern zugegebenen 200 μmol $^{14}\text{C}_6$ -Glukose zur Synthese eigener Zellbestandteile innerhalb des Infektionszeitraumes (Abb. 26). Diese Menge an eingebauter ^{14}C -Markierung änderte sich durch die Infektion mit einem der drei untersuchten Wildstämme kaum. Demnach steht für die Dauer des Infektionsexperiments ein Überschuß an Glukose zur Verfügung, deren Aufnahme durch Caco-2-Zellen kaum von den Infektionen mit den hier untersuchten Bakterien beeinflusst wird.

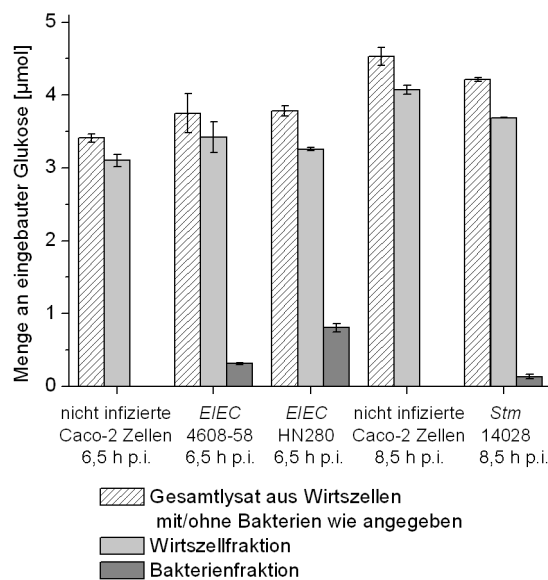


Abb. 26: Glukoseverbrauch durch die Wirtszellen und intrazellulären Enterobakterien. Die Infektion der Caco-2-Zellen wurde in Gegenwart von 200 μmol ^{14}C -Glukose in 20 ml RPMI 1640 durchgeführt. Die Balken geben die Menge an ^{14}C -Glukose [μmol] an, die während der Dauer der Infektion in die Wirtszellen und/oder intrazellulären Bakterien eingebaut wurde.

Am Ende der 6,5 stündigen Infektion entsprach die von *EIEC* 4608-58 (10^7 intrazelluläre Bakterien) eingebaute ^{14}C -Markierung etwa 0,3 μmol Glukose, die des Stammes *EIEC* HN280 ($2 \cdot 10^8$ intrazelluläre Bakterien) etwa 0,8 μmol Glukose. Die von 10^8 intrazellulären *Stm* 14028s nach 8,5 stündiger Infektion eingebaute ^{14}C -Markierung entsprach etwa 0,1 μmol Glukose (Abb. 26). Demnach wird nur ein kleiner Teil der verbrauchten Glukose zur Synthese bakterieller Zellbestandteile verwendet. Bezogen auf die Anzahl intrazellulärer Bakterien nehmen beide *EIEC*-Stämme deutlich mehr Glukose pro Bakterienzelle auf als *Stm* 14028s. Der ermittelte Glukoseverbrauch stimmt insofern mit den beobachteten intrazellulären Generationszeiten überein.

4.5.2 Einbau der ^{13}C -Markierung aus extern zugegebener $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose in die Aminosäuren der intrazellulär replizierenden Enterobakterien

Zur Erstellung der ^{13}C -Isotopologenprofile wurden die Zellen, wie oben beschrieben, infiziert. Die infizierten Zellen wurden in RPMI mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose inkubiert. Am Ende der intrazellulären Replikationsphase wurden die Bakterien von den Wirtszellen durch Zentrifugation getrennt, die Proteine in den Fraktionen (Bakterien bzw. Wirtszellen) durch saure Hydrolyse in Aminosäuren aufgespaltet und mittels GC/MS analysiert. Unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse werden Gln und Asn in Glu bzw. Asp umgewandelt. Daher sind die angegebenen Werte für Glu und Asp Mittelwerte aus Glu/Gln und Asp/Asn. Arg und Met konnten aufgrund einer zu geringen Ausbeute an TBDMS-Derivaten mit dieser Methode nicht detektiert werden, während Cys und Trp im Verlaufe der Hydrolyse zerstört wurden. Folglich wurden 14 Aminosäuren ausgewertet (Antoniewicz *et al.*, 2007).

Im folgenden werden nun der ^{13}C -Überschuß pro C-Atom und die ^{13}C -Isotopologenverteilung bei den Aminosäuren beschrieben, die von den enterobakteriellen Wildstämmen und ihrer entsprechenden $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten während der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden.

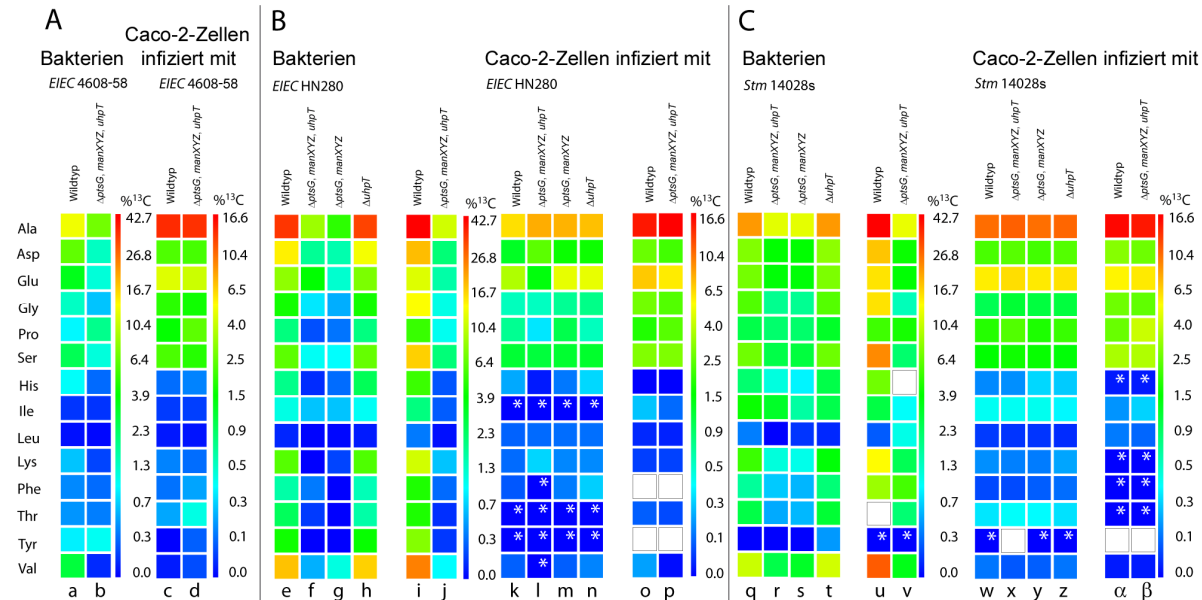


Abb. 27: ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in den Aminosäuren der intrazellulären Bakterien und der infizierten Caco-2-Wirtszellen. Die Farben geben die Menge des ^{13}C -Einbaus in jeder Aminosäure an. (A) *EIEC* 4608-58 Wildtyp und entsprechende $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante (Spalten a, b) sowie Caco-2-Zellen infiziert mit diesen beiden Stämmen (c, d) (s. auch Anhang 16). (B) *EIEC* HN280 Wildtyp und die jeweils angegebenen Mutanten dieses Stammes (Spalten e-j) sowie die entsprechend infizierten Caco-2-Zellen (k-p) (s. auch Anhänge 18 und 19). (C) *Stm* 14028s Wildtyp und die jeweils angegebenen Mutanten (q-v) sowie die infizierten Caco-2-Zellen (w- β) (s. auch Anhänge 21 und 22). Die Spalten e-h, k-n, q-t und w-z zeigen die ^{13}C -Markierungen von Aminosäuren aus Versuchen mit langsam proliferierenden Caco-2-Zellen. Demgegenüber wurden die Aminosäuren in den Spalten i-j, o-p, u-v und α - β aus Experimenten mit schneller proliferierenden Caco-2-Zellen isoliert. Die weißen Sternchen markieren Werte mit hohen Standardabweichungen. Weiße Felder kennzeichnen Aminosäuren, die nicht detektiert werden konnten.

Wildstämme

In den Infektionsexperimenten mit *EIEC* 4608-58 WT waren nur 6 Aminosäuren mit einer mittleren ^{13}C -Anreicherung pro C-Atom von 12-1 % in der Reihenfolge Ala> Asp> Glu> Val> Ser > Gly markiert. Bemerkenswerterweise blieben insbesondere Aminosäuren, zu deren Biosynthesen Zwischenprodukte des Pentosephosphatweges als Vorstufen benötigt werden (Tyr, Phe und His benötigen Erythrose-4-phosphat bzw. P-Ribosylpyrophosphat), aber auch Lys und Thr praktisch unmarkiert <1% (Abb. 27, Spalte a; Anhang 16).

Bei *EIEC* HN280 WT enthielten mit Ausnahme von Leu alle analysierten Aminosäuren signifikante Mengen ^{13}C -markierter Bausteine aus der extern zugegebenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose. Die Einbauraten variierten jedoch über eine breite Spanne von 33-1 % in der Reihenfolge Ala> Asp> Val> Glu> Ser> Lys> Gly> Thr> Pro> Tyr> Phe> His> Ile (Abb. 27, Spalte e; Anhang 18). Die *de novo* Synthese von Aminosäuren, als Beispiel für anabole Monomere, scheint sich daher in beiden *EIEC*-Stämmen während der Replikation in Caco-2-Zellen deutlich zu unterscheiden.

Wiederum ein anderes Einbaumuster wurde für *S. Typhimurium* 14028s gefunden, das bei Infektion von Caco-2-Zellen in der SCV repliziert. Hier zeigten 10 AS eine Markierung mit ^{13}C -Bausteinen aus der $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose mit Einbauraten von 21-1 % in der Reihenfolge Ala > Val> Asp> Glu> Ser> Gly> Lys> Pro> Phe> His (Abb. 27, Spalte q; Anhang 21). Diese hohe ^{13}C -Anreicherung läßt einen effizienten Aufnahmeweg für die ^{13}C -Markierung aus der extern zugegebenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose in das phagosomale Kompartiment der SCV während der 8,5 stündigen Infektionsdauer vermuten. Weiterhin belegt dies, daß ausreichende Mengen an verwertbaren Substraten in die SCV transportiert werden, so daß *S. Typhimurium* während der Replikation in der membranumschlossenen SCV eine beständige und effiziente Synthese von Aminosäuren betreiben kann.

Δ ptsG, manXYZ, uhpT-Mutanten

Um zu ermitteln, ob die ^{13}C -Markierung in den Aminosäuren der drei untersuchten Enterobakterien während der Infektion von Caco-2-Zellen direkt von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose abstammte oder ob Zwischenstufen, die beim Abbau der Glukose durch die Wirtszelle entstehen und daher ebenfalls ^{13}C -markiert sind, von den Bakterien aufgenommen wurden, wurden dieselben Experimente mit Mutanten durchgeführt, deren Aufnahme von Glukose, Glukose-6-phosphat oder von beiden signifikant beeinträchtigt war.

Bei *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ verringerte sich der ^{13}C -Einbau in Ser, Gly und Ala im Vergleich zum Wildstamm um etwa 50 %, bei Glu, Asp und Val zwischen 70 und 90 %, wenn die Infektion in Gegenwart von 10 % FCS durchgeführt wurde (Abb. 27, Spalte b; Anhang 16). Wurde während der einstündigen Internalisierung jedoch kein FCS zugegeben, betrug auch bei Glu und Asp der Rückgang lediglich etwa 50 % (Anhang 17). Dies deutet ebenso wie die Bestimmung der intrazellulären Lebendzellzahl darauf hin, daß neben Glukose noch alternative Substrate verwertet werden können und Glukose wie auch Glukose-6-phosphat nur mit geringer Effizienz genutzt werden.

Verglichen mit dem *EIEC* 4608-58 Wildstamm zeigten weiterhin die drei $ptsG$ -Mutanten, $\Delta ptsG$, $\Delta ptsG$, $uhpT$ und $\Delta ptsG$, $manXYZ$, aber nicht die ebenfalls hoch invasive $\Delta manXYZ$, $uhpT$ -Mutante einen um den Faktor 1,5-2 erhöhten Einbau in diese Aminosäuren, jedoch nicht in Leu, Thr, Ile, Lys, Phe und Tyr (Anhang 16).

Im Gegensatz dazu wurde bei den Aminosäuren aus *EIEC* HN280 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ ein deutlich stärkerer Rückgang bei der ^{13}C -Anreicherung pro C-Atom mit Werten zwischen 50 und 80 % im Vergleich zum entsprechenden Wildstamm festgestellt als bei *EIEC* 4608-58 (Abb. 27, Spalte f; Anhang 18), der sich bei Internalisierung ohne FCS nochmals auf 70-90 % erhöhte (Anhang 20). Lediglich Ala > Glu > Asp zeigten noch eine Markierung über 1 %. Dies läßt vermuten, daß ein großer Teil (> 50 %) der ^{13}C -Markierung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren direkt aus $[U-^{13}C_6]$ -Glukose oder $[U-^{13}C_6]$ -Glukose-6-phosphat stammt. Diese scheinen somit deutlich effizienter für den intrazellulären Metabolismus von *EIEC* HN280 verwertet zu werden als bei *EIEC* 4608-58.

Um festzustellen, ob Glukose oder Glukose-6-phosphat die bevorzugte Kohlenstoffquelle für den intrazellulären Metabolismus von *EIEC* HN280 darstellt, wurden die $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -sowie die $\Delta uhpT$ -Mutante ebenfalls untersucht. Während die ^{13}C -Einbauraten in die Aminosäuren von Wildtyp und $\Delta uhpT$ -Mutante nahezu identisch waren (Abb. 27, Spalte h; Anhang 18), gingen die Werte für die Aminosäuren der $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante ähnlich stark zurück wie bei dem $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Stamm (Abb. 27, Spalte g; Anhang 18). Dies weist eindeutig darauf hin, daß Glukose, aber nicht Glukose-6-phosphat das bevorzugte Kohlenstoffsubstrat während der intrazellulären Replikation von *EIEC* HN280 unter den vorgegebenen Bedingungen ist. Der Einbau der ^{13}C -Markierung in die Aminosäuren der $\Delta ptsG$ - und der $\Delta manXYZ$ -Einfachmutante veränderte sich hier im Vergleich zum entsprechenden Wildstamm jedoch nicht (Anhang 18).

Die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante von *Stm* 14028s zeigte ebenfalls einen stark reduzierten ^{13}C -Einbau ($> 50\%$) in *de novo* synthetisierten Aminosäuren verglichen mit dem Wildstamm (Abb. 27, Spalte r; Anhang 21). Auch hier war die ^{13}C -Einbaurate der $\Delta uhpT$ -Mutante ähnlich effizient wie beim Wildstamm, während für die $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante ein ähnlicher Rückgang beobachtet wurde wie bei der Dreifachmutante $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ (Abb. 27, Spalten t und s; Anhang 21). Folglich scheint der intrazelluläre Kohlenstoffmetabolismus von *S. Typhimurium* während der Replikation in der SCV von Caco-2-Zellen ebenfalls hauptsächlich durch Glukose, aber nicht von Glukose-6-phosphat gespeist zu werden.

4.5.3 Vergleich der ^{13}C -Isotopologenprofile der einzelnen Aminosäuren aus den drei Wildstämmen und ihrer entsprechenden $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten

Die bisher beschriebenen ^{13}C -Anreicherungswerte und Einbauraten bezogen sich auf den mittleren ^{13}C -Überschuß pro C-Atom einer bestimmten Aminosäure. Obwohl diese Daten bereits wichtige Eigenschaften bezüglich der bevorzugten Kohlenstoffquelle wiedergeben, lassen sich auf der Grundlage der Zusammensetzung des Gemisches aus verschiedenen Isotopologen bei einer bestimmten Aminosäure weitaus genauere Erkenntnisse über den intrazellulären Metabolismus gewinnen. Insbesondere zeigt das Vorkommen ^{13}C -markierter Isotopologe mit einer unterschiedlichen Anzahl an ^{13}C -Atomen ($M + 1$, $M + 2$, $M + 3 \dots$), welche Bausteine zusammenhängender ^{13}C -Atome aus der markierten Quelle (z. B. $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose) zu deren Synthesen verwendet wurden. Dieses Muster ist charakteristisch für die Anzahl und Position der ^{13}C -Atome in der Kohlenstoffquelle wie auch für deren metabolischen Fluß, der zu den Vorstufen der Aminosäurebiosynthese führt. Daher werden im folgenden die ^{13}C -Isotopologenprofile der markierten Aminosäuren erläutert, die von den hier untersuchten bakteriellen Wildstämmen und ihrer entsprechenden $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten während der Replikation in Caco-2-Zellen in Gegenwart von extrazellulärer $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose synthetisiert wurden. Die Verteilungsmuster der Isotopologe sind graphisch in den Abb. 28-30 gezeigt. Für ein besseres Verständnis der Interpretation dieser Verteilungen sind in den Anhängen 23-25 weiterhin die wichtigsten katabolen Stoffwechselwege und anaplerotischen Reaktionen dargestellt, die in allen drei untersuchten Enterobakterien vorhanden sind, wie auch die zu erwartende ^{13}C -Verteilung, falls $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose oder ein Derivat davon durch einen dieser Wege umgesetzt würde.

a. Aminosäuren, die von Zwischenprodukten der Glykolyse abstammen und *de novo* synthetisiert wurden (Ala, Val, Ser, Gly)

Wildstämme

Obwohl Ala in *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s in unterschiedlichen Mengen *de novo* synthetisiert wurde (Abb. 28A, schwarze Balken), stellte bei allen drei Stämmen das dreifach ^{13}C -markierte Isotopolog $^{13}\text{C}_3$ -Ala die weitaus größte Fraktion dar (Abb. 28A, rote Balken, Anhänge 16, 18 und 21). Die unmittelbare metabolische Vorstufe für dieses Ala-Isotopolog ist $^{13}\text{C}_3$ -Pyruvat, das in den Bakterien selbst durch den Abbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose durch die Glykolyse, dem Entner-Doudoroff-Weg, dem Pentosephosphatzyklus oder einer Kombination dieser Wege entstehen könnte. Die Bildung kann aber auch aus $^{13}\text{C}_3$ -Substraten (z. B. Glycerin, Glycerin-3-phosphat, Laktat oder Pyruvat) erfolgen, die von der Wirtszelle aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose erzeugt, anschließend von den Bakterien aufgenommen und letztendlich zu $^{13}\text{C}_3$ -Pyruvat/Ala metabolisiert werden.

^{13}C -markierte Kohlenstoffquellen aus der Wirtszelle, die überwiegend zu $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetyl-CoA abgebaut werden (z. B. Acetat, Fettsäuren, einige Aminosäuren und in gewissem Ausmaß auch Laktat und Pyruvat), liefern jedoch keinen bedeutenden Beitrag zur Synthese des bakteriellen Pyruvats, da in diesen Fällen hauptsächlich die $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologe von Pyruvat (und damit auch Ala) über den Glyoxylatweg und die PEP-Carboxykinasereaktion hätten gebildet werden müssen (Anhang 25). Die kleinen Mengen an $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologen, die bei allen drei Wildstämmen gefunden wurden (etwa 5-8%), könnten durch den Abbau solcher ^{13}C -markierter Substrate entstanden sein.

Das ^{13}C -Isotopologienmuster von Val, das aus zwei Pyruvatmolekülen unter Entfernung eines C-Atoms durch Decarboxylierung gebildet wird, bestand überwiegend aus dem $^{13}\text{C}_5$ -Isotopolog, was durch die Verknüpfung zweier $^{13}\text{C}_3$ -Pyruvatmoleküle erklärt werden kann (Abb. 28A, violette Balken). Die ebenfalls in nennenswerten und gleichen Mengen gebildeten $^{13}\text{C}_2$ - und $^{13}\text{C}_3$ -Isotopologe stammen möglicherweise aus der Verbindung eines unmarkierten und eines $^{13}\text{C}_3$ -markierten Pyruvatmoleküls.

Nur in geringen Mengen waren $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_4$ -Isotopologe vorhanden, die wiederum - ähnlich wie die $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Ala Isotopologe - aus $^{13}\text{C}_1$ - bzw. $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Pyruvat bei Reaktion mit einem unmarkiertem, einem $^{13}\text{C}_3$ - oder einem weiteren $^{13}\text{C}_2$ -Pyruvat gebildet worden sein könnten.

Die beiden verbliebenen verzweigt-kettigen Aminosäuren, Ile und Leu, waren nicht oder im Falle von *EIEC* HN280 WT nur schwach ^{13}C -markiert. Vermutlich werden sie entweder nicht

de novo synthetisiert oder abgebaut. Letztere Möglichkeit erscheint aber unwahrscheinlich, da Val, das über ähnliche Reaktionsschritte wie Ile degradiert wird, eine hohe ^{13}C -Markierung besaß. Da zur Biosynthese von Ile bzw. Leu zusätzlich zu Pyruvat noch Threonin bzw. Acetyl-CoA benötigt wird, sind beide vermutlich aufgrund eines Mangels an diesen zusätzlichen Vorstufen stark beeinträchtigt.

Die Biosynthesen von Ser und Gly sind eng miteinander verknüpft. Ser wird hauptsächlich aus 3-Phosphoglycerat gebildet, während Gly aus Ser durch Entfernung des C-Atoms der Seitenkette durch die Ser-Hydroxymethyltransferase entsteht. Dabei wird Tetrahydrofolat in N^5,N^{10} -Methylen tetrahydrofolat umgewandelt. Obwohl diese Reaktion reversibel ist, ist die Erzeugung von Ser aus Gly durch die Rückreaktion bei den untersuchten Bakterien unter den gewählten Versuchsbedingungen unwahrscheinlich.

Die gefundenen ^{13}C -Isotopologenprofile von Ser waren äußerst unterschiedlich zusammengesetzt. Bei allen drei Wildstämmen bildete $^{13}\text{C}_3$ -Ser die größte Isotopologenfraktion (Abb. 28A, rote Balken), aber $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Serin wurden ebenfalls in erheblichen, aber schwankenden Mengen gefunden (Abb. 28A, blaue und gelbe Balken). $^{13}\text{C}_3$ -Ser wird offensichtlich unmittelbar aus $^{13}\text{C}_3$ -markiertem 3-Phosphoglycerat erzeugt, das in der Glykolyse (oder dem Entner-Doudoroff-Weg) aus einem Kohlenstoffsubstrat generiert werden muß, welches in der Abbaukette vor 3-Phosphoglycerat steht (z. B. $^{13}\text{C}_6$ -Glukose oder $^{13}\text{C}_3$ -Glyzerin(-3-phosphat)).

Im Gegensatz dazu können $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Ser Isotopologe nicht auf diesem Weg produziert werden. Sie müssen daher von einem entsprechenden ^{13}C -markierten PEP-Isotopolog abstammen, das vermutlich aus $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat durch die PEP-Carboxykinase entsteht (siehe oben und Anhang 25). Da die PEP-Carboxykinase jedoch nur bei geringen Glukosekonzentrationen induziert wird (Fischer and Sauer, 2003; Nanchen *et al.*, 2008), scheint die den Bakterien zur Verfügung stehende Menge an Glukose in Caco-2-Zellen ebenfalls gering zu sein. Das $^{13}\text{C}_2$ -markierte Acetyl-CoA zur Erzeugung von $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat muß wiederum aus einem $^{13}\text{C}_3$ -Substrat (z. B. Laktat oder Pyruvat) durch Decarboxylierung entstanden sein, da gleichzeitig $^{13}\text{C}_3$ -Ala das am meisten gebildete Ala Isotopolog war. Letzteres würde nicht der Fall sein, wenn $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA aus ^{13}C -markierten Fettsäuren gebildet würde.

Die erhaltenen ^{13}C -Isotopologe von Gly (hauptsächlich $^{13}\text{C}_2$ - und weniger $^{13}\text{C}_1$ -Gly) können mit Hilfe ihre Synthese aus den entsprechenden ^{13}C -Ser Isotopologen katalysiert durch die Ser-Hydroxymethyltransferase erklärt werden.

wurden, stieg zudem bei Ala das Verhältnis des $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologs zu den anderen Isotopologen nicht deutlich an (s. Kapitel 4.5.6). $^{13}\text{C}_3$ -Ala, $^{13}\text{C}_3$ -Ser und $^{13}\text{C}_2$ -Gly waren die vorherrschenden Isotopologe. Vermutlich wird die Vorstufe der beiden letztgenannten Aminosäuren, 3-Phosphoglycerat, in der $\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$, $\Delta uhpT$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 selbst in Abwesenheit von Glukose auf ähnliche Art und Weise erzeugt wie im Wildstamm. Dies bestätigt die Vermutung, daß dieser Stamm neben Glukose zusätzlich ein C_3 -Substrat wie Glyzerin(-3-phosphat) verwertet.

Interessanterweise verdoppelten sich bei den drei *ptsG*-Mutanten die relativen Mengen der $^{13}\text{C}_3$ -Ala und $^{13}\text{C}_3$ -Ser Isotopologe im Vergleich zum Wildstamm. Weiterhin nahm die Menge des $^{13}\text{C}_1$ -Ser noch deutlich stärker zu und es wurde etwa 2-3 mal so viel $^{13}\text{C}_1$ - wie $^{13}\text{C}_2$ -Ser gebildet (Anhang 16). Dies deutet darauf hin, daß die Deletion von *ptsG* entweder den Abbau und/oder die Aufnahme von (zusätzlichen) C_3 -Substraten begünstigt (Lengeler and Jahreis, 2009).

Auch bei der *EIEC* HN280 Mutante blieb, ähnlich wie im Wildstamm, $^{13}\text{C}_3$ -Ala das vorherrschende Isotopolog, wenn auch in deutlich reduzierter Menge (Abb. 28A, Anhang 18). Vermutlich nimmt die Mutante in Abwesenheit von Glukose ^{13}C -markierte Substrate auf, die durch Abbau hauptsächlich zu $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Pyruvat führen (z. B. Glyzerin, Glyzerin-3-phosphat, Laktat oder Pyruvat). Jedoch war die Menge des $^{13}\text{C}_3$ -Ser Isotopologs hier deutlich stärker reduziert als die des $^{13}\text{C}_1$ - oder $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologs (Abb. 28A, farbige Balken). Daher stammt bei einem Mangel an Glukose das verbliebene *de novo* synthetisierte Ser vermutlich stärker von $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertem 3-Phosphoglycerat ab, das aus $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -PEP über die Umwandlung von $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA mittels des Glyoxylatzyklus und der PEP-Carboxykinase gebildet wird (Anhang 25). Das $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA wird vermutlich aus Laktat oder Pyruvat gebildet. Die Gly-Isotopologe können wiederum durch die Erzeugung aus den Ser-Isotopologen durch Eliminierung einer C_1 -Einheit erklärt werden. Auch bei dieser Mutante scheint keine *de novo* Synthese von Val mehr stattzufinden, da ^{13}C -markiertes Val nicht detektiert wurde (Abb. 28A). Die Deletion von *ptsG* alleine führte nicht zu einer verstärkten Bildung von $^{13}\text{C}_3$ -Ala und $^{13}\text{C}_3$ -Ser, wie es bei *EIEC* 4608-58 beobachtet wurde. Zudem wurden keine Unterschiede in der Isotopologenverteilung zwischen der $\Delta ptsG$ - und $\Delta manXYZ$ -Einfachmutante und dem Wildstamm gefunden (Anhang 18).

Bei *Stm* 14028s waren ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den ^{13}C -Isotopologengmustern dieser Aminosäuren aus Wildstamm und Mutante sichtbar. Bei Ala

reduzierte sich die Menge des $^{13}\text{C}_3$ -Isotopologs um etwa 50-70 % in der Mutante, aber die Mengen der weniger vorhandenen $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologe blieben nahezu unverändert (Abb. 28A, Anhang 21). Ebenso verringerte sich die Menge des $^{13}\text{C}_3$ -Ser Isotopologs sehr viel stärker als die des $^{13}\text{C}_1$ - oder $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologs (Abb. 28A, farbige Balken). Daraus läßt sich wie schon bei der *EIEC* HN280 Mutante schließen, daß die beiden letzteren aus $^{13}\text{C}_1$ - bzw. $^{13}\text{C}_2$ -markiertem 3-Phosphoglycerat erzeugt werden. Interessanterweise konnte bei der *Stm* 14028s Mutante ^{13}C -markiertes Val detektiert werden, jedoch war die Menge des $^{13}\text{C}_5$ -Isotopologs, das im Wildstamm überwog, wiederum deutlich stärker reduziert als die des $^{13}\text{C}_1$ -, $^{13}\text{C}_2$ -, $^{13}\text{C}_3$ - oder $^{13}\text{C}_4$ -Isotopologs (Abb. 28A, farbige Balken). Hieraus folgt ebenfalls, daß $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Pyruvat zusammen mit nicht markiertem an deren Synthese beteiligt ist und demzufolge auch die Erzeugung entsprechender PEP-Isotopologe durch Glukoneogenese stattfindet.

b. Aminosäuren, die von Zwischenprodukten des Citratzyklus abstammen und *de novo* synthetisiert wurden (Glu, Asp, Pro, Thr, Lys)

Wildstämme

Obwohl der ^{13}C -Einbau in Glu und damit dessen *de novo* Synthese bei den untersuchten Enterobakterien deutlich variierte (Abb. 29A, schwarze Balken), stellte $^{13}\text{C}_2$ -Glu die größte Isotopologenfraktion bei allen drei Stämmen dar, gefolgt von $^{13}\text{C}_4$ -Glu (Abb. 29A, gelbe und grüne Balken). $^{13}\text{C}_2$ -markiertes α -Ketoglutarat als unmittelbare Vorstufe von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Glu wird offensichtlich im Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA und unmarkiertem Oxalacetat erzeugt (Anhang 23). $^{13}\text{C}_4$ - α -Ketoglutarat als Vorstufe des $^{13}\text{C}_4$ -Glu Isotopologs könnte ebenfalls in einer zweiten Runde des Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat und $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA generiert werden. Aber in diesem Fall müßte ebenfalls eine gleiche Menge an $^{13}\text{C}_3$ -markiertem α -Ketoglutarat entstehen, weshalb dann auch die $^{13}\text{C}_3$ -Glu und $^{13}\text{C}_4$ -Glu Isotopologe in gleicher Menge hätten vorhanden sein müssen (Anhang 23), was aber nicht der Fall war. Ein Großteil des $^{13}\text{C}_4$ - α -Ketoglutarats als Vorstufe des $^{13}\text{C}_4$ -Glu Isotopologs muß daher im Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_3$ -Oxalacetat und $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA generiert werden (Anhang 24).

Tatsächlich stellte bei Asp, das unmittelbar aus Oxalacetat gebildet wird, das $^{13}\text{C}_3$ -markierte Isotopolog bei allen drei Wildstämmen die weitaus größte Fraktion dar, gefolgt vom $^{13}\text{C}_2$ -Asp Isotopolog (Abb. 29A, rote und gelbe Balken). Das letztgenannte Isotopolog entsteht vermutlich aus $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat, das wiederum im Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA und

unmarkiertem Oxalacetat erzeugt wird. $^{13}\text{C}_3$ -Oxalacetat könnte ebenfalls in einer zweiten Runde des Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat und $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA gebildet werden. Aber die deutlich höhere Menge an $^{13}\text{C}_3$ -Asp verglichen mit $^{13}\text{C}_2$ -Asp, die nach einer zweiten Runde eigentlich hätten gleich sein müssen (Anhang 23), begünstigt die hauptsächliche Bildung von $^{13}\text{C}_3$ -Asp aus $^{13}\text{C}_3$ -Oxalacetat, welches durch Carboxylierung von $^{13}\text{C}_3$ -PEP durch die PEP-Carboxylase generiert wird (Anhang 24).

Die offensichtlich vorherrschende Form von $^{13}\text{C}_3$ -markiertem PEP, das für diese Reaktion notwendig ist, kann durch den Abbau von [U- $^{13}\text{C}_3$]-Glukose in der Glykolyse und/oder dem Entner-Doudoroff-Weg erklärt werden. Auch $^{13}\text{C}_3$ -Glyzerin und $^{13}\text{C}_3$ -Glyzerin-3-phosphat kommen als Substrat in Betracht, aber keine Kohlenstoffquellen, aus denen überwiegend $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA erzeugt wird (z. B. Fettsäuren), da aus diesen über den Glyoxylatweg und die PEP-Carboxykinasereaktion kein $^{13}\text{C}_3$ -markiertes PEP synthetisiert werden kann (Anhang 25). $^{13}\text{C}_3$ -markiertes Pyruvat oder Laktat als wichtigste Quelle können aus dem gleichen Grund ausgeschlossen werden.

Pro wurde nicht bei *EIEC* 4608-58 WT, sondern nur bei *EIEC* HN280 WT und *Stm* 14028s WT in nennenswerten Mengen gefunden (Abb. 29A, schwarze Balken). Wie erwartet stimmten die ^{13}C -Isotopologienmuster von Pro mit denen überein, die bei Glu, der unmittelbaren Vorstufe, gefunden wurden (Abb. 29A, farbige Balken).

Asp bildet die Vorstufe zur Biosynthese von Thr und Lys. Beide Aminosäuren waren ebenfalls ^{13}C -markiert und wurden daher in signifikanten und reproduzierbaren Mengen in *EIEC* HN280 WT und *Stm* 14028s WT, aber nicht in *EIEC* 4608-58 WT *de novo* synthetisiert (Abb. 29A, schwarze Balken). Da das Kohlenstoffgerüst von Thr mit dem von Asp identisch ist, müßte das Isotopologienprofil von Thr ebenfalls mit dem von Asp übereinstimmen, was in der Tat bei beiden Stämmen der Fall war (Abb. 29A, farbige Balken).

Die Biosynthese von Lys folgt wie in den meisten Bakterien dem Diaminopimelinsäureweg und benötigt neben Asp zusätzlich noch Pyruvat bei gleichzeitigem Verlust eines C-Atoms von Pyruvat durch Decarboxylierung. Das Auftreten von $^{13}\text{C}_3$ - und $^{13}\text{C}_5$ -markiertem Lys als größte Fraktionen bei *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s (Abb. 29A, rote und violette Balken) stimmt daher mit deren Synthese aus $^{13}\text{C}_3$ -Asp, das häufigste ^{13}C -Asp Isotopolog, und unmarkiertem oder $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Pyruvat überein. Das seltener vertretene $^{13}\text{C}_2$ -Lys

Isotopolog könnte das Produkt aus $^{13}\text{C}_2$ -Asp und unmarkiertem Pyruvat oder unmarkiertem Asp und $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Pyruvat sein.

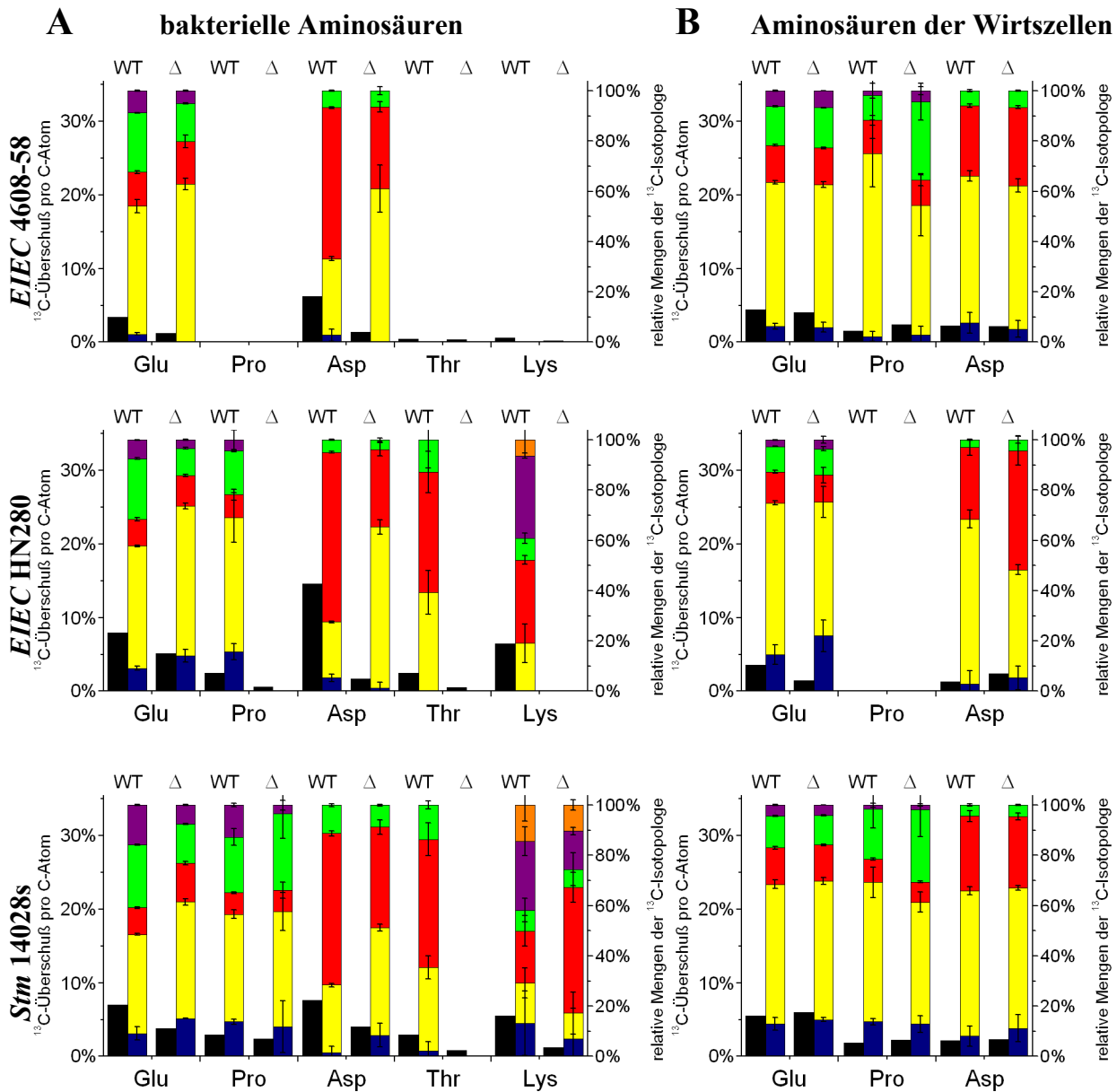


Abb. 29: ^{13}C -Einbau und ^{13}C -Isotopologenverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von *EIEC* 4608-58 (oben), *EIEC* HN280 (Mitte), *Stm* 14028s (unten) Wildstämmen (WT) und Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT*-Mutanten (A) sowie der Caco-2-Wirtszellen nach 6,5 bzw. 8,5 stündiger Infektion. (A) Aminosäuren, die aus den untersuchten Enterobakterien nach der Infektion isoliert wurden. (B) Aminosäuren, die aus den infizierten Caco-2-Zellen isoliert wurden. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an (s. auch Anhänge 16, 18 und 21).



ΔptsG, *manXYZ*, *uhpT*-Mutanten

Bei der Mutante von *EIEC* 4608-58, ging der im Vergleich zu *EIEC* HN280 niedrige ^{13}C -Einbau in Glu und Asp je nach Infektionsweise nur um 50-80 % zurück (Abb. 27 und 29A, schwarze Balken). Die ^{13}C -Isotopologenverteilung von Glu wies gleiche Mengen von

$^{13}\text{C}_3$ - und $^{13}\text{C}_4$ - sowie die doppelte Menge des $^{13}\text{C}_2$ -Glu Isotopologs auf (Abb. 29A, farbige Balken). Auch hier war die Zunahme der $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologe von Glu und Asp nicht so stark ausgeprägt wie bei extrazellulär gewachsenen Bakterien (s. Kapitel 4.5.6). Bei Asp wurde eine leicht höhere Menge des $^{13}\text{C}_2$ -Asp Isotopologs verglichen mit dem $^{13}\text{C}_3$ -Asp Isotopolog gefunden (Abb. 29A, farbige Balken). Die entsprechenden Vorstufen α -Ketoglutarat und Oxalacetat werden daher vermutlich in bis zu zwei Runden des Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetyl-CoA generiert (Anhang 23). Offensichtlich scheint bei der Mutante in Abwesenheit von Glukose die Carboxylierung von PEP nicht mehr in demselben Umfang stattzufinden wie im Wildstamm. Daher ist wahrscheinlich nicht Glukose-6-phosphat, das von dieser Mutante immer noch aufgenommen werden kann, sondern vielmehr Glyzerin oder Glyzerin-3-phosphat (siehe Ser) das alternative Kohlenstoffsubstrat für die intrazelluläre Replikation von *EIEC* 4608-58. Bei den *ptsG*-Mutanten stiegen wiederum die Mengen der $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologe von Glu und Asp deutlich an (Anhang 16).

Bei der *EIEC* HN280 $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante war der ^{13}C -Einbau in Glu, Asp, Pro, Thr und Lys im Vergleich zum Wildstamm je nach Infektionsweise um 50-90 % reduziert (Abb. 27 und 29A, schwarze Balken). Die ^{13}C -Isotopologemuster von Glu und Asp waren denen der *EIEC* 4608-58 Mutante sehr ähnlich (Abb. 29A, farbige Balken). Vermutlich werden ^{13}C -Glu und ^{13}C -Asp daher bei der Mutante von *EIEC* HN280 in ähnlichen Reaktionsschritten synthetisiert wie bei der Mutante des anderen Stammes, d. h. durch Einschleusen von $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA in bis zu zwei Runden des Citratzyklus (Anhang 23). Da der Anteil des $^{13}\text{C}_3$ -Asp Isotopologs im Vergleich zum Wildstamm ähnlich stark zurückging wie bei der entsprechenden Mutante aus *EIEC* 4608-58, scheint auch hier kein Oxalacetat mehr durch die Carboxylierung von PEP generiert zu werden. Auch hier war wiederum kein Unterschied zwischen der $\Delta ptsG$ - und der $\Delta manXYZ$ -Einfachmutante sowie dem Wildstamm zu erkennen (Anhang 18).

Bei *Stm* 14028s $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT* war der ^{13}C -Einbau in Glu, Pro und Asp um etwa 50-70 % reduziert, während er bei Thr und Lys um mehr als 70 % niedriger war als im Wildstamm (Abb. 27 und 29A, schwarze Balken). Das ^{13}C -Isotopologenprofil von Glu zeigte ebenfalls wieder gleiche Mengen an $^{13}\text{C}_3$ - und $^{13}\text{C}_4$ -Glu sowie $^{13}\text{C}_2$ -Glu als häufigstes Isotopolog (Abb. 29A, farbige Balken). Auch das Muster bei Asp glich dem der beiden *EIEC*-Stämme mit gleichen Mengen an $^{13}\text{C}_2$ - und $^{13}\text{C}_3$ -Asp und dem verhältnismäßig stärksten Rückgang bei $^{13}\text{C}_3$ -Asp (Abb. 29A, farbige Balken). Daher liegt es nahe, daß auch in dieser

Mutante die entsprechenden ^{13}C -markierten Vorstufen von α -Ketoglutarat und Oxalacetat in bis zu zwei Runden des Citratzyklus aus $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetyl-CoA generiert werden. Die größte ^{13}C -Isotopologenfraktion des nur schwach markierten Lysins war $^{13}\text{C}_3$ -Lys, wohingegen bei *Stm* 14028s WT mehr $^{13}\text{C}_5$ -Lys als $^{13}\text{C}_3$ -Lys erzeugt wurde (Abb. 29A, farbige Balken). Die hauptsächliche Bildung von $^{13}\text{C}_3$ -Lys könnte ebenfalls unter Beteiligung von $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Pyruvat zusammen mit den beiden häufigsten $^{13}\text{C}_2$ - und $^{13}\text{C}_3$ -Asp Isotopologen erfolgen.

c. Aminosäuren, die von Zwischenprodukten des Pentosephosphatzyklus abstammen und *de novo* synthetisiert wurden (His, Phe, Tyr)

Wildstämme

^{13}C -markiertes His wurde bei *EIEC* 4608-58 in sehr geringer und sowohl bei *EIEC* HN280 als auch bei *Stm* 14028s in etwas höherer, aber reproduzierbarer Menge synthetisiert (Abb. 27 und 30, schwarze Balken). Das $^{13}\text{C}_5$ -His Isotopolog war dabei stets am häufigsten vertreten (Abb. 30, violette Balken). Die Synthese von His benötigt Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), das im Pentosephosphatzyklus erzeugt wird, und ATP, das ein C-Atom sowie die zwei N-Atome zum Imidazolring von His beisteuert. Daher ist das $^{13}\text{C}_5$ -His Isotopolog vermutlich das Produkt aus unmarkiertem ATP und $^{13}\text{C}_5$ -markiertem PRPP. Das Auftreten von $^{13}\text{C}_5$ -markiertem PRPP setzt dessen direkte Synthese aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose im Pentosephosphatzyklus voraus, woraus sich wiederum Glukose als wichtigste Kohlenstoffquelle bei allen drei Stämmen ableiten läßt.

Neben $^{13}\text{C}_5$ -His traten aber noch kleinere Mengen weiterer ^{13}C -Isotopologe auf, die sich aber zwischen den drei Enterobakterien unterschieden. Bei *EIEC* 4608-58 wurde noch ein zusätzliches $^{13}\text{C}_2$ -His Isotopolog gefunden (Abb. 30, gelbe Balken). Die $^{13}\text{C}_2$ -Markierung kann dabei nur aus $^{13}\text{C}_2$ -markiertem PRPP stammen, was wiederum darauf hindeutet, daß ein Teil des PRPP in *EIEC* 4608-58 nicht direkt von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose abstammt, sondern vielmehr aus Glukose generiert wird, die über Glukoneogenese aus einem $^{13}\text{C}_3$ -Substrat erzeugt wurde. Die in manchen Versuchen gleichen Mengen der $^{13}\text{C}_5$ - und $^{13}\text{C}_2$ -His Isotopologe können ein weiterer Hinweis darauf sein, daß *EIEC* 4608-58 neben Glukose zusätzlich C_3 -Substrate, wahrscheinlich Glyzerin, aber nicht Glukose-6-phosphat während der intrazellulären Replikation verwertet.

Das Auftreten des $^{13}\text{C}_6$ -His Isotopologs in *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s (Abb. 30, orange Balken) deutet darauf hin, daß das zusätzliche ^{13}C -Atom aus ebenfalls ^{13}C -markiertem ATP stammt, und spiegelt die *de novo* Synthese von Purinen in diesen beiden intrazellulären

Enterobakterien wieder. Diese scheint jedoch bei *Stm* 14028s stärker abzulaufen als bei *EIEC* HN280.

Während bei *EIEC* 4608-58 keine reproduzierbare ^{13}C -Markierung von Phe oder Tyr beobachtet werden konnte, waren beide Aminosäuren bei *EIEC* HN280 in geringer, aber reproduzierbarer Menge ^{13}C -markiert (Abb. 30, schwarze Balken). Bei *Stm* 14028s war lediglich Phe, aber nicht Tyr ähnlich gut ^{13}C -markiert wie in *EIEC* HN280 (Abb. 30, schwarze Balken). Die häufigsten Isotopologe waren in beiden Stämmen $^{13}\text{C}_9$ -Phe bzw. $^{13}\text{C}_9$ -Tyr (Abb. 30, hellblaue Balken). Diese werden wahrscheinlich aus zwei Molekülen $^{13}\text{C}_3$ -PEP und einem Molekül $^{13}\text{C}_4$ -Erythrose-4-phosphat unter Verlust eines ^{13}C -Atoms durch Decarboxylierung synthetisiert. $^{13}\text{C}_4$ -Erythrose-4-phosphat kann wiederum nur direkt aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose erzeugt werden, was erneut für Glukose als wichtigste Kohlenstoffquelle für *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s spricht.

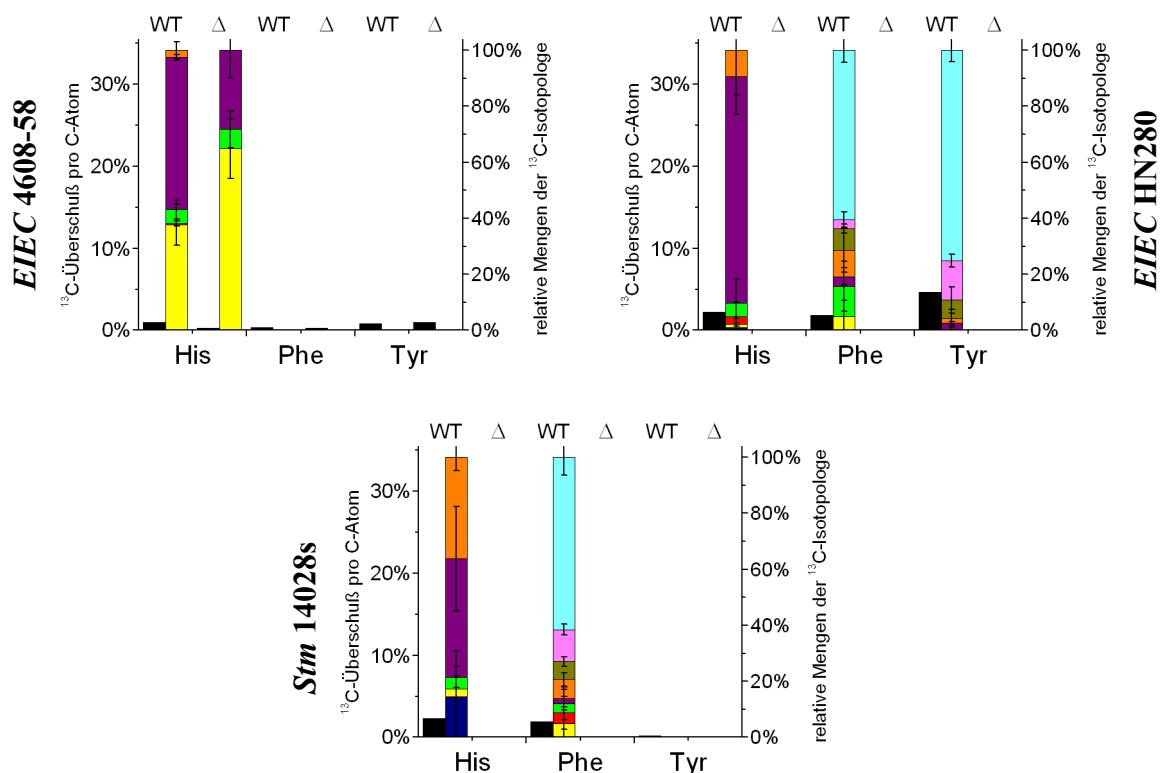


Abb. 30: ^{13}C -Einbau und ^{13}C -Isotopologenverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von *EIEC* 4608-58 (oben links), *EIEC* HN280 (oben rechts) und *Stm* 14028s (unten Mitte) Wildstämme (WT) und Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT*-Mutanten (Δ) nach 6,5 bzw. 8,5 stündiger Infektion von Caco-2-Zellen. Da in den Aminosäurefraktionen der Caco-2-Wirtszellen weder markiertes His, Phe noch Tyr nachgewiesen werden konnte, wurde auf deren Darstellung verzichtet. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an (s. auch Anhänge 16, 18 und 21).



ΔptsG, manXYZ, uhpT-Mutanten

Ein signifikanter ^{13}C -Einbau in His, Phe oder Tyr wurde bei keiner der drei untersuchten enterobakteriellen *ΔptsG, manXYZ, uhpT*-Mutanten gefunden (Abb. 30). Möglicherweise werden diese Aminosäuren bei einem Mangel an Glukose nicht *de novo* synthetisiert oder es fehlt an genügend ^{13}C -markierten Zwischenprodukten aus dem Pentosephosphatzyklus. Letzteres könnte eintreten, wenn die Erzeugung von Glukose durch Glukoneogenese nur mit unmarkierten oder schwach ^{13}C -markierten Kohlenstoffquellen bewerkstelligt wird, solange keine [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose aufgenommen werden kann. Lediglich die *ptsG*-Mutanten von *EIEC* 4608-58 zeigten deutliche Erhöhung beim $^{13}\text{C}_5$ -Isotopolog von His, aber nicht bei Phe oder Tyr. Bei der ebenfalls invasiveren *ΔmanXYZ, uhpT*-Mutante dieses Stammes konnte dies aber nicht beobachtet werden (Anhang 16).

4.5.4 Bei schneller proliferierenden Caco-2-Zellen zeigt sich ein höherer ^{13}C -Einbau in Aminosäuren der Wirtszellen und der intrazellulären bakteriellen Wildstämme, aber nur teilweise in Aminosäuren der *ΔptsG, manXYZ, uhpT*-Mutanten

Bei Infektion eines weniger dicht gewachsenen, nur zu 60 % konfluenten Monolayers von Caco-2-Zellen war der ^{13}C -Einbau in *de novo* synthetisierte Aminosäuren der Caco-2-Wirtszellen und der intrazellulär replizierenden *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s Wildstämme deutlich erhöht. Dieser erhöhte ^{13}C -Überschuß pro C-Atom wurde jedoch nur teilweise bei den entsprechenden *ΔptsG, manXYZ, uhpT*-Mutanten (insbesondere von *EIEC* HN280) beobachtet (Abb. 27, Spalten i, j, u und v; sowie Abb. 31A und 32A, schwarze Balken). Der Grund für diese höhere Markierung mit ^{13}C -Atomen ist vermutlich eine gesteigerte [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukoseaufnahme der proliferierenden Caco-2-Zellen, die zu einer ebenfalls gesteigerten Aufnahme markierter Glukose durch die Bakterien führt. Infolgedessen steigt auch der ^{13}C -Einbau in die Aminosäuren der Wirtszellen (Abb. 27, Spalten o, p, α und β) und der bakteriellen Wildstämme deutlich (vgl. Abb. 27, Spalten e und i sowie q und u). Weiterhin nimmt vermutlich auch die Menge an $^{13}\text{C}_3$ -Substraten in der Wirtszelle zu (Metallo *et al.*, 2009), so daß teilweise auch die *ΔptsG, manXYZ, uhpT*-Mutanten einen leicht höheren ^{13}C -Einbau zeigen (vgl. Abb. 27, Spalten f und j sowie r und v). Diese Beobachtung kann ein weiterer Beleg dafür sein, daß Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die intrazellulär replizierenden *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s Wildstämme, aber nicht ihrer *ΔptsG, manXYZ, uhpT*-Mutanten darstellt. Diese Vermutung wird weiterhin dadurch gestützt, daß insbesondere die Mengen jener ^{13}C -Isotopologe, die von direkt aus [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose hergestellten Vorstufen abstammen (z. B. $^{13}\text{C}_5$ -His, $^{13}\text{C}_9$ -Phe, $^{13}\text{C}_9$ -Tyr), in beiden

Wildstämmen erhöht waren (Abb. 31A und 32A, farbige Balken). Dagegen waren die weniger häufigen ^{13}C -Isotopologenfractionen, die vermutlich aus glukoneogenetischen Substraten gebildet werden, nicht oder nur geringfügig erhöht (z. B. Ser und Val).

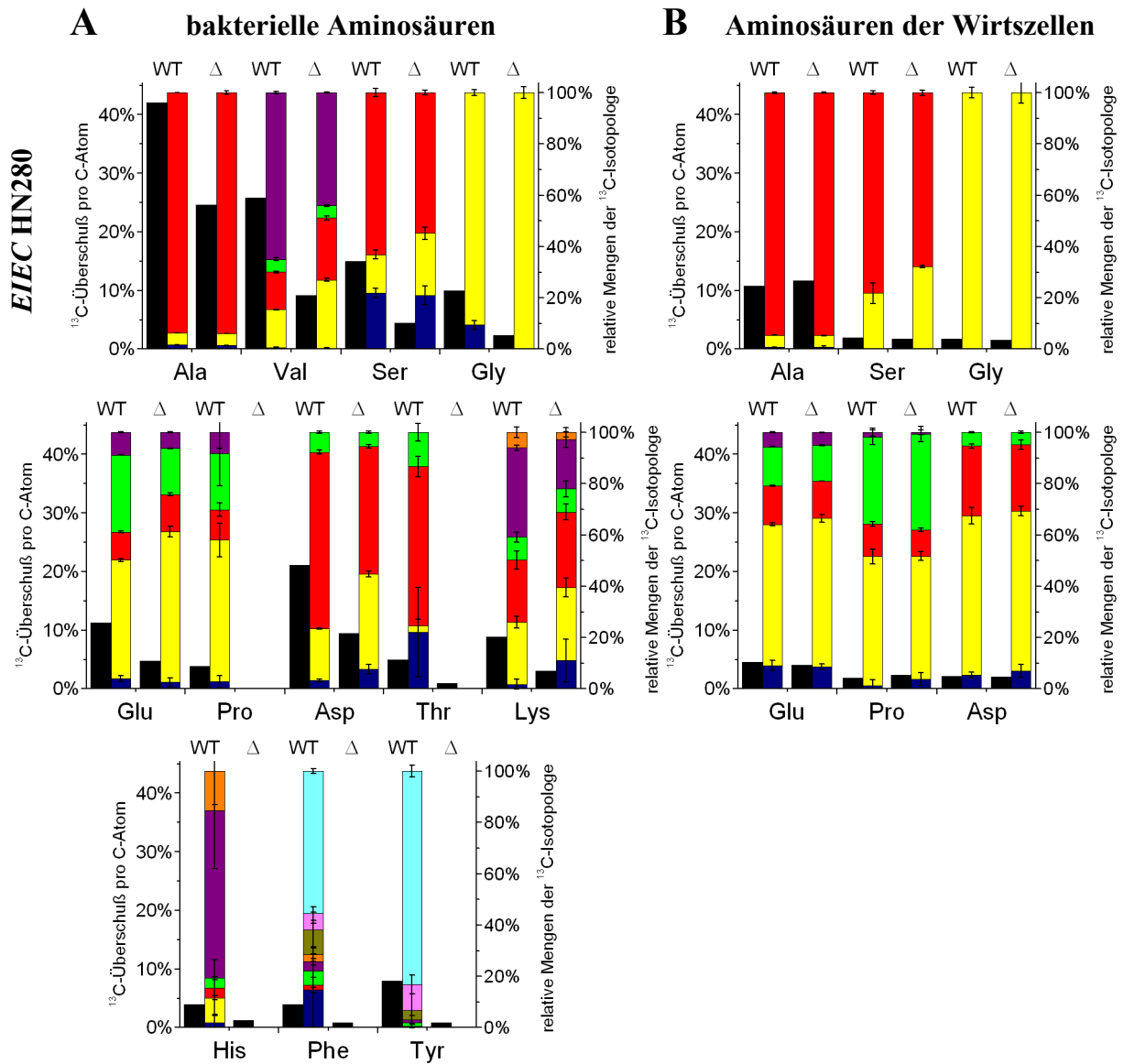


Abb. 31: ^{13}C -Einbau und ^{13}C -Isotopologenverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von *EIEC* HN280 Wildstamm (WT) und Δ *ptsG*, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante (Δ) sowie der schnell proliferierenden Caco-2-Wirtszellen nach 6,5 stündiger Infektion. (A) Aminosäuren, die aus den untersuchten Enterobakterien nach der Infektion isoliert wurden. (B) Aminosäuren, die aus den infizierten Caco-2-Zellen isoliert wurden. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an (s. auch Anhang 19).



Aminosäuren war jedoch unmarkiert. Die unmarkierten Aminosäuren in den Proteinen der Bakterien könnten aus dem Kulturmedium stammen, wenn die von der Wirtszelle aufgenommenen Aminosäuren an die intrazellulären Bakterien weitergereicht werden. Zudem könnten sie auch aus dem proteolytischen turn-over von Proteinen der Wirtszelle stammen oder aus unmarkierten C-Quellen synthetisiert worden sein. Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, welche Aminosäuren von nicht infizierten Caco-2-Zellen innerhalb eines 6 bzw. 8 stündigen Wachstums in Gegenwart von 10 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose *de novo* synthetisiert werden.

Bei Betrachtung der ^{13}C -Anreicherung pro C-Atom und der ^{13}C -Isotopologenverteilung in den Aminosäuren der Wirtszelle lassen sich Rückschlüsse auf folgende Fragen ziehen:

- I. Welche Aminosäuren werden *de novo* von der Wirtszelle aus [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose synthetisiert und könnten möglicherweise direkt in markierter Form von den Bakterien aufgenommen werden? In diesem Zusammenhang soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß das Kulturmedium alle Aminosäuren mit Ausnahme von Ala in unmarkierter Form mit Konzentrationen von 0,1-2 mM enthält.
- II. Beeinflußt die Infektion durch die intrazellulären Bakterien den Wirtszell-eigenen Kohlenstoffmetabolismus?
- III. Stehen die Aminosäuren der Wirtszelle als anabole Monomere zytoplasmatisch und phagosomal replizierenden Bakterien gleichermaßen zur Verfügung?

Ähnlich wie infizierte Caco-2-Zellen bauten nicht infizierte Caco-2-Zellen die ^{13}C -Markierung aus [U- $^{13}\text{C}_6$]-Glukose nach 6-8 h lediglich in die sechs nicht essentiellen Aminosäuren in der Reihenfolge Ala (11-15%) > Glu (4-6%) > Asp (3-4%) > Ser > Gly > Pro ein (Abb. 33, schwarze Balken; Anhang 11). Die Effizienz des Einbaus war teilweise weitaus geringer als bei den intrazellulären Bakterien, unterschied sich aber nicht von der infizierter Zellen (vergleiche hierzu Abb. 28B und 29B, schwarze Balken). Von den genannten Aminosäuren entstehen Ala, Glu, Asp und Ser direkt aus Zwischenprodukten der Glykolyse bzw. des Citratzyklus, während es sich bei Gly und Pro um Derivate von Ser bzw. Glu handelt. Die große Menge an *de novo* synthetisiertem Ala ist vermutlich durch das Fehlen dieser Aminosäure im Kulturmedium begründet, wohingegen alle anderen Aminosäuren vorhanden waren.

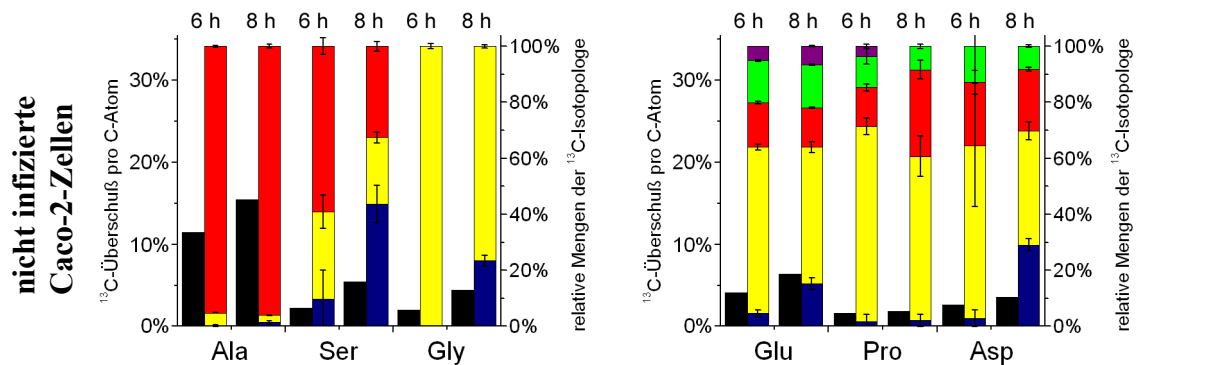


Abb. 33: ^{13}C -Überschuß und ^{13}C -Isotopologeverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von nicht infizierten Caco-2-Zellen nach 6 bzw. 8 stündiger Markierung mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{-Glukose}$. Die Markierung und anschließende Aufarbeitung der Aminosäuren wurden, wie bei den Methoden unter 3.4.10 beschrieben, durchgeführt. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an. Nach 8 h sind etwas mehr Aminosäuren in den Zellen markiert als nach 6 h. Andere markierte Aminosäuren als die hier dargestellten wurden in nicht infizierten Caco-2-Zellen nicht gefunden (s. auch Anhang 11).



Nicht nur die Rate des ^{13}C -Einbaus, sondern auch das Verteilungsmuster der ^{13}C -Isotopologe bei diesen Aminosäuren veränderte sich durch die Infektion nicht wesentlich (vgl. Abb. 33 mit Abb. 28B und 29B, farbige Balken). Auch unterschieden sich die Verteilungsprofile der Aminosäuren aus den Wirtszellen deutlich von denen der entsprechenden Aminosäuren aus den isolierten Bakterien, was auf eine gute Trennung von Wirtszellen und Bakterien während der Aufreinigung hindeutet (vergleiche hierzu Abb. 28 und 29, farbige Balken). Die ^{13}C -Isotopologeverteilung bei den Aminosäuren der Wirtszellen stimmt zudem mit der Annahme überein, daß die aufgenommene $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{-Glukose}$ überwiegend durch Glykolyse und Citratzyklus katabolisiert wird. Dies läßt sich daraus erkennen, daß $^{13}\text{C}_3\text{-Ala}$, $^{13}\text{C}_2\text{-Glu}$ und $^{13}\text{C}_2\text{-Asp}$ jeweils die häufigsten ^{13}C -Isotopologe darstellten. Das zusätzliche Auftreten gleicher Mengen der $^{13}\text{C}_3\text{-}$ und $^{13}\text{C}_4\text{-Glu}$ Isotopologe sowie von $^{13}\text{C}_3\text{-Asp}$ läßt vermuten, daß der Citratzyklus der Wirtszellen während des Infektionszeitraums etwa zwei Runden durchläuft (Abb. 33, farbige Balken; Anhänge 11 und 23). Zusammengenommen unterstützt dies die Annahme, daß die Infektion mit einem der hier untersuchten Pathogene die Aufnahme von Glukose oder den metabolischen Fluß durch Glykolyse und Citratzyklus der Wirtszelle nicht signifikant beeinflusst.

Zur Beantwortung der dritten Frage, inwiefern Aminosäuren aus der Wirtszelle den intrazellulären Bakterien zur Verfügung stehen, wurde die Aufnahme von Aminosäuren, die von der Wirtszelle synthetisiert wurden, durch die Bakterien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Aminosäuren der Wirtszellen vor der Infektion mit ^{13}C vormarkiert, indem die Caco-2-Zellen permanent in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{-Glukose}$

kultiviert wurden. Die ^{13}C -markierten Zellen wurden dann in Gegenwart von nicht markierter Glukose mit den beiden *EIEC*-Wildstämmen und *Stm* 14028s WT sowie den entsprechenden ΔptsG , *manXYZ*, *uhpT*-Mutanten infiziert.

Bei allen drei Pathogenen wurden nur jene sechs Aminosäuren - Ala, Glu, Asp, Ser, Gly und Pro - in markierter Form gefunden, die auch bei den Wirtszellen eine deutliche ^{13}C -Anreicherung zeigten (Abb. 34A und B, schwarze Balken). Weiterhin waren die ^{13}C -Signaturen von den aus den Bakterien isolierten Aminosäuren identisch mit denen aus den Wirtszellen (Abb. 34A und B, farbige Balken). Folglich werden diese Aminosäuren von den Bakterien direkt aus der Wirtszelle aufgenommen und ohne signifikante katabole Veränderung zur Synthese bakterieller Proteine verwendet. Die Menge an aufgenommenen Aminosäuren zeigte jedoch deutliche Stamm-spezifische Unterschiede. Die meisten Aminosäuren wurden von *EIEC* 4608-58 WT aufgenommen, die wenigsten von *EIEC* HN280 WT (Abb. 34A, schwarze Balken; Anhänge 12-15). Die Aufnahmeraten an Aminosäuren waren bei der ΔptsG , *manXYZ*, *uhpT*-Mutante von *EIEC* 4608-58 annähernd identisch mit der des entsprechenden Wildstammes, während sie bei der Mutante von *EIEC* HN280 erheblich höher waren als beim entsprechenden Wildstamm. Die Menge an aufgenommenen Aminosäuren durch *Stm* 14028s WT bewegte sich zwischen denen der beiden *EIEC*-Wildstämme, während bei *Stm* 14028s ΔptsG , *manXYZ*, *uhpT* im Gegensatz zu *EIEC* HN280 ein weitaus geringerer Anstieg bei der Aufnahme von Aminosäuren aus der Wirtszelle im Vergleich zum entsprechenden Wildstamm festgestellt wurde. Zusammenfassend zeigen diese Resultate, daß

- I. sowohl zytoplasmatisch wie auch phagosomal replizierende Bakterien Zugang zu Aminosäuren besitzen, die von der Wirtszelle synthetisiert wurden,
- II. sich die Menge an aufgenommenen, von der Wirtszelle stammenden Aminosäuren bei den drei intrazellulär replizierenden Enterobakterien umgekehrt zur Menge der von diesen Bakterien *de novo* synthetisierten Aminosäuren verhält.

A bakterielle Aminosäuren nach der Infektion vormarkierter Zellen

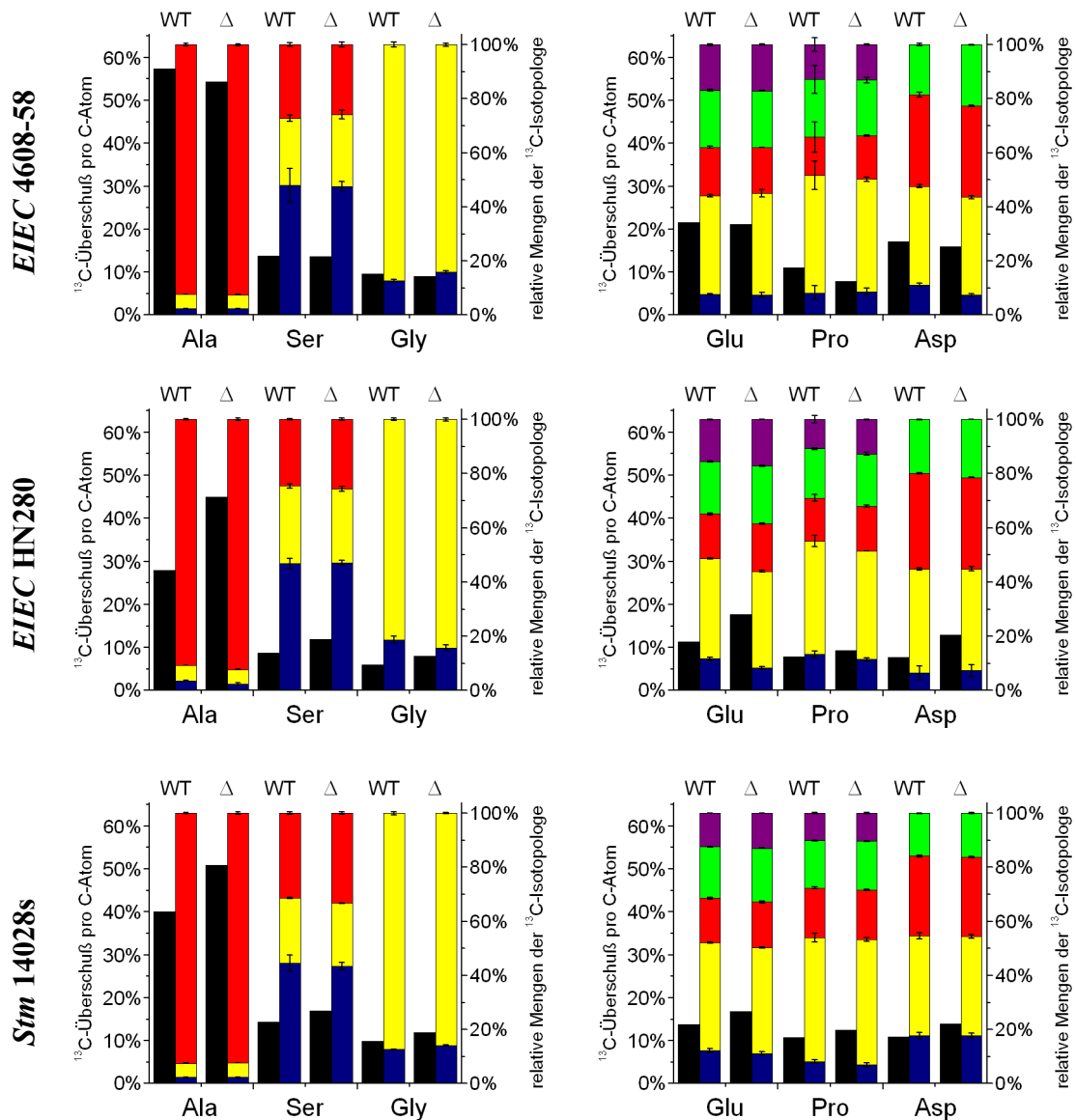
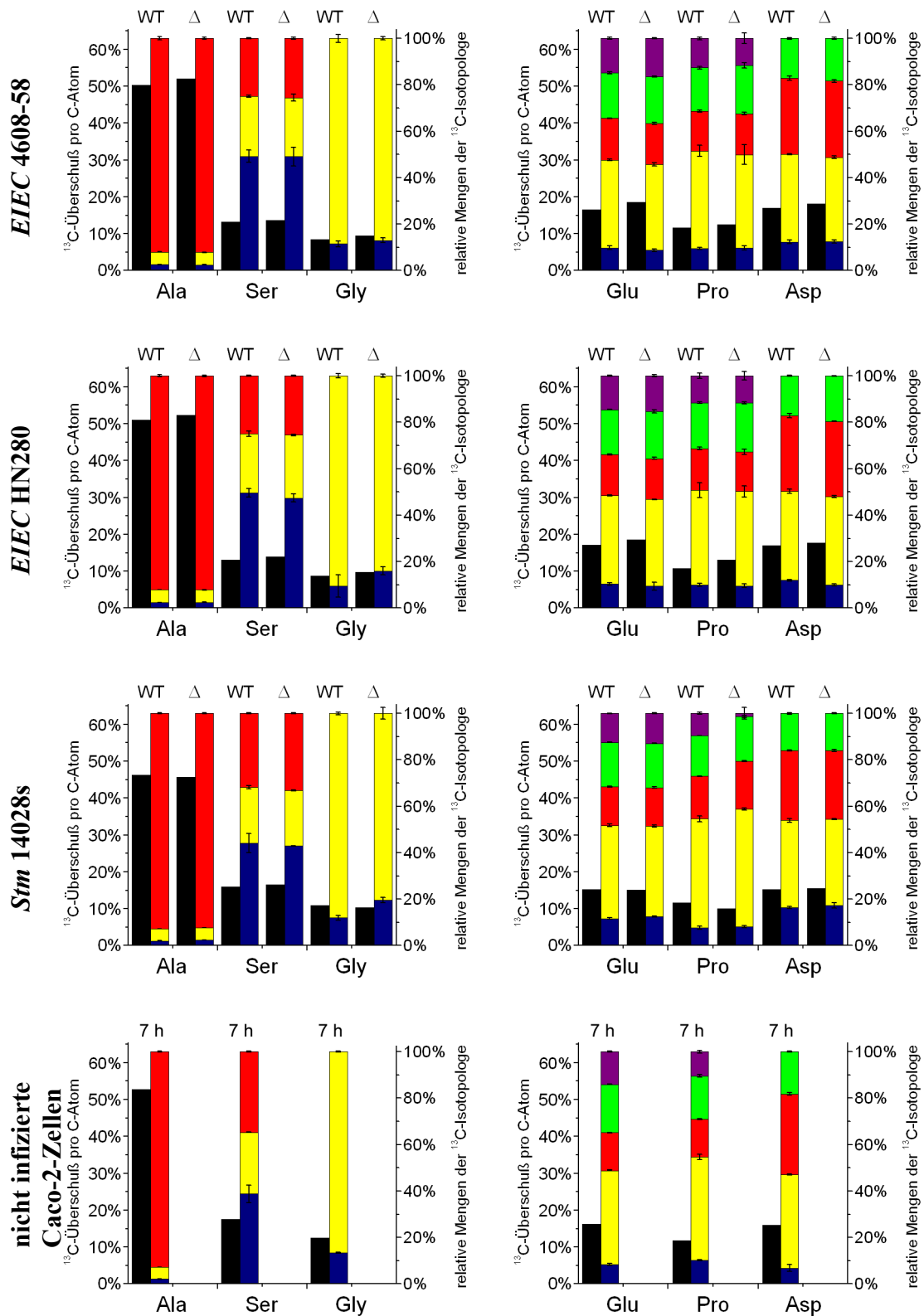


Abb. 34: Aufnahme ¹³C-markierter Aminosäuren durch die Bakterien während der Infektion von Caco-2-Zellen. Zur Markierung der *de novo* synthetisierten, wirtszelleigenen Aminosäuren wurden Caco-2-Zellen permanent in Gegenwart von [U-¹³C₆]-Glukose kultiviert. Um die Aufnahme dieser Aminosäuren durch die Bakterien zu verfolgen, wurden die Zellen anschließend in Gegenwart von unmarkierter Glukose infiziert. (A) Aminosäuren, die aus den untersuchten Enterobakterien nach der Infektion isoliert wurden. (B, s. nächste Seite) Aminosäuren, die aus den infizierten oder aus nicht infizierten Caco-2-Zellen isoliert wurden. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologie als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an. Die Isotopologenverteilung bei den einzelnen Aminosäuren unterscheidet sich nicht zwischen den Bakterien (A) und den Wirtszellen (B, s. nächste Seite). Andere markierte Aminosäuren als die hier und umseitig dargestellten wurden nicht gefunden (s. Anhänge 12-15).

- M + 9
- M + 8
- M + 7
- M + 6
- M + 5
- M + 4
- M + 3
- M + 2
- M + 1

B Aminosäuren aus den (nicht) infizierten, vormarkierten Caco-2-Zellen



4.5.6 Einbau der ^{13}C -Markierung aus Glukose in Aminosäuren während des extrazellulären Wachstums der Bakterien im RPMI Medium

Da RPMI 1640 bis auf Ala alle Aminosäuren enthält, wurde zusätzlich untersucht, ob und welche Aminosäuren von den Wildstämmen und von diesen abgeleiteten Mutanten während des Wachstums in RPMI 1640 *de novo* synthetisiert werden. Nach sechsständigem extrazellulärem Wachstum in RPMI mit 10 % FCS und 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre ohne Schütteln war bei beiden *EIEC*-Wildstämmen die Einbaurate und die Verteilung der ^{13}C -Markierung nahezu identisch. Wie erwartet war ^{13}C -Ala mit einem mittleren ^{13}C -Überschuß pro C-Atom von etwa 58 % die am stärksten markierte Aminosäure, gefolgt von Ser (44%)>Gly (22%)>Asp (16%)>Val (8%)>Glu (6%). ^{13}C -His wurde lediglich bei *EIEC* 4608-58 in größerer Menge (6%) gefunden, jedoch nicht bei *EIEC* HN280. Lys war in beiden Stämmen nur geringfügig markiert (1 %), während eine Markierung von Leu, Pro, Thr, Ile, Phe und Tyr kaum nachweisbar war (Abb. 35, schwarze Balken auf der linken Ordinate; Anhang 10).

Die Isotopologenverteilung zeigte, daß bei Asp das $^{13}\text{C}_3$ -Isotopolog die weitaus größte Fraktion darstellte und bei Glu die Fraktion des $^{13}\text{C}_4$ -Isotopologs deutlich größer war als die des $^{13}\text{C}_3$ -Isotopologs. Dies deutet auf einen Abbau der Glukose durch Glykolyse, Pentosephosphatzyklus und Citratzyklus hin, wobei letzterer überwiegend durch Carboxylierung von $^{13}\text{C}_3$ -PEP wieder aufgefüllt wird (Abb. 35, farbige Balken; Anhänge 10 und 24). Die ^{13}C -Isotopologenverteilung bei His aus *EIEC* 4608-58 wiederum wies das $^{13}\text{C}_5$ -Isotopolog als häufigstes Derivat aus, gefolgt vom $^{13}\text{C}_6$ -Isotopolog, was auf eine $^{13}\text{C}_5$ -markierte Vorstufe, wahrscheinlich $^{13}\text{C}_5$ -Phosphoribosylpyrophosphat, und markiertes ATP hindeutet. Bei Ala, Ser und Val stellte jeweils das $^{13}\text{C}_3$ - bzw. $^{13}\text{C}_5$ -Isotopolog die größte Fraktion dar, was das Vorhandensein entsprechend markierter Vorstufen, Pyruvat bzw. 3-Phosphoglycerat, vermuten läßt. Beide können in der Glykolyse oder dem Pentosephosphatzyklus gebildet werden.

Bei den $\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$, $\Delta uhpT$ -Mutanten der beiden *EIEC*-Stämme (Δ) ging der ^{13}C -Überschuß pro C-Atom wie erwartet signifikant auf unter 10 % bei allen untersuchten Aminosäuren zurück, da außer $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose keine weitere ^{13}C -markierte Kohlenstoffquelle zugegeben wurde. Unter den verbliebenen Aminosäuren nahm insbesondere der Anteil an $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologen deutlich zu. Dies zeigte sich vor allem bei Ala, Ser, Gly, Glu und Asp, während Val kaum noch nachweisbar war (Abb. 35; Anhang 10).

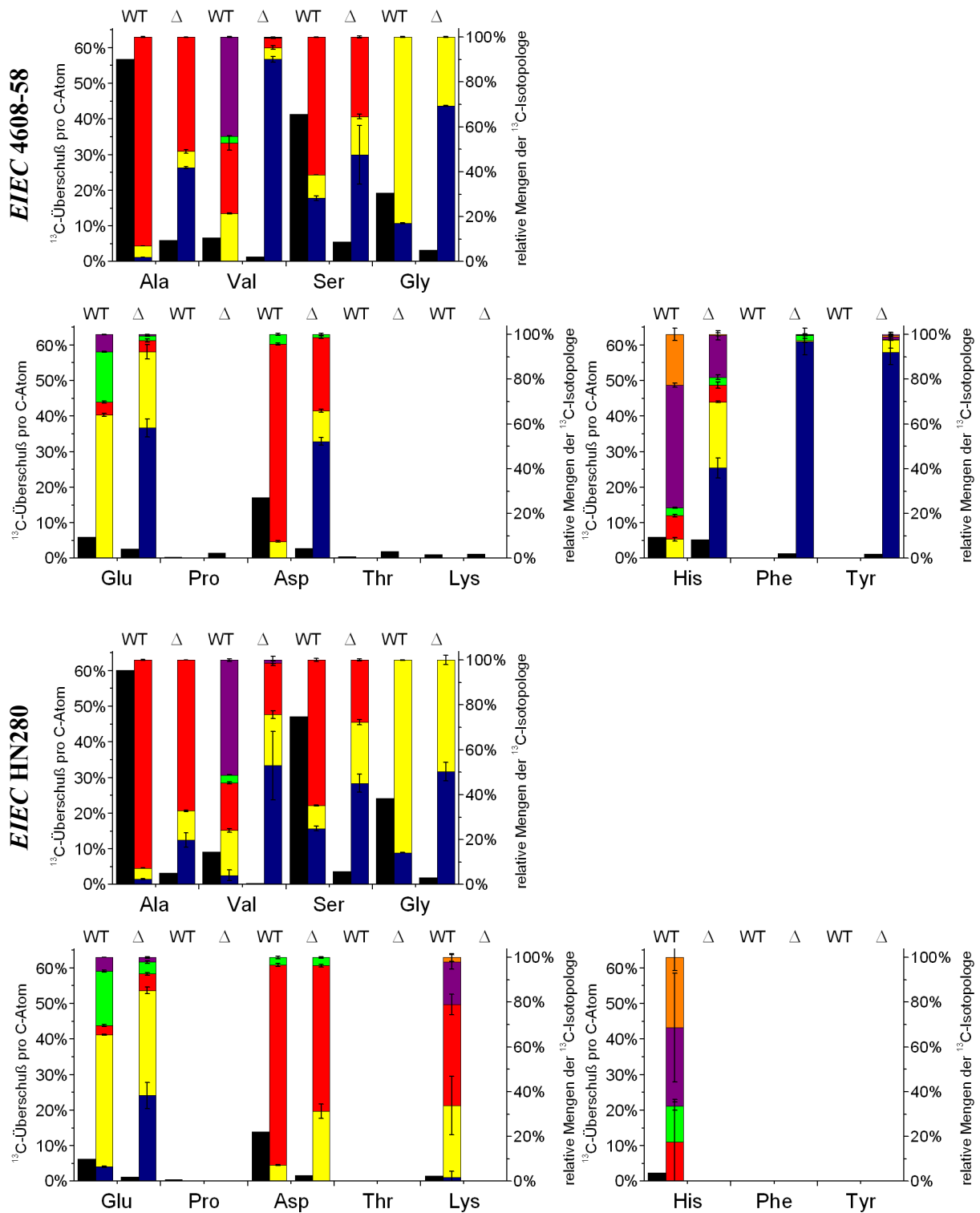


Abb. 35: ^{13}C -Einbau und ^{13}C -Isotopologenverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von *EIEC* 4608-58 (A) und *EIEC* HN280 (B) Wildstämme (WT) und ΔptsG , manXYZ , uhpT -Mutanten (Δ) nach extrazellulärem Wachstum in RPMI mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose. Die Bakterien wurden 6 h in RPMI 1640 mit 10% FCS und 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose ohne Schütteln im Zellkulturbrutschrank inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet und gereinigt. Die Aminosäuren wurden, wie bei den Methoden unter 3.4.10 beschrieben, analysiert. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an (s. auch Anhang 10).



Insgesamt waren die Aminosäuren der *EIEC* 4608-58 Mutanten noch etwas stärker markiert als die von *EIEC* HN280 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante bei einer Konzentration von 10 mM immer noch etwas Glukose aufnehmen konnte.

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für *Stm* 14028s. Auch hier war beim Wildtyp ^{13}C -Ala mit etwa 65 % die am stärksten markierte Aminosäure, gefolgt von Ser (57 %) > Gly (29 %) > Val (8 %) > Asp (4 %) = Glu (4 %). His zeigte einen 4%igen und Lys einen 1%igen ^{13}C -Überschuß pro C-Atom. Bei den übrigen Aminosäuren Leu, Pro, Thr, Ile, Phe und Tyr wurde wiederum keine signifikante ^{13}C -Markierung gefunden. Auch hier weist die Isotopologenverteilung auf einen Abbau der Glukose durch Glykolyse, Pentosephosphatzyklus und Citratzyklus mit der Carboxylierung von $^{13}\text{C}_3$ -PEP zur Wiederauffüllung hin (Abb. 36, schwarze Balken; Anhänge 10 und 24).

Durch die Deletion von $ptsG$, $manXYZ$ und $uhpT$ bei *Stm* 14028s konnte ein ähnlich starker Rückgang des ^{13}C -Einbaus erzielt werden wie bei den *EIEC*-Stämmen, jedoch nahm nur der $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologenanteil von Ser und Gly in gleichem Umfang zu. Bei Ala veränderte sich die Isotopologenverteilung hingegen kaum (Abb. 36; Anhang 10). ^{13}C -markiertes Val, Glu und Asp waren nicht mehr nachweisbar.

Alle Mutanten verwerten vermutlich hauptsächlich Aminosäuren als Kohlenstoffquellen und sind daher auf Glukoneogenese angewiesen. Da nur wenig Ala im Medium vorhanden sein sollte (die Konzentration von Ala im FCS ist unbekannt), muß Ala über Transaminierung von Pyruvat synthetisiert werden. Der deutliche Anstieg der $^{13}\text{C}_1$ -Markierung insbesondere bei Ala, Val, Ser, Gly und Glu aus den *EIEC*-Mutanten könnte ein Hinweis auf den Abbau kleiner Mengen an $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose zu $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA sein. Daraus kann im Glyoxylatzyklus und durch die PEP-Carboxykinase-Reaktion $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertes PEP erzeugt werden. Dieses ^{13}C -markierte PEP kann entweder in der Glukoneogenese zu $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertem 3-Phosphoglycerat oder durch die Pyruvatkinase in $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Pyruvat umgewandelt werden. Aus dem markierten 3-Phosphoglycerat oder dem markierten Pyruvat können wiederum die entsprechend markierten $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -Isotopologe von Ser und Gly bzw. Ala synthetisiert werden (Anhang 25). Es ist aber auch möglich, daß durch Decarboxylierung der beiden $^{13}\text{C}_1$ - und $^{13}\text{C}_2$ -markierten Pyruvat-Isotopologe $^{13}\text{C}_1$ -Acetyl-CoA gebildet wird, das erneut zusammen mit unmarkiertem Oxalacetat in den Citrat- oder Glyoxylatzyklus eingeschleust wird (Fischer and Sauer, 2003). Unmarkiertes Oxalacetat könnte durch die Aufnahme und den Abbau von Glutamin aus dem Kulturmedium

generiert werden. Als Folge würden verstärkt die $^{13}\text{C}_1$ -Isotopologe von Ala, Val, Ser, Gly und Glu synthetisiert werden.

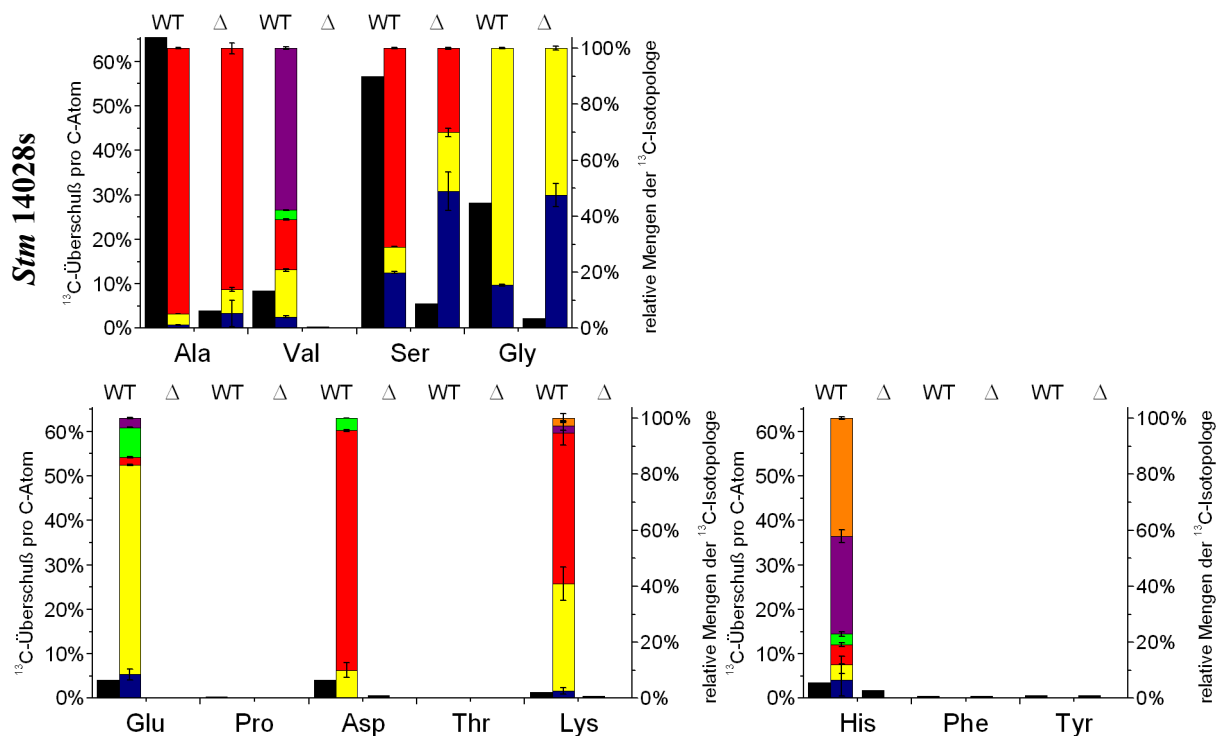


Abb. 36: ^{13}C -Einbau und ^{13}C -Isotopologenverteilung in *de novo* synthetisierten Aminosäuren von *Stm* 14028s Wildstamm (WT) und $\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$, $\Delta uhpT$ -Mutante (Δ) nach extrazellulärem Wachstum in RPMI mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose. Die Bakterien wurden 8 h in RPMI 1640 mit 10 % FCS und 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose ohne Schütteln im Zellkulturbrutschrank inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet und gereinigt. Die Aminosäuren wurden, wie bei den Methoden unter 3.4.10 beschrieben, analysiert. Auf der linken Ordinate ist der mittlere ^{13}C -Überschuß pro C-Atom in mol% (schwarze Balken) aufgetragen. Auf der rechten Ordinate ist die Verteilung der einzelnen Isotopologe als Prozentsatz der markierten Aminosäuren angegeben (farbige Balken). Die Farben geben die Anzahl der markierten C-Atome von M + 1 bis M + 9 an (s. auch Anhang 10).

Im Gegensatz zu den aus Caco-2-Zellen isolierten Bakterien wiesen bei den extrazellulär gewachsenen Wildstämmen weder Pro, Phe noch Tyr nennenswerte ^{13}C -Markierungen auf. Diese Aminosäuren werden während des extrazellulären Wachstums offensichtlich direkt aus dem Kulturmedium aufgenommen. Daraus läßt sich schließen, daß kein extrazelluläres Wachstum der Bakterien während der Dauer der Infektionsexperimente stattgefunden hat. Weiterhin unterschied sich bei den extrazellulär gewachsenen $\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$, $\Delta uhpT$ -Mutanten das ^{13}C -Isotopologemuster von Ala, Val, Gly und Glu im Vergleich zu den Aminosäuren, die aus den Mutanten nach der Infektion von Caco-2-Zellen isoliert wurden, deutlich. Dies kann ein weiterer Beleg dafür sein, daß den Glc/Glc6P-Aufnahmemutanten intrazellulär eine alternative ^{13}C -markierte Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit von fakultativ intrazellulären Enterobakterien, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und enteroinvasive *E. coli* Stämme, untersucht, im Zytoplasma bzw. im phagosomalen Kompartiment von humanen Epithelzellen (Caco-2) zu replizieren. Dazu wurde zunächst *S. Typhimurium* durch Mikroinjektion (d. h. unter Umgehung des phagosomalen Aufnahmewegs) in das Zytoplasma von Caco-2-Zellen gebracht. Vor allem aber wurde der extra- und intrazelluläre Metabolismus der enteroinvasiven *E. coli* und von *S. Typhimurium* unter Einbeziehung geeigneter Mutanten analysiert.

5.1 Die Replikation von *Salmonella Typhimurium* 14028s im Zytoplasma von Epithelzellen

Die Mikroinjektion von *S. Typhimurium* 14028 AL01 und 14028r bestätigt zunächst das Ergebnis von Goetz *et al.* (2001), daß *S. Typhimurium* nicht im Zytoplasma von Caco-2-Zellen replizieren kann. Eine genauere Analyse dieser Stämme zeigt jedoch, daß die Verwendung dieser Bakterien für die Mikroinjektion problematisch ist. Als Ursachen für den beobachteten Replikationsdefekt nach Mikroinjektion in Caco-2-Zellen können sowohl Auxotrophien aufgrund des guten Wachstums in M9-Minimalmedium mit NH_4^+ als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle als auch eine Hypersensitivität auf Gentamicin ausgeschlossen werden. Daher ist vermutlich die gefundene Mutation in *rfbP* und das dadurch veränderte LPS der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Fähigkeit, nach Mikroinjektionen in Caco-2-Zellen zu replizieren. Das Gen *rfbP* kodiert für die Undekaprenylphosphat-galaktosephosphotransferase. Diese katalysiert die Verknüpfung des Membranankers Undekaprenylphosphat mit dem ersten Galaktoserest des Tetrasaccharidmonomers, an den anschließend die übrigen drei Kohlenhydratbausteine angefügt werden (Wang, L. *et al.*, 1996). Daher können in den Rauh-Mutanten 14028 AL01 und 14028r keine Tetrasaccharidmonomere synthetisiert und folglich keine O-Antigene polymerisiert werden. Die Bildung von Aggregaten aus 5-10 Bakterien bei den *rfbP* Rauh-Mutanten, die in ähnlicher Weise auch bei der *rfaL*-Mutante beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), erschwert die Injektion dieser Stämme in das Zytoplasma der Wirtszelle. Als Folge der Agglutination muß die Öffnung der Injektionskapillare vergrößert werden, was dazu führt, daß die Membran der Wirtszelle aufgrund des größeren Durchmessers der Kapillarspitze schlechter penetriert werden kann und sich die größere Einstichstelle im Anschluß schlechter

verschließt. Neben der dadurch verringerten Erfolgsrate der Mikroinjektion zeigen die Rauh-Mutanten aber zusätzlich noch eine erhöhte Adhärenz an Caco-2-Zellen. Bedingt durch das konstitutiv exprimierte GFP ist es deshalb nicht immer möglich, bei einzelnen Bakterien sicher zu unterscheiden, ob sie fest an der Zellmembran adhäreren oder tatsächlich intrazellulär vorliegen. Beim Auszählen der intrazellulären Bakterien ergibt sich dadurch ein Fehler zugunsten von einzeln vorliegenden, nicht replizierenden Bakterien. In der Summe führen beide Effekte zu einer signifikanten Reduktion des Anteils an erfolgreich injizierten sowie in den Zellen replizierenden Salmonellen.

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß das fehlende O-Antigen die Replikation im Zytoplasma der Wirtszellen ebenfalls negativ beeinflusst. Der in der Arbeit von Götz A. (2005) verwendete prototrophe *E. coli* K-12 WT, der nach Mikroinjektion nur schlecht repliziert, synthetisiert ebenfalls ein R-Form LPS, ohne jedoch dabei Aggregate zu bilden (Daten nicht gezeigt). So lassen auch die Ergebnisse von Sansonetti *et al.* (1983) mit einem das Virulenzplasmid von *Shigella flexneri* tragendem Derivat von *E. coli* K-12 Stamm 395-1 vermuten, daß die Replikation im Zytoplasma von Epithelzellen nicht nur davon abhängt, dorthin zu gelangen, sondern auch vollständige O-Antigen-Seitenketten (und weitere Faktoren u. a. die Synthese von His und Arg) von entscheidender Bedeutung sind. In der gleichen Arbeit wird auch für *E. coli* K12 Stamm 395-1 ein LPS mit R-Form beschrieben und eine stärkere Adhärenz an Zellen und Oberflächen der Kulturschale verglichen mit den Stämmen, die zusätzlich zum Virulenzplasmid das O-Antigen aus *Shigella* exprimieren. Daher scheint die beobachtete erhöhte Adhärenz von *Stm* 14028 AL01 und 14028r darauf zu beruhen, daß das Fehlen der O-Polysaccharid-Seitenketten das Abwaschen extrazellulärer Bakterien mit einer wäßrigen Salzlösung (PBS) erschwert, und nicht darauf, daß zusätzliche Adhäsionsfaktoren exprimiert werden (Sansonetti *et al.*, 1983).

Daß die Replikation von *Stm* 14028s WT nach Injektion in das Zytoplasma von Epithelzellen (Götz, 2005) nicht auf eine Infektion der Zellen während der Mikroinjektion zurückzuführen ist, konnte durch die Injektion des nicht invasiven *Salmonella*-Stammes 12023 *invG::mTn5* gezeigt werden. Bei dieser Mutante fällt das Typ III Sekretionssystem (T3SS) der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) aus, wodurch die Effektoren der SPI-1 nicht sekretiert werden können (Penheiter *et al.*, 1997). Auch dieser Stamm ist in der Lage ebenso wie *EIEC* W7062 Wildtyp (Goetz *et al.*, 2001), in etwa 30% der Zellen, in denen Bakterien gefunden wurden, zu replizieren, wobei die Anzahl der Bakterien pro Zelle deutlich über 32 hinausgeht. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis, daß für eine Replikation im Zytoplasma von Caco-2-Epithelzellen eine Sekretion von Effektorproteinen der SPI-1 nicht notwendig ist. Jedoch

treten bei der Replikation im Zytoplasma nach einer Infektion mit *S. Typhimurium* 14028s Δ *sifA* deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Caco-2- und HeLa-Epithelzellen auf. Während bei einer Infektion dieser Zelllinien mit dem Wildstamm 10 h p. i. keine gesteigerte Aktivität der Caspasen 9 und 3 erkennbar ist, induziert die Δ *sifA*-Mutante die Aktivität der Caspasen 9 und 3 in HeLa-Zellen, jedoch nicht in Caco-2-Zellen. Die Induktion der Apoptose setzt deutlich früher ein als von Paesold *et al.* (2002) für humane HT-29-Darmepithelzellen beschrieben.

S. Typhimurium SL1344, der in der SCV repliziert, inhibiert die Apoptose von HeLa-Zellen durch Translokation des Effektorproteins SopB mittels des T3SS-1, welches daraufhin die Proteinkinase B (Akt) aktiviert (Knodler *et al.*, 2005). Wahrscheinlich ist durch die fehlende vakuoläre Membran um die Bakterien das T3SS-1 während der zytoplasmatischen Replikationsphase inaktiv, so daß SopB nicht oder nicht in ausreichenden Mengen sekretiert wird. Die Wirkung von SopB setzt bereits wenige Minuten nach der Internalisierung der Bakterien ein und hält für mehrere Stunden an (Knodler *et al.*, 2005). Es wird also schon während oder kurz nach der Invasion zu einem Zeitpunkt in die Wirtszelle sekretiert, zu dem sich auch die Δ *sifA*-Mutante noch in einem phagosomalen Kompartiment aufhalten sollte. Daher scheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich zu sein, da man zudem einen ähnlichen Effekt dann auch in Caco-2-Zellen erwarten würde.

Da Salmonellen normalerweise in einem membranumschlossenen Kompartiment (SCV) replizieren, könnte aber auch ein anderer Faktor an der Aktivierung der Caspasen beteiligt sein, der bei Replikation in der SCV nicht oder erst zu einem späteren Zeitpunkt mit diesen in Kontakt kommt. Gegen eine ungenügende Anpassung an die Replikation im Zytoplasma von HeLa-Zellen spricht jedoch, daß auch die intrazelluläre Lebendzellzahl der beiden *S. flexneri*-Stämme 395-1 und M90T 6 h nach der Infektion von HeLa-Zellen stark zurückgeht, obwohl das Zytoplasma für Shigellen das natürliche Kompartiment für deren intrazelluläre Replikation darstellt (Sansonetti *et al.*, 1986). Jedoch könnten dem ähnlichen Verhalten von *S. Typhimurium* Δ *sifA* und *S. flexneri* in HeLa-Zellen auch unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Doch selbst dann ließe sich das unterschiedliche Verhalten von *S. Typhimurium* Δ *sifA* bei einer Infektion von HeLa-Zellen verglichen mit Caco-2-Zellen nicht erklären, zumal auch für die beiden hier untersuchten *EIEC*-Stämme ein solcher Rückgang in Caco-2-Zellen bis 24 h p. i. nicht festgestellt werden konnte.

Daher liegt die Vermutung nahe, daß die hier verwendete HeLa-Zelllinie sensitiver auf die Induktion der Apoptose reagiert als Caco-2-Zellen. In der Tat exprimieren diese HeLa-Zellen nur geringe Mengen des wildtypischen p53-Tumorsuppressorproteins und besitzen ebenfalls

wildtypisches pRB (Scheffner *et al.*, 1991), das nach Dephosphorylierung in gesunden Zellen den Zellzyklus in der G1-Phase anhält (Das *et al.*, 2005). In HeLa-Zellen werden die Funktionen der beiden Proteine jedoch durch Interaktion mit den Proteinen E6 bzw. E7 des humanen Papillomvirus 18 inhibiert (Scheffner *et al.*, 1991). Demgegenüber besitzen Caco-2-Zellen ein mutiertes und ein deletiertes *p53*-Allel (Gartel *et al.*, 1996; Djelloul *et al.*, 1997). Weiterhin zeigen die Ergebnisse von Kralj *et al.* (2003), daß in HeLa-Zellen Apoptose durch Überexpression von wildtypischen *p53* oder *p21*^{WAF1/CIP1} induziert werden kann, wohingegen Caco-2-Zellen nahezu resistent sind, wenn die Gene für diese beiden Proteine in die Zellen transfiziert werden. Möglicherweise aktiviert die Infektion mit *S. Typhimurium* Δ *sifA* oder anderen im Zytoplasma replizierenden intrazellulären Bakterien die *p53*-abhängige Apoptose in HeLa-Zellen. Zumindest scheint der zytotoxische Effekt auf HeLa-Zellen nicht auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* Δ *sifA* beschränkt zu sein. In früheren Arbeiten mit der *sifA*-Mutante von *S. Typhimurium* wird beschrieben, daß diese, im Gegensatz zu den hier durchgeführten Experimenten, bis zu 16 h nach der Internalisierung besser in HeLa-Zellen replizieren kann als der Wildstamm (Beuzon *et al.*, 2002). Jedoch wurde von den Autoren die HeLa-Zelllinie HtTA1 verwendet, die die Aktivierungsdomäne des VP16-Transkriptionsregulators eines Herpes simplex Virus fusioniert mit dem *tet*-Repressor exprimiert (Gossen and Bujard, 1992). Vermutlich ist diese Zelllinie resistent gegenüber der durch die Infektion mit *S. Typhimurium* Δ *sifA* induzierten Apoptose. Da jedoch bei allen permanenten Zelllinien Mutationen oder Integrationen viraler Genome stattgefunden haben, die den Zellzyklus und/oder die Induktion der Apoptose beeinflussen, kann die Fragestellung, ob die Replikation von *S. Typhimurium* im Zytoplasma von Epithelzellen auch *in vivo* möglich oder von Bedeutung ist, nur schwer durch Experimente mit solchen Zelllinien beantwortet werden. Auch lassen sich aus demselben Grund Ergebnisse, die mit einer Zelllinie erzielt wurden, nur bedingt auf eine andere übertragen.

5.2 Glukose und Glukose-6-phosphat als Kohlenstoffquelle während des extra- und intrazellulären Wachstums von enteroinvasiven *Escherichia coli* und *S. Typhimurium*

Der intrazelluläre Metabolismus der fakultativ intrazellulären Bakterien war bislang weitgehend unbekannt. Kohlenhydrate, insbesondere Glukose, Mannose und Glukose-6-phosphat gehören zu den bevorzugten Kohlenstoffquellen von *E. coli* und den meisten Mitgliedern aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Diese Kohlenhydrate werden auch von Säugerzellen aufgenommen oder gebildet und stehen dort möglicherweise denjenigen

Bakterien zur Verfügung, die in eukaryotische Zellen eindringen und sich dort vermehren können (z. B. *Salmonella*, *Shigella* und die eng verwandten enteroinvasiven *E. coli*). Die Aufnahme von Kohlenhydraten wurde bisher in den Modellorganismen *E. coli* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ausführlich untersucht, wobei zahlreiche PTS- und nicht PTS-Transporter identifiziert wurden (Henderson *et al.*, 1977; Death and Ferenci, 1993; Postma *et al.*, 1993). Unter den PTS-Systemen besitzt PtsG/Crr die höchste Affinität für Glukose (etwa 20 μM ; Rohwer *et al.*, 2000) und ist das wichtigste Transportsystem für diesen Zucker. ManXYZ, im wesentlichen ein PTS-System für Mannose, kann in beiden Arten ebenfalls Glukose transportieren (Curtis and Epstein, 1975; Stock *et al.*, 1982; Erni and Zanolari, 1985; 1986; Erni *et al.*, 1987). Unter den nicht PTS-Systemen hat das LamB/MglABC-System die höchste Affinität für Glukose mit einem K_M -Wert von etwa 4 μM , der sogar noch niedriger als der von PtsG/Crr ist (Review Ferenci, 1996). Die Induktion der Transkription des *mgl*-Operons erfolgt bei einer mikromolaren Glukosekonzentration und benötigt eine hohe Konzentration von cAMP und Crp in der Bakterienzelle sowie die Synthese von Galaktose als endogenen Induktor (Review Ferenci, 1996). Das wichtigste Aufnahmesystem für Glukose-6-phosphat ist der P_i /Glc6P Antiporter UhpT (Island *et al.*, 1992).

Als Minimalmedium zur Untersuchung des *in vitro* Wachstums der verwendeten Stämme wurde RPMI 1640 gewählt, da dessen Zusammensetzung gut definiert ist und es häufig als Standardmedium für Invasions- und Replikationsexperimente mit fakultativ intrazellulären Bakterien in eukaryotischen Zellen verwendet wird. Wie erwartet führen die Deletionen von *ptsG* und *manXYZ* in *E. coli* K-12 zu einer nahezu vollständigen Hemmung des Wachstums, wenn die Mutanten in RPMI mit niedrigen (2 mM) oder hohen (10 mM) Konzentrationen von Glukose oder Mannose kultiviert werden. Weiterhin ist eine *E. coli* K-12 Δ *uhpT*-Mutante nicht in der Lage, in RPMI mit Glukose-6-phosphat zu wachsen.

Die fakultativ intrazellulären Enterobakterien *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *S. Typhimurium* 14028s sowie die entsprechenden Mutanten dieser Wildstämme zeigen ein differenzierteres Verhalten in Bezug auf den Transport von Glukose, Mannose und Glukose-6-phosphat. Die Deletion von *ptsG* allein führt nur bei *EIEC* HN280 zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums auf Glukose als alleiniger Kohlenstoffquelle, wenn auch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei *E. coli* K-12. Auf das Wachstum von *EIEC* 4608-58 und besonders von *Stm* 14028s hat die Deletion jedoch einen weitaus geringeren Effekt, selbst bei einer Glukosekonzentration von 2 mM. Die Konzentration von Glukose im Zytoplasma von Caco-2-Zellen, wo die beiden *EIEC*-Stämme replizieren, liegt vermutlich im mikromolaren

Bereich. Aber die Glukosekonzentration in der SCV, wo sich *Stm* 14028s vermehrt, ist unter den vorgegebenen Kulturbedingungen völlig unbekannt.

Während die Deletion von *ptsG* und *manXYZ* das Wachstum beider *EIEC*-Stämme in RPMI mit niedriger Glukosekonzentration vollständig inhibiert, repliziert die $\Delta ptsG$, *manXYZ*-Mutante von *Stm* 14028s unter diesen Bedingungen immer noch und erreicht in der stationären Phase die gleiche Zelldichte wie der Wildstamm. Dieses Wachstum beruht vermutlich auf der Aktivität von nicht PTS-Aufnahmesystemen wie GalP und MglABC (Postma, 1977; Death and Ferenci, 1993), die beim Wachstum in RPMI mit 10 mM Glukose wahrscheinlich in der $\Delta ptsG$, *manXYZ*-Mutante von *Stm* 14028s, aber nicht in den $\Delta ptsG$, *manXYZ*-Mutanten der beiden *EIEC*-Stämme exprimiert werden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, daß nach der Deletion von *glk* (Meyer *et al.*, 1997) die entsprechende $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *glk*-Mutante von *Stm* 14028s nur noch ein stark eingeschränktes Wachstum auf Glukose zeigt.

Die Wachstumsunterschiede zwischen den beiden *EIEC*-Isolaten treten besonders deutlich mit Glukose-6-phosphat als Kohlenstoffquelle zu Tage. Während sich die $\Delta uhpT$ -Mutante von *EIEC* HN280 ebenso wie die entsprechende Mutante von *E. coli* K-12 nicht mehr in der Gegenwart von Glukose-6-phosphat vermehrt, zeigt *EIEC* 4608-58 $\Delta uhpT$ immer noch gutes Wachstum mit einer verdoppelten Generationszeit und erreicht eine ähnlich hohe Zelldichte in der stationären Phase wie der Wildstamm. Dieses Verhalten kann nicht durch die Aktivität extrazellulärer Phosphatasen erklärt werden, da die Glukose-/Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutante ebenfalls mit derselben Generationszeit repliziert wie die *uhpT*-Mutante. Die weiteren Untersuchungen hierzu zeigen, daß dieses Verhalten auch nicht durch ein zweites *uhpT*-Gen hervorgerufen wird. Weiterhin kann ebenfalls die Aufnahme von Glukose-6-phosphat durch UhpC, wie sie in *E. coli* K-12 bei Abwesenheit von UhpT möglich ist (Schwoppe *et al.*, 2002; 2003), oder durch andere zu UhpT homologe Proteine wie GlpT (Eiglmeier *et al.*, 1987; Goldrick *et al.*, 1988) oder PgtP (Welch *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2007) ausgeschlossen werden, da die zusätzliche Deletion von keinem der zugehörigen Gene das Wachstumsverhalten von *EIEC* 4608-58 WT oder $\Delta uhpT$ auf Glukose-6-phosphat verändert. Daher deuten die Ergebnisse darauf hin, daß *EIEC* 4608-58 einen anderen Typ eines Glukose-6-phosphat-Transporters zusätzlich zu UhpT besitzt, der zudem kein Phosphomycin transportiert.

Beide *EIEC*-Stämme können zusätzlich PEP als Kohlenstoffquelle verwerten. Vorläufige Daten lassen jedoch darauf schließen, daß der gefundene PgtP-Transporter (Welch *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2007), der in beiden Stämmen vorhanden ist, nicht für die Aufnahme

von PEP verantwortlich ist. So kann *EIEC* 4608-58 $\Delta pgtP$ weiterhin mit derselben Generationszeit wie der Wildstamm auf PEP wachsen. UhpT, dessen Substratspezifität durch einen Aminosäureaustausch geändert werden kann (Hall *et al.*, 1999), ist aber vermutlich nicht daran beteiligt, da nach vorläufigen Daten auch die $\Delta uhpT$, *pgtP*-Doppelmutante kein verändertes Wachstumsverhalten zeigt. Möglicherweise spielt auch hier das noch nicht identifizierte, oben beschriebene zusätzliche Glukose-6-phosphat-Aufnahmesystem eine Rolle. Bei *EIEC* HN280 wurde in der kodierenden *pgtP*-Sequenz ein Stoppcodon für die Translation gefunden, dennoch kann der Wildstamm und selbst eine entsprechende $\Delta pgtP$ mit PEP wachsen. Eine vorläufige Analyse der $\Delta pgtP$ -Mutante von *EIEC* HN280 ergab jedoch, daß möglicherweise eine Genduplikation von *pgtP* in diesem Stamm stattgefunden hat.

Die Fähigkeit zur Adhäsion aller drei fakultativ intrazellulärer Pathogene an Caco-2-Zellen entspricht der Internalisierungseffizienz durch diese Zellen. Für *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s wurden ähnliche Adhäsions- und Invasionsraten gefunden, während sie bei *EIEC* 4608-58 etwa 5 mal niedriger sind. Der Verlust der Glukose- und Glukose-6-phosphat-Aufnahmesysteme hat keinen signifikanten Einfluß auf die Adhäsion und Invasivität von *Stm* 14028s, führt aber zu deutlichen Veränderungen bei beiden *EIEC*-Isolaten.

Die Deletion von *ptsG* bewirkt eine um mehr als den Faktor 5 erhöhte Adhärenz und Invasivität von *EIEC* 4608-58, aber nicht von *EIEC* HN280. Obwohl die *ptsG*-Mutation *in vitro* nur einen mäßigen Einfluß auf das Wachstum in Glukose-haltigem Medium hat, der bei Kultivierung im Vollmedium noch kleiner wird (Daten nicht gezeigt), scheint sie, angedeutet durch die erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase, zu einer teilweisen Lockerung der Katabolitrepression zu führen. Die Expression des IpaBC-Komplexes, der hauptsächlich für die Invasion von *Shigella* und *EIEC* verantwortlich ist (Cossart and Sansonetti, 2004), ist jedoch überwiegend temperaturabhängig und steht nicht unter der Kontrolle der Katabolitrepression (Dagberg and Uhlin, 1992). Daher scheinen zusätzliche über den cAMP-Crp-Komplex regulierte Faktoren die Adhärenz und folglich auch die Invasivität von *EIEC* 4608-58 an Caco-2- und andere Epithelzellen zu erhöhen.

Die Resultate ähneln denen von Geyid *et al.* (1996), die die Adhärenz verschiedener *E. coli*- und *Salmonella*-Stämme nach Kultivierung in LB mit und ohne Zugabe von 1 % Glukose untersucht haben. Beide Versuchsreihen lassen vermuten, daß bei *EIEC* 4608-58 ein unter Katabolitrepression stehender Faktor die Adhärenz der Bakterien an mögliche Wirtszellen vermittelt.

Der Phänotyp von *EIEC* 4608-58 $\Delta manXYZ$, *uhpT* mit seiner ebenfalls stark erhöhten Fähigkeit, in Caco-2-Zellen einzudringen, ist jedoch auf der Grundlage dieser Ergebnisse und den Angaben in der Literatur nur schwer erklärbar, da die β -Galaktosidaseaktivität und damit vermutlich auch die Katabolitrepression hier nur minimal im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. Eine zusätzlich aufgetretene Mutation während der Deletion dieser Gene scheint jedoch unwahrscheinlich, da die Komplementierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT* mit pAG119 (P_{ptsG} -*ptsG*) zu einer ähnlich hohen Invasivität der Komplementanten führt, obwohl die Deletion von *manXYZ* in der Doppel- und der Dreifachmutante unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Im Gegensatz zur *ptsG*-Mutante erhöht sich beim $\Delta manXYZ$, *uhpT*-Stamm die Invasivität zusätzlich, wenn die Internalisierung der Bakterien ohne FCS durchgeführt wird. Auch dies läßt auf einen anderen Mechanismus schließen, der nicht durch Katabolitrepression reguliert wird.

Während die Deletion von *ptsG* oder *manXYZ* in *EIEC* HN280 keinen Einfluß auf die Adhärenz oder Invasivität hat, führt der Verlust von beiden zu einem starken Rückgang dieser Fähigkeiten. Die Gründe hierfür sind bisher unbekannt. Möglicherweise ist die Synthese und/oder Translokation von Effektorproteinen des Typ III Sekretionssystems, das für die Adhärenz und Invasion notwendig ist (Scherer *et al.*, 1997; Cossart and Sansonetti, 2004; Lafont and van der Goot, 2005), beeinträchtigt. Die erhöhte Adhärenz von *EIEC* 4608-58 könnte die Beeinträchtigung möglicherweise kompensieren.

Die intrazelluläre Generationszeit der $\Delta ptsG$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 ist bei Infektion von Caco-2-Zellen verglichen mit dem Wildstamm nur um 20%, die der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante aber um 360% verlängert, wenn die Internalisierung der Bakterien in Gegenwart von 10% FCS durchgeführt wird. Die deutliche Verringerung der Replikationsgeschwindigkeit bei der Dreifachmutante scheint jedoch hauptsächlich auf einer verstärkten Abtötung der vermutlich mit Komponenten aus dem FCS opsonisierten Bakterien zu beruhen, anstatt auf einer strikten Abhängigkeit der intrazellulären Replikation von Glukose und Glukose-6-phosphat. Diese Annahme leitet sich aus der Beobachtung ab, daß die Generationszeit der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante von *EIEC* 4608-58 in Caco-2-Zellen nur um 50% verlängert ist, wenn die Bakterien vor der Infektion nicht mit FCS behandelt werden. Weiterhin replizieren die $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutanten von *EIEC* 4608-58 und *EIEC* HN280 mit ähnlichen intrazellulären Generationszeiten von etwa 70 min, wenn die Internalisierung der Bakterien ohne Zugabe von FCS erfolgt. Die größere Empfindlichkeit der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante von *EIEC* 4608-58 zeigt sich auch durch eine erhöhte Autolyse in der stationären Phase während des extrazellulären Wachstums, was aber durch

Zugabe von 10% FCS kompensiert werden kann. Vermutlich führt dies zu einer verstärkten Opsonisierung der Bakterien, wodurch diese außerhalb einer Wirtszelle zunächst stabilisiert werden. Innerhalb eukaryotischer Zellen könnte dadurch jedoch eine Lyse des Phagosoms erschwert oder vermehrt Abwehrmechanismen zur Zerstörung der Bakterien induziert werden (z. B. durch Autophagozytose (Kirkegaard *et al.*, 2004) oder Ubiquitinierung von Oberflächenproteinen der Bakterienzelle (Birmingham *et al.*, 2006)), die von dieser wegen ihrer erhöhten Sensitivität nicht kompensiert werden können. Solche Mechanismen sind für Epithelzellen bislang jedoch nur teilweise beschrieben worden.

Obwohl die $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante von *EIEC* HN280 nicht mehr in der Lage ist, mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, vermehrt sie sich ähnlich wie die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante in Caco-2-Zellen nur um 27% langsamer als der Wildstamm. Innerhalb des 8 stündigen Infektionszeitraumes teilt sich der Wildstamm etwa 8 und die Mutante 6 mal. Ein ähnliches Ergebnis wird auch bei *Stm* 14028s beobachtet: Der Wildstamm durchläuft etwa 4 Zellteilungen und repliziert damit innerhalb der SCV sehr viel langsamer als die *EIEC*-Stämme im Zytoplasma. Verglichen mit *Stm* 14028s WT sind die intrazellulären Generationszeiten der $\Delta ptsG$ -, $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -, $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ - und der $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk -Mutante von *Stm* 14028s um etwa 10-20% verlängert. Obwohl die $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -Mutante ein reduziertes und die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk -Mutante nahezu kein Wachstum in RPMI mit 10 mM Glukose zeigt, teilen sie sich ebenso wie die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutante etwa 3 mal während der 8 stündigen Infektion von Caco-2-Zellen. Die identischen intrazellulären Generationszeiten der $\Delta ptsG$, $manXYZ$ -, der $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ - und der $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk -Mutante von *Stm* 14028s lassen vermuten, daß während der Replikation in Caco-2-Zellen der hoch affine ABC-Transporter für Glukose MglABC keine bedeutende Rolle spielt.

Diese Ergebnisse zeigen bereits, daß die intrazelluläre Replikation der beiden *EIEC*-Isolate und von *S. Typhimurium* 14024s in Caco-2-Zellen nicht ausschließlich von Glukose oder Glukose-6-phosphat abhängt. Wie in Kapitel 5.3 ausführlich diskutiert wird, verwerten *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s während des intrazellulären Wachstums zwar bevorzugt Glukose als Kohlenstoffquelle, beide Bakterienstämme können aber für ihren intrazellulären Stoffwechsel auch C_3 -Substrate verwenden, sobald Glukose nicht mehr zur Verfügung steht. Daher scheinen die relativ geringen Verlängerungen der intrazellulären Generationszeiten in Caco-2-Zellen bei den Mutanten, die keine Glukose mehr verwerten können, verglichen mit dem deutlichen Wachstumsdefekt dieser Mutanten in RPMI mit Glukose, deren Fähigkeit wiederzuspiegeln, in Caco-2-Zellen auf alternativen Substraten zu wachsen. Es können jedoch

Bakterienstamm- und/oder Wirtszell-spezifische Unterschiede im Hinblick auf die Abhängigkeit von Glukose für das intrazelluläre Wachstum von *S. Typhimurium* existieren. So zeigt eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung von Bowden *et al.* (2009), daß eine $\Delta ptsG$, $manXYZ$, glk -Mutante des *S. Typhimurium* 4/74-Stammes einen sehr viel größeren Wachstumsdefekt während der Infektion von murinen RAW 264.7-Makrophagen besitzt, als die hier untersuchte entsprechende Mutante von *Stm* 14028s in humanen Caco-2-Epithelzellen.

Interessanterweise ergibt weder die Bestimmung der Lebendzellzahl noch die ^{13}C -Isotopolog-Perturbationsanalyse einen signifikanten Beitrag von Glukose-6-phosphat zur intrazellulären Replikation der beiden *EIEC*-Isolate, die im Zytoplasma replizieren, oder von *Stm* 14028s, das in der SCV repliziert, obwohl die Transkription des *uhpT*-Gens unter diesen Bedingungen hoch induziert wird (Lucchini *et al.*, 2005; Hautefort *et al.*, 2008). Möglicherweise wird die beobachtete transkriptionelle Induktion von *uhpT* dadurch verursacht, daß die Katabolitrepression in den intrazellulär replizierenden Bakterien aufgrund einer geringeren Glukosekonzentration in den Wirtszellen im Vergleich zum extrazellulären Medium (teilweise) aufgehoben wird. Die Reduktion der Katabolitrepression scheint jedoch keinen bedeutenden Einfluß auf den intrazellulären Kohlenstoffmetabolismus dieser Enterobakterien zu haben.

Vor dem Hintergrund der metabolischen Flexibilität von *E. coli* ist die beobachtete Attenuierung von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, $manXYZ$, *uhpT* im 4T1-Tumor von BALB/c-Mäusen überraschend. Geht man davon aus, daß im nekrotischen Zentrum eines Tumors nicht nur Glukose, sondern auch andere Metabolite wie Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Fettsäuren aus den abgestorbenen Zellen freigesetzt werden, scheint dies ein geeigneter Ort für das Wachstum fakultativ anaerober Bakterien zu sein. Jedoch können enteroinvasive *E. coli* offenbar nur bedingt in murinen Makrophagen replizieren, da selbst der Wildstamm nahezu keine Vermehrung in J-774A.1-Makrophagen zeigt. Lediglich in un- oder mit PMA differenzierten humanen U-937 Lymphoblasten scheinen günstige Bedingungen für die Replikation von *EIEC* 4608-58 WT *in vitro* vorzuliegen (Daten nicht gezeigt), während eine Differenzierung mit all-trans Retinsäure und $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (Caron *et al.*, 1994) möglicherweise zu einer raschen Nekrose der infizierten Zellen ähnlich wie bei J-774A.1-Makrophagen führt (Nonaka *et al.*, 2003). Die Glukose-/Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutante kann hingegen unabhängig von der Art der Differenzierung in keiner der untersuchten Makrophagenzellen replizieren (Daten nicht gezeigt). So erklärt sich die

Begrenzung von *EIEC* 4608-58 auf die Zone zwischen proliferierendem und abgestorbenem Tumorgewebe ebenso wie das überwiegend extrazelluläre Vorkommen dieses Stammes vermutlich durch die mangelnde Replikationsfähigkeit in aktivierten Makrophagen, was eine zellvermittelte Verbreitung erschwert, und die geringe Effizienz, mit der dieser Stamm in Epithelzellen eindringen kann. Doch selbst die höhere Invasionseffizienz der *ptsG*-Mutante führt nicht zu einer verstärkten Ausbreitung der Bakterien im Tumor, was vermuten läßt, daß weitere Abwehrzellen wie neutrophile Granulozyten und $CD8^+$ T-Zellen den Tumor infiltrieren und die Bakterien dort einkapseln (Lee, C. H. *et al.*, 2005).

Die deutlich geringere Lebendzellzahl von *EIEC* 4608-58 $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT* im Tumor sowie die rasche Eliminierung in Leber und Milz könnten ein Hinweis darauf sein, daß auch während einer Infektion *in vivo* Glukose eine zentrale Rolle bei der extra- und/oder intrazellulären Replikation spielt und daß selbst in komplexen Organismen bakterielles Wachstum nur auf einer begrenzten Anzahl von Substraten erfolgt. Im Gegensatz dazu kann kaum ein Unterschied zwischen *EIEC* 4608-58 WT und der $\Delta ptsG$, *manXYZ*, *uhpT*-Mutante während des Wachstums in einem Vollmedium (LB oder TSB) festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch könnte die Attenuierung auch auf die höhere Empfindlichkeit dieser Mutante zurückzuführen sein.

5.3 Der Kohlenstoffmetabolismus humanpathogener Enterobakterien während der Replikation in Caco-2-Zellen

Durch Analyse der ^{13}C -Isotopologe von Aminosäuren können die wichtigsten Substrate und der intrazelluläre Kohlenstoffmetabolismus der beiden enteroinvasiven *E. coli* und von *S. Typhimurium* in humanen Caco-2-Darmepithelzellen bestimmt werden. Diese Zelllinie wird häufig als Modell für humane Enterozyten bei der Untersuchung von intrazellulären Humanpathogenen verwendet. Bei der gewählten Glukosekonzentration von 10 mM, die die durchschnittliche Konzentration im Darmtrakt und Blut widerspiegelt, nehmen Caco-2-Zellen diese im wesentlichen über den Natrium/Glukose-Symporter SGLT1, der in der Membran von Endosomen verankert ist, sowie über die apikale GLUT2-Permease durch erleichterte Diffusion auf (Pappenheimer, 1993; Khoursandi *et al.*, 2004).

Beide fakultativ intrazellulären Enterobakterien replizieren in unterschiedlichen Kompartimenten der Wirtszellen. Während enteroinvasive *E. coli*, eng verwandt mit *Shigella*, ähnlich wie diese sowie *Listeria monocytogenes* im Zytoplasma replizieren, vermehrt sich *Salmonella* in einem modifiziertem Phagosom (SCV). Daher könnten beide auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Wirtszellmetabolismus interagieren. Die von den

Wirtszellen und den intrazellulären Bakterien verwerteten Kohlenstoffquellen und die Metabolitflüsse durch die wichtigsten bakteriellen und wirtszelleigenen Abbauwege können (i) durch den ^{13}C -Einbau pro C-Atom in den Aminosäuren und (ii) durch die Analyse der ^{13}C -Isotopologenprofile der einzelnen Aminosäuren aus den Wirtszellen und den bakteriellen Wildstämmen sowie den entsprechenden Glukose- und/oder Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten ermittelt werden. Ein Modell der Metabolitflüsse, das sich aus diesen Daten ergibt, ist in Abb. 37 gezeigt.

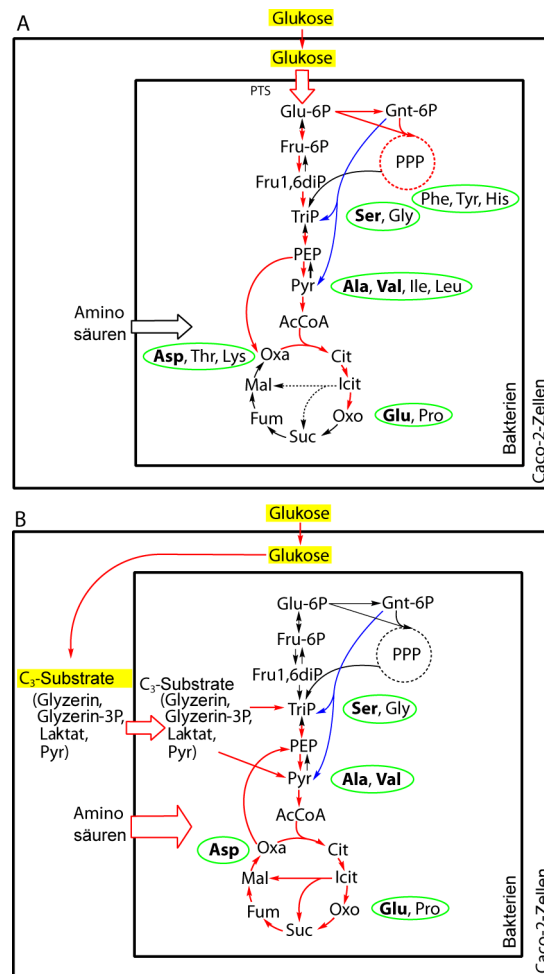


Abb. 37: Modell des Katabolismus und der Metabolitflüsse in den untersuchten Enterobakterien. Die Aminosäuren, die zum Teil *de novo* synthetisiert werden, sind grün eingekreist. Die Aufnahme von ^{13}C -markierten Aminosäuren aus der Wirtszelle ist durch Pfeile angedeutet, deren Größe in etwa die Menge an aufgenommenen Aminosäuren unter den Bedingungen in (A) und (B) widerspiegelt. *EIEC* HN280 WT und *Stm* 14028s WT betreiben einen Metabolismus, wie er in (A) gezeigt ist (rote Pfeile) und der hauptsächlich durch Glukose gespeist wird (gelb unterlegt), wohingegen die $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten einen Metabolismus zeigen, wie er unter (B) dargestellt ist und der hauptsächlich mit C₃-Substraten betrieben wird. Der Kohlenstoffmetabolismus von *EIEC* 4608-58 scheint eine Kombination der beiden Modelle zu sein.

Alle bakteriellen Mutanten, bei denen die wichtigsten Glukoseaufnahmesysteme *ptsG* und *manXYZ* deletiert wurden, zeigen einen starken, Stamm-spezifischen Rückgang im Einbau der ^{13}C -Markierung aus der extern zugegebenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose und/oder Veränderungen im

^{13}C -Isotopologemuster, wohingegen bei den $\Delta uhpT$ -Mutanten die Einbauraten und Verteilungsmuster während der Replikation in Caco-2-Zellen ähnlich sind wie in den entsprechenden Wildstämmen. Unter den gewählten Standardbedingungen für die Zellkultur nehmen daher alle drei untersuchten enterobakteriellen Wildstämme Glukose, aber nicht Glukose-6-phosphat direkt aus der Wirtszelle auf, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Der Abbau der Glukose erfolgt hauptsächlich durch Glykolyse und/oder Entner-Doudoroff-Weg und anschließend im Citratzyklus. PtsG kann jedoch nicht nur Glukose, sondern noch weitere Kohlenhydrate wie Glukosamin, N-Acetylglukosamin und α -Glukoside transportieren, wenn auch mit deutlich niedrigerer Affinität (Postma *et al.*, 1993; Barabote and Saier, 2005). Grundsätzlich könnten auch diese von der Wirtszelle aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose gebildet werden. Aufgrund ihrer vermutlich niedrigen Konzentration in der eukaryotischen Zelle ist es jedoch unwahrscheinlich, daß ein signifikanter Teil des eingebauten ^{13}C in den bakteriellen Aminosäuren aus diesen Kohlenhydraten stammt. Für diese Zucker existieren zum Teil PTS-Transporter mit höherer Affinität als PtsG (Postma *et al.*, 1993), deren Funktion durch die eingeführten Deletionen nicht beeinträchtigt ist. Das primäre Substrat für ManXYZ ist Mannose (Postma *et al.*, 1993). Es kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß in der Wirtszelle generierte ^{13}C -Mannose eine intrazelluläre Kohlenstoffquelle für die untersuchten Bakterienstämme darstellt. Jedoch zeigt bereits die $\Delta ptsG$ -Mutante von *EIEC* 4608-58 ein deutlich verändertes ^{13}C -Isotopologenprofil. Die Verteilung bei dieser Mutante läßt darauf schließen, daß überwiegend Laktat oder Pyruvat aufgenommen werden, wenn keine Glukose mehr zur Verfügung steht. Es ist bekannt, daß in *E. coli* dephosphoryliertes EIIA^{Glc} die Aktivität der Glyzerinkinase inhibiert (Review Lengeler and Jahreis, 2009). Durch die Deletion von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ liegt EIIA^{Glc} überwiegend in der phosphorylierten Form vor. Dadurch kann verstärkt Glyzerin metabolisiert und Laktat aufgenommen werden (Gutierrez-Rios *et al.*, 2007). *EIEC* HN280 verfolgt demgegenüber eine andere Strategie. Der Verlust von $\text{EIICB}^{\text{Glc}}$ wird offenbar durch ManXYZ ausgeglichen. Beide Einfachmutanten zeigen keine Unterschiede zum entsprechenden Wildstamm. Erst die Deletion beider Gene führt zu einem Rückgang der ^{13}C -Markierung. Da jedoch extrazellulär eine *manXYZ*-Mutante von *EIEC* HN280 nicht mehr und der Wildstamm nur sehr langsam in Gegenwart von 10 mM Mannose wächst, scheint auch dieses Kohlenhydrat nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Durch die Deletion von *uhpT* ist die Aufnahme von Glukose-6-phosphat bei allen drei Stämmen stark inhibiert. Jedoch können über UhpT nicht nur $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose-6-phosphat, sondern auch andere ^{13}C -markierte phosphorylierte Kohlenhydrate aufgenommen werden wie

z. B. Glukose-1-phosphat, Mannose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat und Ribose-5-phosphat (Dietz, 1976; Chico-Calero *et al.*, 2002), die ebenfalls in der Wirtszelle aus [U-¹³C₆]-Glukose generiert werden könnten. Da jedoch alle $\Delta uhpT$ -Mutanten ähnliche ¹³C-Einbauraten in ihre Aminosäuren zeigen wie die zugehörigen Wildstämme, können nicht nur Glukose-6-phosphat, sondern auch diese zusätzlichen phosphorylierten Kohlenhydrate als wichtigste Kohlenstoffquelle der hier untersuchten Enterobakterien ausgeschlossen werden.

Die beiden zytoplasmatisch replizierenden *EIEC*-Stämme besitzen direkten Zugang zur [U-¹³C₆]-Glukose, die von den Caco-2-Zellen über SGLT1 und GLUT2 aus dem externen Kulturmedium ins Zytoplasma transportiert wird (Pappenheimer, 1993; Khoursandi *et al.*, 2004). Obwohl jedoch Glukose effizient von Caco-2-Zellen aufgenommen werden kann, ist der zelluläre Vorrat an freier Glukose vermutlich niedrig, da diese unmittelbar in Glukose-6-phosphat umgewandelt und in die Glykolyse und den Pentosephosphatzyklus eingeschleust wird (Wright *et al.*, 2007; Young and Anderson, 2008). Daher benötigen intrazelluläre Bakterien vermutlich hoch affine Glukosetransporter, um ausreichende Mengen an Glukose für den eigenen Metabolismus während einer Infektion aus den Wirtszellen aufnehmen zu können. Unterschiede in den Affinitäten der wichtigsten Glukosetransporter (PtsG, ManXYZ) könnten daher für die beobachtete unterschiedliche Effizienz, mit der die beiden *EIEC*-Stämme intrazellulär Glukose verwerten, verantwortlich sein, obwohl sie im selben Kompartiment, dem Zytoplasma, replizieren. Die relativ niedrige Affinität des wichtigsten Glukose transportierenden PTS in *Listeria monocytogenes* für Glukose (Daten nicht gezeigt) erklärt möglicherweise auch, warum dieses grampositive Bakterium Glycerin anstelle von Glukose als Kohlenstoffquelle während der Replikation im Zytoplasma von J-774A.1-Makrophagen bevorzugt (Eylert *et al.*, 2008).

Auf der Grundlage der hier dargestellten Ergebnisse kann auch Glukonat als wichtigste Kohlenstoffquelle für alle drei Enterobakterien unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden, da ¹³C-markiertes Glukonat, das von der Wirtszelle aus [U-¹³C₆]-Glukose gebildet werden kann, immer noch von den $\Delta ptsG$, $\Delta manXYZ$ -Mutanten über den funktionalen Glukonattransporter GntT (Porco *et al.*, 1997) aufgenommen werden kann (Daten nicht gezeigt). Würde ¹³C-markiertes Glukonat die wichtigste Kohlenstoffquelle darstellen, dann sollten die ¹³C-Isotopologenprofile der *de novo* synthetisierten Aminosäuren aus den hier untersuchten Mutanten und den entsprechenden Wildstämmen ähnlich sein, was aber nicht der Fall ist. Diese Schlußfolgerung unterscheidet sich von früheren Vermutungen, die auf der Basis von Transkriptomanalysen gemacht wurden, wonach Glukonat die bevorzugte Kohlenstoffquelle für intrazellulär replizierende *S. Typhimurium* in J-774A.1-

Makrophagen sein könnte (Eriksson *et al.*, 2003). Jedoch könnte die verstärkte Expression des Glukonattransporters *gntT* ebenfalls eine Folge der gelockerten Katabolitrepression sein (Porco *et al.*, 1997) und die verringerte Transkription des *aro*-Operons wie auch der Enzyme für Glykolyse und Pentosephosphatzyklus durch das stark verlangsamte Wachstum bzw. die vermutlich niedrigere Glukosekonzentration in der SCV verursacht werden. Neuere Transkriptomanalysen mit HeLa-Epithelzellen zeigen in der Tat, daß *ptsG* während der Infektion stärker exprimiert wird und die Enzyme der Glykolyse sowie der aeroben Elektronentransportkette in HeLa-Zellen stärker exprimiert werden als in J-774A.1-Makrophagen (Hautefort *et al.*, 2008). Daher scheinen auch in Bezug auf die zur Verfügung stehende oder verwertete Kohlenstoffquelle Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen zu existieren.

Die Verwendung von Glukose durch *S. Typhimurium* während der Replikation in der membranumschlossenen SCV ist insofern unerwartet, als man annimmt, daß die Glukose aus dem Zytoplasma der Wirtszellen über die Membran der SCV transportiert werden muß, um von den Bakterien aufgenommen werden zu können. Möglicherweise fusioniert jedoch der in der Endosomenmembran verankerte Glukosetransporter SGLT1, das wichtigste Glukoseaufnahmesystem in Caco-2-Zellen (Khoursandi *et al.*, 2004), mit der Membran der SCV und stellt so ausreichende Mengen an [U-¹³C₆]-Glukose in der SCV von Caco-2-Zellen zur Verfügung. Die Glukosekonzentration in der SCV scheint jedoch in Raw 264.7-Makrophagen niedrig genug, d. h. im mikromolaren Bereich zu sein, um nicht PTS Glukosetransporter von *S. Typhimurium* zu induzieren (Review Ferenci, 1996; Seeto *et al.*, 2004; Bowden *et al.*, 2009). Möglicherweise nehmen Caco-2-Zellen mehr Glukose auf als J-774A.1- oder Raw 264.7-Makrophagen und erzeugen so überschüssige C₃-Abbauprodukte (Metallo *et al.*, 2009). Diese können dann entweder in Form von Laktat wieder in das extrazelluläre Medium ausgeschieden oder von den Bakterien aufgenommen werden, weshalb der hoch affine ABC-Transporter LamB/MglABC nicht induziert wird und somit keinen Einfluß auf die Replikation von *S. Typhimurium* 14028s in Caco-2-Zellen hat.

Bei allen Glukose-/Glukose-6-phosphat-Aufnahmemutanten weisen weniger Aminosäuren eine ¹³C-Markierung auf als die entsprechenden Wildstämme. Zudem sind die ¹³C-Einbauraten stark reduziert und die ¹³C-Isotopologenprofile der meisten Aminosäuren unterscheiden sich deutlich von denen der entsprechenden Wildstämme. Vermutlich werden von den Mutanten weniger Aminosäuren *de novo* synthetisiert als von den Wildstämmen oder die Neusynthese erfolgt aus nur schwach ¹³C-markierten Substraten. Diese Veränderung wird aber offensichtlich durch eine erhöhte Aufnahme von Aminosäuren aus der Wirtszelle

ausgeglichen. Eine signifikant erhöhte Degradation von Aminosäuren scheint in den Mutanten jedoch nicht stattzufinden, da die mit ^{13}C vormarkierten Aminosäuren, die aus den Wirtszellen aufgenommen wurden, ihr Wirtszell-spezifisches ^{13}C -Isotopologienmuster auch nach der Isolierung aus den Bakterien behalten. Vermutlich werden sie nach der Aufnahme ohne weitere Metabolisierung direkt zur Synthese bakterieller Proteine eingesetzt. Die ^{13}C -Isotopologienprofile der von den Mutanten *de novo* synthetisierten Aminosäuren lassen vermuten, daß diese bevorzugt C_3 -Substrate wie z. B. Glycerin, Pyruvat oder Laktat aufnehmen, die in den Wirtszellen aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose erzeugt werden. Zelluläre Komponenten, die überwiegend zu $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA abgebaut werden wie z. B. Fettsäuren, können dagegen als sekundäre Kohlenstoffquelle anhand der gefundenen ^{13}C -Isotopologienprofile von einigen Aminosäuren (insbesondere Ala) ausgeschlossen werden. Auch die drei Wildstämme könnten zusätzlich zu Glukose in geringem, Stamm-spezifischem Umfang $^{13}\text{C}_3$ -Substrate verwerten, da sie scheinbar teilweise auf Glukoneogenese angewiesen sind, wie es bei den ^{13}C -Isotopologienmustern von Ser deutlich wird. Aufgrund der Versuchsdurchführung, der bakterielle Metabolismus wurde nur zu einem Zeitpunkt nach der Infektion analysiert, kann jedoch nicht mit Sicherheit unterschieden werden, ob die intrazellulären Bakterien die unterschiedlichen Substrate gleichzeitig verwerten oder nacheinander. Da jedoch weniger als 10 % der extrazellulären Glukose im Verlaufe eines Experiments verbraucht werden, diese also im Überschuß vorhanden ist, ist es wahrscheinlich, daß Glukose und $^{13}\text{C}_3$ -Substrate gleichzeitig verwertet werden.

Der größte Teil aller Aminosäuren sowohl bei beiden zytoplasmatischen enteroinvasiven *E. coli* als auch beim phagosomal replizierenden *S. Typhimurium* ist unmarkiert und wird daher vermutlich direkt aus den Wirtszellen aufgenommen. Dies zeigt, daß die Membran der SCV permeabel für Aminosäuren und vermutlich auch andere anabole Monomere ist und *S. Typhimurium* somit Zugang zu solchen Bausteinen besitzt. Diese unmarkierten Aminosäuren werden wahrscheinlich hauptsächlich von den Wirtszellen direkt aus dem Kulturmedium aufgenommen, das alle Aminosäuren außer Ala enthält, könnten aber teilweise auch aus dem proteolytischen Abbau von unmarkierten Wirtszellproteinen stammen, da selbst Ala nicht zu 100 % ^{13}C -markiert ist. Letztere Möglichkeit wird auch dadurch unterstützt, daß große Mengen an ^{13}C -markierten Aminosäuren, die von den mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ -Glukose vormarkierten Wirtszellen abstammen, von den intrazellulären Bakterien aufgenommen werden. Überraschenderweise scheinen selbst jene Aminosäuren, die für die Wirtszelle essentiell sind wie Ile, Leu, Phe und Tyr, nicht oder nur zu einem kleinen Teil von den intrazellulären Bakterien *de novo* synthetisiert zu werden. Zumindest sind diese Aminosäuren

nach ihrer Isolierung aus den Bakterien nicht oder nur schwach mit ^{13}C markiert. Es scheint jedoch Stamm-spezifische Unterschiede zwischen den drei untersuchten enterobakteriellen Wildstämmen und ihren Glukoseaufnahmemutanten zu geben in Bezug auf das Verhältnis von *de novo* synthetisierten Aminosäuren zu den Aminosäuren, die aus der Wirtszelle aufgenommen werden. Diese Unterschiede deuten daraufhin, daß die Verwertung energiereicher Glukose durch die intrazellulären Bakterien eine erhöhte *de novo* Synthese von Aminosäuren und vermutlich auch anderer anaboler Monomere erlaubt, wohingegen der Abbau von energieärmeren C_3 -Substraten eine erhöhte Aufnahme von Aminosäuren aus der Wirtszelle zur Folge hat. Dieses Gleichgewicht zwischen bakteriellem Anabolismus und der verwendeten Kohlenstoffquelle ist wahrscheinlich der Grund für die immer noch gute intrazelluläre Replikationsfähigkeit der Glukoseaufnahmemutanten. Diese metabolische Flexibilität mag auch entscheidend für das Überleben und die Persistenz von *S. Typhimurium* während einer systemischen Infektion in Mäusen sein, wo die Bakterien einem wechselnden Angebot an Nährstoffen gegenüberstehen (Fang *et al.*, 2005; Becker *et al.*, 2006; Tchawa Yimga *et al.*, 2006; Garcia-del Portillo *et al.*, 2008; Mercado-Lubo *et al.*, 2009).

Weder der Entzug von Nährstoffen durch die zytoplasmatisch replizierenden *EIEC* noch durch die phagosomal residierenden Salmonellen scheint zu einer signifikanten Veränderung des Kohlenstoffmetabolismus der Wirtszelle zu führen, wie man es anhand der unveränderten ^{13}C -Profile der wirtszelleigenen Aminosäuren, die aus Zwischenprodukten der Glykolyse (Ala, Ser, Gly) oder des Citratzyklus (Glu, Pro, Asp) synthetisiert werden, vermuten kann. Dies scheint bei Säugerzellen, die mit dem humanen Zytomegalovirus (HCMV) (Munger *et al.*, 2008) oder *Chlamydia pneumoniae* (Rupp *et al.*, 2007) infiziert sind, anders zu sein. Die Infektion mit HCMV führt zu einem deutlich erhöhten Fluß durch die meisten Stoffwechselwege inklusive der Glykolyse und dem Citratzyklus der infizierten MRC-Fibroblasten. *C. pneumoniae* hingegen übt einen zusätzlichen stabilisierenden Effekt auf den Transkriptionsfaktor „hypoxia inducible factor-1 α “ (HIF-1 α) aus, mit der Folge, daß die Glukoseaufnahme durch die infizierten Hep-2-Zellen während der frühen Phase der Infektion ansteigt. Möglicherweise treten ähnliche Effekte auch in den frühen Phasen der Infektion bei den hier untersuchten Enterobakterien auf (Mantis *et al.*, 1996; Posho *et al.*, 1998), werden aber im Verlaufe der 6 bzw. 8 stündigen Infektionsdauer wieder ausgeglichen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Glukose das bevorzugte Substrat für den intrazellulären Metabolismus von *EIEC* HN280 und *Stm* 14028s darstellt. *EIEC* 4608-58 verwertet zwar ebenfalls Glukose, jedoch mit geringerer Effizienz, und scheint gleichzeitig noch ein C_3 -Substrat, vermutlich Glyzerin, aus den Wirtszellen aufzunehmen. Es wäre

interessant zu sehen, ob dieser Unterschied zwischen den beiden untersuchten enteroinvasiven *E. coli* Isolaten tatsächlich einen evolutionären Ursprung hat und ob andere Isolate aus den gleichen phylogenetischen Gruppen einen ähnlichen intrazellulären Metabolismus betreiben. Bei allen hier untersuchten Bakterienstämmen kann Glukose als primäre Kohlenstoffquelle durch ein weniger energiereiches C₃-Substrat ersetzt werden, wie es auch schon die Bestimmung der intrazellulären Lebendzellzahl angedeutet hat. Der Wechsel zu diesen alternativen, weniger energiereichen Substraten scheint durch die erhöhte Aufnahme von Aminosäuren und vermutlich auch anderen anabolen Monomeren aus den Wirtszellen ausgeglichen zu werden, was die nur geringfügig verlängerten intrazellulären Generationszeiten der untersuchten Mutanten in Caco-2-Zellen erklären würde. Weitere Untersuchungen zur Art des verwendeten C₃-Substrates und zur Bedeutung des Glyoxylatweges für *EIEC* und *S. Typhimurium* sind im Gange.

Obwohl die Versuche mit einer externen Glukosekonzentration durchgeführt wurden, die der im menschlichen Blut ähnelt, sollte jedoch berücksichtigt werden, daß für die Untersuchungen eine Tumorzelllinie als Modellsystem für die intrazelluläre Replikation der Bakterien verwendet wurde. Es ist bekannt, daß Tumorzellen einen spezifischen Metabolismus besitzen, der sich durch eine erhöhte Aufnahme von Glukose und einer verstärkt ablaufenden Glykolyse auszeichnet ("Warburg-Effekt", Review Young and Anderson, 2008). Ähnlich wie bei der Induktion der Apoptose durch *Stm* 14028s Δ *sifA* in unterschiedlichen Zelllinien und Zellklonen könnten auch im Metabolismus Wirtszell-spezifische Unterschiede existieren, die zu spezifischen Adaptionen auf der Seite der Bakterien führen. Nur weitere Studien mit primären Zellen, Geweben und Tieren können zeigen, ob die in dieser Arbeit gezogenen Schlußfolgerungen aus den verwendeten Modellsystemen auch *in vivo* gültig sind.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. M., Shimabukuro, H. and Shimamoto, T.** 2009. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. *J Food Sci*, 74(7), pp. M405-10.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.** 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York.
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K. and Stephanopoulos, G.** 2007. Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis. *Anal Chem*, 79(19), pp. 7554-9.
- Bahrani, F. K., Sansonetti, P. J. and Parsot, C.** 1997. Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. *Infect Immun*, 65(10), pp. 4005-10.
- Barabote, R. D. and Saier, M. H., Jr.** 2005. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(4), pp. 608-34.
- Barzu, S., Benjelloun-Touimi, Z., Phalipon, A., Sansonetti, P. and Parsot, C.** 1997. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infect Immun*, 65(5), pp. 1599-605.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M. and Heffron, F.** 1996. The Ipf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), pp. 279-83.
- Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., Meyer, T. F., Mann, M. and Bumann, D.** 2006. Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature*, 440(7082), pp. 303-7.
- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P., Birch, P. R., Parkhill, J. and Toth, I. K.** 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(30), pp. 11105-10.
- Beloin, C. and Dorman, C. J.** 2003. An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 47(3), pp. 825-38.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J. W. and Gilles, E. D.** 2007. Correlation between growth rates, EIACrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 189(19), pp. 6891-900.
- Beuzon, C. R., Salcedo, S. P. and Holden, D. W.** 2002. Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiology*, 148(Pt 9), pp. 2705-15.

- Beuzón, C. R., Meresse, S., Unsworth, K. E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E. and Holden, D. W.** 2000. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *Embo J*, 19(13), pp. 3235-49.
- Birmingham, C. L., Smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T. and Brumell, J. H.** 2006. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J Biol Chem*, 281(16), pp. 11374-83.
- Blaser, M. J. and Newman, L. S.** 1982. A review of human salmonellosis. I. Infective dose. *Rev. Infect. Dis.*, 34, pp. 1096-106.
- Bohm, A. and Boos, W.** 2004. Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr Opin Microbiol*, 7(2), pp. 151-6.
- Bohnhoff, M., Miller, C. P. and Martin, W. R.** 1964. Resistance of the Mouse's Intestinal Tract to Experimental *Salmonella* Infection. II. Factors Responsible for Its Loss Following Streptomycin Treatment. *J Exp Med*, 120, pp. 817-28.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. and Falkow, S.** 1992. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. 1977. *Biotechnology*, 24, pp. 153-71.
- Boucrot, E., Beuzon, C. R., Holden, D. W., Gorvel, J. P. and Meresse, S.** 2003. *Salmonella typhimurium* SifA effector protein requires its membrane-anchoring C-terminal hexapeptide for its biological function. *J Biol Chem*, 278(16), pp. 14196-202.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, J. P., Gorvel, J. P. and Meresse, S.** 2005. The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science*, 308(5725), pp. 1174-8.
- Bowden, S. D., Rowley, G., Hinton, J. C. and Thompson, A.** 2009. Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun*, 77(7), pp. 3117-26.
- Bruggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M. A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., Coppee, J. Y. and Buchrieser, C.** 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol*, 8(8), pp. 1228-40.
- Bumann, D.** 2009. System-level analysis of *Salmonella* metabolism during infection. *Curr Opin Microbiol*, 12(5), pp. 559-67.
- Burrows, W.** 1959. Textbook of microbiology. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 7th ed.
- Caron, E., Liautard, J. P. and Kohler, S.** 1994. Differentiated U937 cells exhibit increased bactericidal activity upon LPS activation and discriminate between virulent and avirulent *Listeria* and *Brucella* species. *J Leukoc Biol*, 56(2), pp. 174-81.
- Cersini, A., Salvia, A. M. and Bernardini, M. L.** 1998. Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun*, 66(2), pp. 549-57.

- Cersini, A., Martino, M. C., Martini, I., Rossi, G. and Bernardini, M. L.** 2003. Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants. *Infect Immun*, 71(12), pp. 7002-13.
- Chatfield, S. N., Strahan, K., Pickard, D., Charles, I. G., Hormaeche, C. E. and Dougan, G.** 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog*, 12(2), pp. 145-51.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. and Vazquez-Boland, J. A.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), pp. 431-6.
- Clements, L. D., Miller, B. S. and Streips, U. N.** 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. *Syst Appl Microbiol*, 25(2), pp. 284-6.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66(10), pp. 4555-8.
- Coers, J., Vance, R. E., Fontana, M. F. and Dietrich, W. F.** 2007. Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol*, 9(10), pp. 2344-57.
- Collazo, C. M. and Galan, J. E.** 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol*, 24(4), pp. 747-56.
- Collins, L. V. and Hackett, J.** 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the *rfc* gene, which encodes an O-antigen polymerase of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 173(8), pp. 2521-9.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J.** 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), pp. 242-8.
- Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberon, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y. M. and Bolivar, F.** 1981. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene*, 13(1), pp. 25-35.
- Curtis, S. J. and Epstein, W.** 1975. Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol*, 122(3), pp. 1189-99.
- Dagberg, B. and Uhlin, B. E.** 1992. Regulation of virulence-associated plasmid genes in enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(23), pp. 7606-12.
- Daniels, J. J., Autenrieth, I. B., Ludwig, A. and Goebel, W.** 1996. The gene *slyA* of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but

not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect Immun*, 64(12), pp. 5075-84.

Das, S. K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y., Komoto, A. and Kanazawa, K. 2005. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim Biophys Acta*, 1726(3), pp. 328-35.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), pp. 6640-5.

Death, A. and Ferenci, T. 1993. The importance of the binding-protein-dependent Mgl system to the transport of glucose in *Escherichia coli* growing on low sugar concentrations. *Res Microbiol*, 144(7), pp. 529-37.

Deiwick, J., Salcedo, S. P., Boucrot, E., Gilliland, S. M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S. R., Gorvel, J. P., Holden, D. W. and Meresse, S. 2006. The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun*, 74(12), pp. 6965-72.

Dietz, G. W., Jr. 1976. The hexose phosphate transport system of *Escherichia coli*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 44, pp. 237-59.

Djelloul, S., Forgue-Lafitte, M. E., Hermelin, B., Mareel, M., Bruyneel, E., Baldi, A., Giordano, A., Chastre, E. and Gespach, C. 1997. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells. Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Lett*, 406(3), pp. 234-42.

Dorman, C. J., McKenna, S. and Beloin, C. 2001. Regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*, a facultative intracellular pathogen. *Int J Med Microbiol*, 291(2), pp. 89-96.

Drecktrah, D., Knodler, L. A., Howe, D. and Steele-Mortimer, O. 2007. *Salmonella* trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic*, 8(3), pp. 212-25.

Dumay, V., Danchin, A. and Crasnier, M. 1996. Regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase activity during hexose phosphate transport. *Microbiology*, 142 (Pt 3), pp. 575-83.

DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B. and Formal, S. B. 1989. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis*, 159(6), pp. 1126-8.

Egile, C., Loisel, T. P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. J. and Carrier, M. F. 1999. Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, 146(6), pp. 1319-32.

Eiglmeier, K., Boos, W. and Cole, S. T. 1987. Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the glycerol-

3-phosphate transport protein with components of the hexose-6-phosphate transport system. *Mol Microbiol*, 1(3), pp. 251-8.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J. C. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 47(1), pp. 103-18.

Erni, B. and Zanolari, B. 1985. The mannose-permease of the bacterial phosphotransferase system. Gene cloning and purification of the enzyme IIMan/IIIMan complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 260(29), pp. 15495-503.

Erni, B. and Zanolari, B. 1986. Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system. Gene cloning, overproduction, and amino acid sequence of enzyme IIGlc. *J Biol Chem*, 261(35), pp. 16398-403.

Erni, B., Zanolari, B. and Kocher, H. P. 1987. The mannose permease of *Escherichia coli* consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *J Biol Chem*, 262(11), pp. 5238-47.

Espina, M., Olive, A. J., Kenjale, R., Moore, D. S., Ausar, S. F., Kaminski, R. W., Oaks, E. V., Middaugh, C. R., Picking, W. D. and Picking, W. L. 2006. IpaD localizes to the tip of the type III secretion system needle of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 74(8), pp. 4391-400.

Ewing, W. H. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

Exley, R. M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y. H., West, N. P., Williamson, M., Botto, M., Smith, H. and Tang, C. M. 2005. Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med*, 201(10), pp. 1637-45.

Eylert, E., Schar, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W. and Eisenreich, W. 2008. Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol*, 69(4), pp. 1008-17.

Fang, F. C., Libby, S. J., Castor, M. E. and Fung, A. M. 2005. Isocitrate lyase (AceA) is required for *Salmonella* persistence but not for acute lethal infection in mice. *Infect Immun*, 73(4), pp. 2547-9.

Farmer, J. J., 3rd, Davis, B. R., Hickman-Brenner, F. W., McWhorter, A., Huntley-Carter, G. P., Asbury, M. A., Riddle, C., Wathen-Grady, H. G., Elias, C., Fanning, G. R. and et al. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 21(1), pp. 46-76.

Ferenci, T. 1996. Adaptation to life at micromolar nutrient levels: the regulation of *Escherichia coli* glucose transport by endoinduction and cAMP. *FEMS Microbiol Rev*, 18(4), pp. 301-17.

Finlay, B. B. and Falkow, S. 1988. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured

animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie*, 70(8), pp. 1089-99.

Fischer, E. and Sauer, U. 2003. A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278(47), pp. 46446-51.

Forst, C. V. 2006. Host-pathogen systems biology. *Drug Discov Today*, 11(5-6), pp. 220-7.

Fournier, B., Williams, I. R., Gewirtz, A. T. and Neish, A. S. 2009. Toll-like receptor 5-dependent regulation of inflammation in systemic *Salmonella enterica* Serovar typhimurium infection. *Infect Immun*, 77(9), pp. 4121-9.

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P. and Nunez, G. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in *salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol*, 7(6), pp. 576-82.

Fu, Y. and Galan, J. E. 1999. A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 401(6750), pp. 293-7.

Fukushima, M., Kakinuma, K. and Kawaguchi, R. 2002. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J Clin Microbiol*, 40(8), pp. 2779-85.

Galan, J. E. 2009. Common themes in the design and function of bacterial effectors. *Cell Host Microbe*, 5(6), pp. 571-9.

Galmbacher, K. M. 2008. Caspase-1 as a target of bacterial tumor therapy. Doktorarbeit, Fakultät für Medizin, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Garcia-del Portillo, F., Nunez-Hernandez, C., Eisman, B. and Ramos-Vivas, J. 2008. Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), pp. 46-52.

Gartel, A. L., Serfas, M. S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G. S., el-Deiry, W. S. and Tyner, A. L. 1996. p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res*, 227(2), pp. 171-81.

Germanier, R. and Furer, E. 1971. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of *gal E* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 4(6), pp. 663-73.

Geyid, A., Fletcher, J., Gashe, B. A. and Ljungh, A. 1996. Invasion of tissue culture cells by diarrhoeagenic strains of *Escherichia coli* which lack the enteroinvasive *inv* gene. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 14(1), pp. 15-24.

Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J. A., Beck, M., Slaghuis, J., Szalay, A. A. and Goebel, W. 2001. Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21), pp. 12221-6.

- Goldman, R. C. and Leive, L.** 1980. Heterogeneity of antigenic-side-chain length in lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111 and *Salmonella typhimurium* LT2. Eur J Biochem, 107(1), pp. 145-53.
- Goldman, R. C. and Hunt, F.** 1990. Mechanism of O-antigen distribution in lipopolysaccharide. J Bacteriol, 172(9), pp. 5352-9.
- Goldrick, D., Yu, G. Q., Jiang, S. Q. and Hong, J. S.** 1988. Nucleotide sequence and transcription start point of the phosphoglycerate transporter gene of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 170(8), pp. 3421-6.
- Gossen, M. and Bujard, H.** 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(12), pp. 5547-51.
- Götz, A.** 2005. Untersuchungen zur Replikation von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium WT und Δ sifA sowie von *Escherichia coli* K-12 WT im Zytoplasma von Epithelzellen. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Grimont, P. A. D. and Weill, F.-X.** 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, Paris, 9th edition.
- Gutierrez-Rios, R. M., Freyre-Gonzalez, J. A., Resendis, O., Collado-Vides, J., Saier, M. and Gosset, G.** 2007. Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. BMC Microbiol, 7, pp. 53.
- Guy, R. L., Gonias, L. A. and Stein, M. A.** 2000. Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the *fms-aroE* intragenic region. Mol Microbiol, 37(6), pp. 1417-35.
- Hall, J. A., Fann, M. C. and Maloney, P. C.** 1999. Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*. J Biol Chem, 274(10), pp. 6148-53.
- Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A. J., Fukui, Y. and Sasakawa, C.** 2007. *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. Nat Cell Biol, 9(1), pp. 121-8.
- Harwood, J. P., Gazdar, C., Prasad, C., Peterkofsky, A., Curtis, S. J. and Epstein, W.** 1976. Involvement of the glucose enzymes II of the sugar phosphotransferase system in the regulation of adenylate cyclase by glucose in *Escherichia coli*. J Biol Chem, 251(8), pp. 2462-8.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R. J., Ahmad, N., Rhen, M. and Hinton, J. C.** 2008. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. Cell Microbiol, 10(4), pp. 958-84.

- Hayward, R. D. and Koronakis, V.** 2002. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol*, 12(1), pp. 15-20.
- Heithoff, D. M., Shimp, W. R., Lau, P. W., Badie, G., Enioutina, E. Y., Daynes, R. A., Byrne, B. A., House, J. K. and Mahan, M. J.** 2008. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. *Appl Environ Microbiol*, 74(6), pp. 1757-66.
- Henderson, P. J., Giddens, R. A. and Jones-Mortimer, M. C.** 1977. Transport of galactose, glucose and their molecular analogues by *Escherichia coli* K12. *Biochem J*, 162(2), pp. 309-20.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P., Steele-Mortimer, O., Borg, J. P., Gorvel, J. P. and Meresse, S.** 2006. The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(36), pp. 13497-502.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. and Zychlinsky, A.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), pp. 2396-401.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. and Whittam, T. S.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(11), pp. 6175-81.
- High, N., Mounier, J., Prevost, M. C. and Sansonetti, P. J.** 1992. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *Embo J*, 11(5), pp. 1991-9.
- Hogema, B. M., Arents, J. C., Inada, T., Aiba, H., van Dam, K. and Postma, P. W.** 1997. Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 24(4), pp. 857-67.
- Hohmann, A. W., Schmidt, G. and Rowley, D.** 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect Immun*, 22(3), pp. 763-70.
- Hoiseth, S. K. and Stocker, B. A.** 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291(5812), pp. 238-9.
- Hwang, C., Sinskey, A. J. and Lodish, H. F.** 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*, 257(5076), pp. 1496-502.
- Island, M. D., Wei, B. Y. and Kadner, R. J.** 1992. Structure and function of the *uhp* genes for the sugar phosphate transport system in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 174(9), pp. 2754-62.
- Jeong, J. Y., Kim, Y. J., Cho, N., Shin, D., Nam, T. W., Ryu, S. and Seok, Y. J.** 2004. Expression of *ptsG* encoding the major glucose transporter is regulated by ArcA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 279(37), pp. 38513-8.
- Jepson, M. A. and Clark, M. A.** 2001. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect*, 3(14-15), pp. 1183-90.

- Jesenberger, V., Procyk, K. J., Yuan, J., Reipert, S. and Baccharini, M.** 2000. *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med*, 192(7), pp. 1035-46.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., Wang, J., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Zhang, X., Zhang, J., Yang, G., Wu, H., Qu, D., Dong, J., Sun, L., Xue, Y., Zhao, A., Gao, Y., Zhu, J., Kan, B., Ding, K., Chen, S., Cheng, H., Yao, Z., He, B., Chen, R., Ma, D., Qiang, B., Wen, Y., Hou, Y. and Yu, J.** 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res*, 30(20), pp. 4432-41.
- Johnson, T. J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S. J., Doetkott, C., Skyberg, J. A., Lynne, A. M., Johnson, J. R. and Nolan, L. K.** 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol*, 189(8), pp. 3228-36.
- Jones, B. D., Ghori, N. and Falkow, S.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med*, 180(1), pp. 15-23.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schar, J., Umesha, K. R., Luo, Q., Muller-Altrock, S. and Goebel, W.** 2008. Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 190(15), pp. 5412-30.
- Khoursandi, S., Scharlau, D., Herter, P., Kuhnen, C., Martin, D., Kinne, R. K. and Kipp, H.** 2004. Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4), pp. C1041-7.
- Kim, J. and Copley, S. D.** 2007. Why metabolic enzymes are essential or nonessential for growth of *Escherichia coli* K12 on glucose. *Biochemistry*, 46(44), pp. 12501-11.
- Kirkegaard, K., Taylor, M. P. and Jackson, W. T.** 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2(4), pp. 301-14.
- Knodler, L. A. and Steele-Mortimer, O.** 2005. The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Mol Biol Cell*, 16(9), pp. 4108-23.
- Knodler, L. A., Finlay, B. B. and Steele-Mortimer, O.** 2005. The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem*, 280(10), pp. 9058-64.
- Korner, H., Sofia, H. J. and Zumft, W. G.** 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev*, 27(5), pp. 559-92.
- Kotloff, K. L., Winickoff, J. P., Ivanoff, B., Clemens, J. D., Swerdlow, D. L., Sansonetti, P. J., Adak, G. K. and Levine, M. M.** 1999. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*, 77(8), pp. 651-66.

- Kralj, M., Husnjak, K., Korbler, T. and Pavelic, J.** 2003. Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. *Cancer Gene Ther*, 10(6), pp. 457-67.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. and Galan, J. E.** 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18), pp. 10225-30.
- Kuhle, V., Abrahams, G. L. and Hensel, M.** 2006. Intracellular *Salmonella enterica* redirect exocytic transport processes in a *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent manner. *Traffic*, 7(6), pp. 716-30.
- Kumar, Y. and Valdivia, R. H.** 2009. Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe*, 5(6), pp. 593-601.
- Lafont, F., Tran Van Nhieu, G., Hanada, K., Sansonetti, P. and van der Goot, F. G.** 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J*, 21(17), pp. 4449-57.
- Lafont, F. and van der Goot, F. G.** 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol*, 7(5), pp. 613-20.
- Lan, R. and Reeves, P. R.** 2002. *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of *Shigella*. *Microbes Infect*, 4(11), pp. 1125-32.
- Lan, R., Alles, M. C., Donohoe, K., Martinez, M. B. and Reeves, P. R.** 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun*, 72(9), pp. 5080-8.
- Le Gall, T., Mavris, M., Martino, M. C., Bernardini, M. L., Denamur, E. and Parsot, C.** 2005. Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *Microbiology*, 151(Pt 3), pp. 951-62.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G. and Hwang, S.** 2006a. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 123(3), pp. 273-80.
- Lee, C. H., Wu, C. L., Tai, Y. S. and Shiau, A. L.** 2005. Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* in combination with cisplatin for cancer therapy. *Mol Ther*, 11(5), pp. 707-16.
- Lee, C. L., Ow, D. S. and Oh, S. K.** 2006b. Quantitative real-time polymerase chain reaction for determination of plasmid copy number in bacteria. *J Microbiol Methods*, 65(2), pp. 258-67.
- Lemuth, K., Hardiman, T., Winter, S., Pfeiffer, D., Keller, M. A., Lange, S., Reuss, M., Schmid, R. D. and Siemann-Herzberg, M.** 2008. Global transcription and metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited fed-batch cultivations. *Appl Environ Microbiol*, 74(22), pp. 7002-15.

- Lengeler, J. W. and Jahreis, K.** 2009. Bacterial PEP-dependent carbohydrate: phosphotransferase systems couple sensing and global control mechanisms. *Contrib Microbiol*, 16, pp. 65-87.
- Lin, E. C.** 1970. The genetics of bacterial transport systems. *Annu Rev Genet*, 4, pp. 225-62.
- Lindgren, S. W., Stojiljkovic, I. and Heffron, F.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(9), pp. 4197-201.
- Lloyd, J. B.** 1996. Metabolite efflux and influx across the lysosome membrane. *Subcell Biochem*, 27, pp. 361-86.
- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C. and Yu, J.** 2005. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun*, 73(1), pp. 88-102.
- Luk, J. M., Kongmuang, U., Reeves, P. R. and Lindberg, A. A.** 1993. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol*, 31(8), pp. 2118-23.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A. and Baccarini, M.** 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol*, 181(11), pp. 3433-7.
- MacLachlan, P. R., Kadam, S. K. and Sanderson, K. E.** 1991. Cloning, characterization, and DNA sequence of the *rfaLK* region for lipopolysaccharide synthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol*, 173(22), pp. 7151-63.
- Mantis, N., Prevost, M. C. and Sansonetti, P.** 1996. Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 64(7), pp. 2474-82.
- Marquis, H., Bouwer, H. G., Hinrichs, D. J. and Portnoy, D. A.** 1993. Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect Immun*, 61(9), pp. 3756-60.
- Maurelli, A. T., Baudry, B., d'Hauteville, H., Hale, T. L. and Sansonetti, P. J.** 1985. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 49(1), pp. 164-71.
- Mavris, M., Page, A. L., Tournebize, R., Demers, B., Sansonetti, P. and Parsot, C.** 2002. Regulation of transcription by the activity of the *Shigella flexneri* type III secretion apparatus. *Mol Microbiol*, 43(6), pp. 1543-53.
- 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. and Wilson, R. K.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), pp. 852-6.

- McGhie, E. J., Hayward, R. D. and Koronakis, V.** 2004. Control of actin turnover by a *salmonella* invasion protein. *Mol Cell*, 13(4), pp. 497-510.
- McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D. and Koronakis, V.** 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol*, 12(1), pp. 117-24.
- McKenna, S., Beloin, C. and Dorman, C. J.** 2003. In vitro DNA-binding properties of VirB, the *Shigella flexneri* virulence regulatory protein. *FEBS Lett*, 545(2-3), pp. 183-7.
- McKinney, J. D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchetti, J. C., Jacobs, W. R., Jr. and Russell, D. G.** 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406(6797), pp. 735-8.
- Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. and Vasselon, T.** 1994a. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell*, 79(3), pp. 515-25.
- Menard, R., Sansonetti, P. and Parsot, C.** 1994b. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *Embo J*, 13(22), pp. 5293-302.
- Mercado-Lubo, R., Leatham, M. P., Conway, T. and Cohen, P. S.** 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infect Immun*, 77(4), pp. 1397-405.
- Merkel, T. J., Nelson, D. M., Brauer, C. L. and Kadner, R. J.** 1992. Promoter elements required for positive control of transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* gene. *J Bacteriol*, 174(9), pp. 2763-70.
- Metallo, C. M., Walther, J. L. and Stephanopoulos, G.** 2009. Evaluation of ¹³C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *J Biotechnol*, 144(3), pp. 167-74.
- Meyer, D., Schneider-Fresenius, C., Horlacher, R., Peist, R. and Boos, W.** 1997. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 179(4), pp. 1298-306.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. and Aderem, A.** 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via IpaF. *Nat Immunol*, 7(6), pp. 569-75.
- Milenbachs, A. A., Brown, D. P., Moors, M. and Youngman, P.** 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 23(5), pp. 1075-85.
- Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K. and Swanson, M. S.** 2006. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med*, 203(4), pp. 1093-104.

- Monack, D. M., Navarre, W. W. and Falkow, S.** 2001. *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect*, 3(14-15), pp. 1201-12.
- Munger, J., Bennett, B. D., Parikh, A., Feng, X. J., McArdle, J., Rabitz, H. A., Shenk, T. and Rabinowitz, J. D.** 2008. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol*, 26(10), pp. 1179-86.
- Munoz-Elias, E. J. and McKinney, J. D.** 2005. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence. *Nat Med*, 11(6), pp. 638-44.
- Munoz-Elias, E. J. and McKinney, J. D.** 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol*, 8(1), pp. 10-22.
- Nanchen, A., Schicker, A., Revelles, O. and Sauer, U.** 2008. Cyclic AMP-dependent catabolite repression is the dominant control mechanism of metabolic fluxes under glucose limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(7), pp. 2323-30.
- Neutra, M. R., Phillips, T. L., Mayer, E. L. and Fishkind, D. J.** 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res*, 247(3), pp. 537-46.
- Nicoletti, C.** 2000. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut*, 47(5), pp. 735-9.
- Nicoletti, M., Superti, F., Conti, C., Calconi, A. and Zagaglia, C.** 1988. Virulence factors of lactose-negative *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea in Somalia. *J Clin Microbiol*, 26(3), pp. 524-9.
- Niebuhr, K., Giuriato, S., Pedron, T., Philpott, D. J., Gaits, F., Sable, J., Sheetz, M. P., Parsot, C., Sansonetti, P. J. and Payrastre, B.** 2002. Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S.flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *Embo J*, 21(19), pp. 5069-78.
- Nikaido, H.** 1976. Outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. *Biochim Biophys Acta*, 433(1), pp. 118-32.
- Nonaka, T., Kuwabara, T., Mimuro, H., Kuwae, A. and Imajoh-Ohmi, S.** 2003. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology*, 149(Pt 9), pp. 2513-27.
- Noriega, F. R., Losonsky, G., Lauderbaugh, C., Liao, F. M., Wang, J. Y. and Levine, M. M.** 1996. Engineered Δ *guaB-A* Δ *virG* *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205: construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect Immun*, 64(8), pp. 3055-61.
- Norrby, S. R., Nord, C. E. and Finch, R.** 2005. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis*, 5(2), pp. 115-9.
- Ochman, H., Whittam, T. S., Caugant, D. A. and Selander, R. K.** 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Gen Microbiol*, 129(9), pp. 2715-26.

- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N. and Sasakawa, C.** 2005. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*, 307(5710), pp. 727-31.
- Olekhovich, I. N. and Kadner, R. J.** 2002. Mutational scanning and affinity cleavage analysis of UhpA-binding sites in the *Escherichia coli* *uhpT* promoter. *J Bacteriol*, 184(10), pp. 2682-91.
- Oliver, S. P., Gillespie, B. E. and Mathew, A. G.** 2002. A Rapid and Specific Test for *Salmonella* Serovars with Particular Reference to *Salmonella choleraesuis* serovar C1. Agricultural Experiment Station, The University of Tennessee, Knoxville, TN 37996, NPPC Project Identification Number: NPB # 01-107
- Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F.** 2002. Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*, 4(11), pp. 771-81.
- Page, A. L., Ohayon, H., Sansonetti, P. J. and Parsot, C.** 1999. The secreted IpaB and IpaC invasins and their cytoplasmic chaperone IpgC are required for intercellular dissemination of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol*, 1(2), pp. 183-93.
- Pappenheimer, J. R.** 1993. On the coupling of membrane digestion with intestinal absorption of sugars and amino acids. *Am J Physiol*, 265(3 Pt 1), pp. G409-17.
- Pappo, J. and Ermak, T. H.** 1989. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol*, 76(1), pp. 144-8.
- Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P. and Demers, B.** 2005. A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, 56(6), pp. 1627-35.
- Parsot, C.** 2009. *Shigella* type III secretion effectors: how, where, when, for what purposes? *Curr Opin Microbiol*, 12(1), pp. 110-6.
- Patel, J. C. and Galan, J. E.** 2005. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol*, 8(1), pp. 10-5.
- Patel, J. C. and Galan, J. E.** 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol*, 175(3), pp. 453-63.
- Penheiter, K. L., Mathur, N., Giles, D., Fahlen, T. and Jones, B. D.** 1997. Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol*, 24(4), pp. 697-709.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamouisis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G.,**

- Schwartz, D. C., Welch, R. A. and Blattner, F. R.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 409(6819), pp. 529-33.
- Perrin, A. J., Jiang, X., Birmingham, C. L., So, N. S. and Brumell, J. H.** 2004. Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr Biol*, 14(9), pp. 806-11.
- Pfannkuche, H. and Gabel, G.** 2009. Glucose, epithelium, and enteric nervous system: dialogue in the dark. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 93(3), pp. 277-86.
- Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Baxter, M. A., Harrington, A. T., Blocker, A. and Picking, W. D.** 2005. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect Immun*, 73(3), pp. 1432-40.
- Pizarro-Cerda, J. and Cossart, P.** 2009. *Listeria monocytogenes* membrane trafficking and lifestyle: the exception or the rule? *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, pp. 649-70.
- Plumbridge, J.** 1998a. Control of the expression of the *manXYZ* operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol*, 27(2), pp. 369-80.
- Plumbridge, J.** 1998b. Expression of *ptsG*, the gene for the major glucose PTS transporter in *Escherichia coli*, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose. *Mol Microbiol*, 29(4), pp. 1053-63.
- Poncet, S., Milohanic, E., Maze, A., Abdallah, J. N., Ake, F., Larribe, M., Deghmane, A. E., Taha, M. K., Dozot, M., De Bolle, X., Letesson, J. J. and Deutscher, J.** 2009. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol*, 16, pp. 88-102.
- Porco, A., Peekhaus, N., Bausch, C., Tong, S., Isturiz, T. and Conway, T.** 1997. Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli gntT* gene of GntI, the main system for gluconate metabolism. *J Bacteriol*, 179(5), pp. 1584-90.
- Posho, L., Delbos-Bocage, L., Gueylard, D., Farinotti, R. and Carbon, C.** 1998. Effects of *Salmonella typhimurium* infection and ofloxacin treatment on glucose and glutamine metabolism in Caco-2/TC-7 cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(11), pp. 2950-5.
- Postma, P. W.** 1977. Galactose transport in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 129(2), pp. 630-9.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), pp. 543-94.
- Pupo, G. M., Karaolis, D. K., Lan, R. and Reeves, P. R.** 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun*, 65(7), pp. 2685-92.

- Pupo, G. M., Lan, R. and Reeves, P. R.** 2000. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(19), pp. 10567-72.
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G. and Baumler, A. J.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. Infect Immun, 70(5), pp. 2249-55.
- Ramarao, N., Le Clainche, C., Izard, T., Bourdet-Sicard, R., Ageron, E., Sansonetti, P. J., Carlier, M. F. and Tran Van Nhieu, G.** 2007. Capping of actin filaments by vinculin activated by the *Shigella* IpaA carboxyl-terminal domain. FEBS Lett, 581(5), pp. 853-7.
- Ramsden, A. E., Holden, D. W. and Mota, L. J.** 2007. Membrane dynamics and spatial distribution of *Salmonella*-containing vacuoles. Trends Microbiol, 15(11), pp. 516-24.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. and Tang, C. M.** 2009. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. Nat Rev Microbiol, 7(5), pp. 333-40.
- Richter-Dahlfors, A., Buchan, A. M. and Finlay, B. B.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo*. J Exp Med, 186(4), pp. 569-80.
- Ripio, M. T., Brehm, K., Lara, M., Suarez, M. and Vazquez-Boland, J. A.** 1997. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. J Bacteriol, 179(22), pp. 7174-80.
- Rohwer, J. M., Meadow, N. D., Roseman, S., Westerhoff, H. V. and Postma, P. W.** 2000. Understanding glucose transport by the bacterial phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system on the basis of kinetic measurements *in vitro*. J Biol Chem, 275(45), pp. 34909-21.
- Rolland, K., Lambert-Zechovsky, N., Picard, B. and Denamur, E.** 1998. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* strains are derived from distinct ancestral strains of *E. coli*. Microbiology, 144 (Pt 9), pp. 2667-72.
- Römisch-Margl, W., Schramek, N., Radykewicz, T., Ettenhuber, C., Eylert, E., Huber, C., Romisch-Margl, L., Schwarz, C., Dobner, M., Demmel, N., Winzenhorlein, B., Bacher, A. and Eisenreich, W.** 2007. ¹³CO₂ as a universal metabolic tracer in isotopologue perturbation experiments. Phytochemistry, 68(16-18), pp. 2273-89.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X. J., Beuzon, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E. and Holden, D. W.** 2002. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. Mol Microbiol, 44(3), pp. 645-61.
- Runyen-Janecky, L. J. and Payne, S. M.** 2002. Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. Infect Immun, 70(8), pp. 4379-88.
- Rupp, J., Gieffers, J., Klinger, M., van Zandbergen, G., Wrase, R., Maass, M., Solbach, W., Deiwick, J. and Hellwig-Burgel, T.** 2007. *Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells. Cell Microbiol, 9(9), pp. 2181-91.

- Sansonetti, P. J., d'Hauteville, H., Formal, S. B. and Toucas, M.** 1982. Plasmid-mediated invasiveness of "Shigella-like" *Escherichia coli*. *Ann Microbiol (Paris)*, 133(3), pp. 351-5.
- Sansonetti, P. J., Hale, T. L., Dammin, G. J., Kapfer, C., Collins, H. H., Jr. and Formal, S. B.** 1983. Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. *Infect Immun*, 39(3), pp. 1392-402.
- Sansonetti, P. J., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A. T. and Mounier, J.** 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun*, 51(2), pp. 461-9.
- Sansonetti, P. J., Arondel, J., Cantey, J. R., Prevost, M. C. and Huerre, M.** 1996. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect Immun*, 64(7), pp. 2752-64.
- Sansonetti, P. J., Phalipon, A., Arondel, J., Thirumalai, K., Banerjee, S., Akira, S., Takeda, K. and Zychlinsky, A.** 2000. Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*, 12(5), pp. 581-90.
- Santapaola, D., Del Chierico, F., Petrucca, A., Uzzau, S., Casalino, M., Colonna, B., Sessa, R., Berlutti, F. and Nicoletti, M.** 2006. Apyrase, the product of the virulence plasmid-encoded *phoN2 (apy)* gene of *Shigella flexneri*, is necessary for proper unipolar IcsA localization and for efficient intercellular spread. *J Bacteriol*, 188(4), pp. 1620-7.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsois, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G. and Baumler, A. J.** 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*, 3(14-15), pp. 1335-44.
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C. and Howley, P. M.** 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13), pp. 5523-7.
- Scherer, C. A., Hantman, M. J. and Miller, S. I.** 1997. *Salmonella* invasion and delivery of protein effectors to mammalian cell cytoplasm. *Trends Microbiol*, 5(4), pp. 127-9.
- Schroeder, G. N. and Hilbi, H.** 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*, 21(1), pp. 134-56.
- Schwoppe, C., Winkler, H. H. and Neuhaus, H. E.** 2002. Properties of the glucose-6-phosphate transporter from *Chlamydia pneumoniae* (HPTcp) and the glucose-6-phosphate sensor from *Escherichia coli* (UhpC). *J Bacteriol*, 184(8), pp. 2108-15.
- Schwoppe, C., Winkler, H. H. and Neuhaus, H. E.** 2003. Connection of transport and sensing by UhpC, the sensor for external glucose-6-phosphate in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 270(7), pp. 1450-7.
- Seeto, S., Notley-McRobb, L. and Ferenci, T.** 2004. The multifactorial influences of RpoS, Mlc and cAMP on *ptsG* expression under glucose-limited and anaerobic conditions. *Res Microbiol*, 155(3), pp. 211-5.

- Shere, K. D., Sallustio, S., Manassis, A., D'Aversa, T. G. and Goldberg, M. B.** 1997. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Mol Microbiol*, 25(3), pp. 451-62.
- Shi, H., Bencze, K. Z., Stemmler, T. L. and Philpott, C. C.** 2008. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*, 320(5880), pp. 1207-10.
- Spory, A.** 2001. Untersuchungen zur Funktion des Regulatorproteins SlyA in enteroinvasiven *Escherichia coli* und in *Salmonella typhimurium*. Dissertation, Fakultät für Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Steele-Mortimer, O.** 2008. The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol*, 11(1), pp. 38-45.
- Stein, M. A., Leung, K. Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F. and Finlay, B. B.** 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol*, 20(1), pp. 151-64.
- Steinhauer, J., Agha, R., Pham, T., Varga, A. W. and Goldberg, M. B.** 1999. The unipolar *Shigella* surface protein IcsA is targeted directly to the bacterial old pole: IcsP cleavage of IcsA occurs over the entire bacterial surface. *Mol Microbiol*, 32(2), pp. 367-77.
- Stevens, M. P., Humphrey, T. J. and Maskell, D. J.** 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1530), pp. 2709-23.
- Stock, J. B., Waygood, E. B., Meadow, N. D., Postma, P. W. and Roseman, S.** 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. The glucose receptors of the *Salmonella typhimurium* phosphotransferase system. *J Biol Chem*, 257(23), pp. 14543-52.
- Stritzker, J., Janda, J., Schoen, C., Taupp, M., Pilgrim, S., Gentschev, I., Schreier, P., Geginat, G. and Goebel, W.** 2004. Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes aro* mutants. *Infect Immun*, 72(10), pp. 5622-9.
- Stritzker, J., Weibel, S., Hill, P. J., Oelschlaeger, T. A., Goebel, W. and Szalay, A. A.** 2007. Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *Int J Med Microbiol*, 297(3), pp. 151-62.
- Szeto, J., Namolovan, A., Osborne, S. E., Coombes, B. K. and Brumell, J. H.** 2009. *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. *Infect Immun*, 77(3), pp. 996-1007.
- Tchawa Yimga, M., Leatham, M. P., Allen, J. H., Laux, D. C., Conway, T. and Cohen, P. S.** 2006. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice. *Infect Immun*, 74(2), pp. 1130-40.
- Tobe, T., Nagai, S., Okada, N., Adler, B., Yoshikawa, M. and Sasakawa, C.** 1991. Temperature-regulated expression of invasion genes in *Shigella flexneri* is controlled through

the transcriptional activation of the *virB* gene on the large plasmid. *Mol Microbiol*, 5(4), pp. 887-93.

Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T. and Sasakawa, C. 1993. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *J Bacteriol*, 175(19), pp. 6142-9.

Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A. and Sansonetti, P. J. 1999. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J*, 18(12), pp. 3249-62.

Tsai, C. M. and Frasch, C. E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 119(1), pp. 115-9.

Ulukan, H., Muller, M. T. and Swaan, P. W. 2001. Downregulation of topoisomerase I in differentiating human intestinal epithelial cells. *Int J Cancer*, 94(2), pp. 200-7.

Valdez, Y., Ferreira, R. B. and Finlay, B. B. 2009. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr Top Microbiol Immunol*, 337, pp. 93-127.

Valdivia, R. H. and Falkow, S. 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, 22(2), pp. 367-78.

van der Velden, A. W., Lindgren, S. W., Worley, M. J. and Heffron, F. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect Immun*, 68(10), pp. 5702-9.

Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T. and Fang, F. C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401(6755), pp. 804-8.

Venkatesan, M. M., Alexander, W. A. and Fernandez-Prada, C. 1996. A *Shigella flexneri* invasion plasmid gene, *ipgH*, with homology to IS629 and sequences encoding bacterial sugar phosphate transport proteins. *Gene*, 175(1-2), pp. 23-7.

Verhamme, D. T., Arents, J. C., Postma, P. W., Crielaard, W. and Hellingwerf, K. J. 2001. Glucose-6-phosphate-dependent phosphoryl flow through the Uhp two-component regulatory system. *Microbiology*, 147(Pt 12), pp. 3345-52.

Verhamme, D. T., Postma, P. W., Crielaard, W. and Hellingwerf, K. J. 2002. Cooperativity in signal transfer through the Uhp system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184(15), pp. 4205-10.

Voetsch, A. C., Van Gilder, T. J., Angulo, F. J., Farley, M. M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P. R., Deneen, V. C. and Tauxe, R. V. 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis*, 38 Suppl 3, pp. S127-34.

Wang, J. Y., Pasetti, M. F., Noriega, F. R., Anderson, R. J., Wasserman, S. S., Galen, J. E., Sztein, M. B. and Levine, M. M. 2001. Construction, genotypic and phenotypic

characterization, and immunogenicity of attenuated Δ *guaBA* *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect Immun*, 69(8), pp. 4734-41.

Wang, L., Liu, D. and Reeves, P. R. 1996. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first step of O-antigen synthesis. *J Bacteriol*, 178(9), pp. 2598-604.

Wassef, J. S., Keren, D. F. and Mailloux, J. L. 1989. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immun*, 57(3), pp. 858-63.

Wasylnka, J. A., Bakowski, M. A., Szeto, J., Ohlson, M. B., Trimble, W. S., Miller, S. I. and Brumell, J. H. 2008. Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication. *Infect Immun*, 76(6), pp. 2722-35.

Watarai, M., Funato, S. and Sasakawa, C. 1996. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med*, 183(3), pp. 991-9.

Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M. and Baumler, A. J. 2005. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun*, 73(6), pp. 3358-66.

Weibel, S., Stritzker, J., Eck, M., Goebel, W. and Szalay, A. A. 2008. Colonization of experimental murine breast tumours by *Escherichia coli* K-12 significantly alters the tumour microenvironment. *Cell Microbiol*, 10(6), pp. 1235-48.

Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Sonnenberg, M. S. and Blattner, F. R. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), pp. 17020-4.

Winchester, B. G. 2001. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol*, 5 Suppl A, pp. 11-9.

Wright, E. M., Hirayama, B. A. and Loo, D. F. 2007. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med*, 261(1), pp. 32-43.

Yang, J., Nie, H., Chen, L., Zhang, X., Yang, F., Xu, X., Zhu, Y., Yu, J. and Jin, Q. 2007. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella* spp. *J Mol Evol*, 64(1), pp. 71-9.

Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T. and Sasakawa, C. 2002. *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *Embo J*, 21(12), pp. 2923-35.

Yoshida, S., Handa, Y., Suzuki, T., Ogawa, M., Suzuki, M., Tamai, A., Abe, A., Katayama, E. and Sasakawa, C. 2006. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading. *Science*, 314(5801), pp. 985-9.

Young, C. D. and Anderson, S. M. 2008. Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res*, 10(1), pp. 202.

Yu, G. Q. and Hong, J. S. 1986. Identification and nucleotide sequence of the activator gene of the externally induced phosphoglycerate transport system of *Salmonella typhimurium*. *Gene*, 45(1), pp. 51-7.

Zhou, D. and Galan, J. 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect*, 3(14-15), pp. 1293-8.

Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B. and Galan, J. E. 2001. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol*, 39(2), pp. 248-59.

Zychlinsky, A., Thirumalai, K., Arondel, J., Cantey, J. R., Aliprantis, A. O. and Sansonetti, P. J. 1996. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun*, 64(12), pp. 5357-65.

Abkürzungsverzeichnis

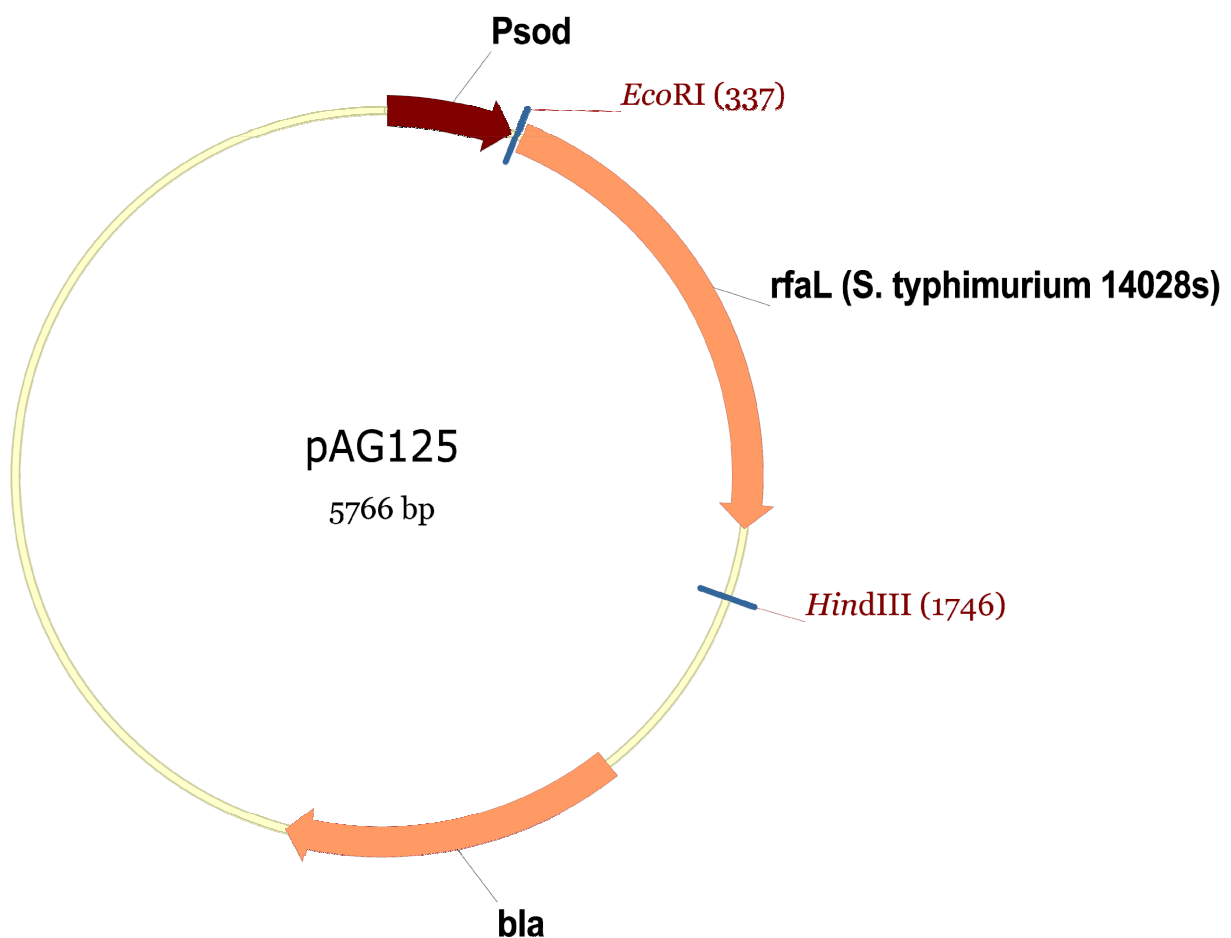
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	Transporter mit ATP-Bindekassette
Ala	Alanin
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Carb ^R	Carbenicillinresistenz
c. f. u.	koloniebildende Einheiten (colony forming units)
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ECL	enzymatische Chemielumineszenz
<i>EIEC</i>	enteroinvasiver <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometer
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanosin
Glc	Glukose
Glc6P	Glukose-6-phosphat
<i>gfp</i> , GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
h	Stunden
His	Histidin
Ile	Isoleucin
i. v.	intravenös
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani

Leu	Leucin
LMP	niedriger Schmelzpunkt
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
MACS [®]	magnetische Zellsortierung
Man	Mannose
min	Minuten
MOI	Infektionsrate (multiplicity of infection) [Bakterien pro Zelle]
NCTC	National Collection of Type Culture, London, UK
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
ORF	offenes Leseraster
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
p. i.	nach der Injektion oder nach der Infektion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pro	Prolin
PTS	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferasesystem
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SCV	<i>Salmonella</i> enthaltende Vakuole
Ser	Serin
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
s. o.	siehe oben
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Typhimurium
<i>Stm</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Typhimurium
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
subsp.	Unterart
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
T3SS	Typ III Sekretionssystem
Tyr	Tyrosin
U	Einheit(en)

[U- ¹³ C ₆]-Glukose	uniform markierte ¹³ C ₆ -Glukose
[U- ¹⁴ C ₆]-Glukose	uniform markierte ¹⁴ C ₆ -Glukose
ÜNK	Übernachtskultur
UTR	nicht translatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Vol.	Volumen, Volumina
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

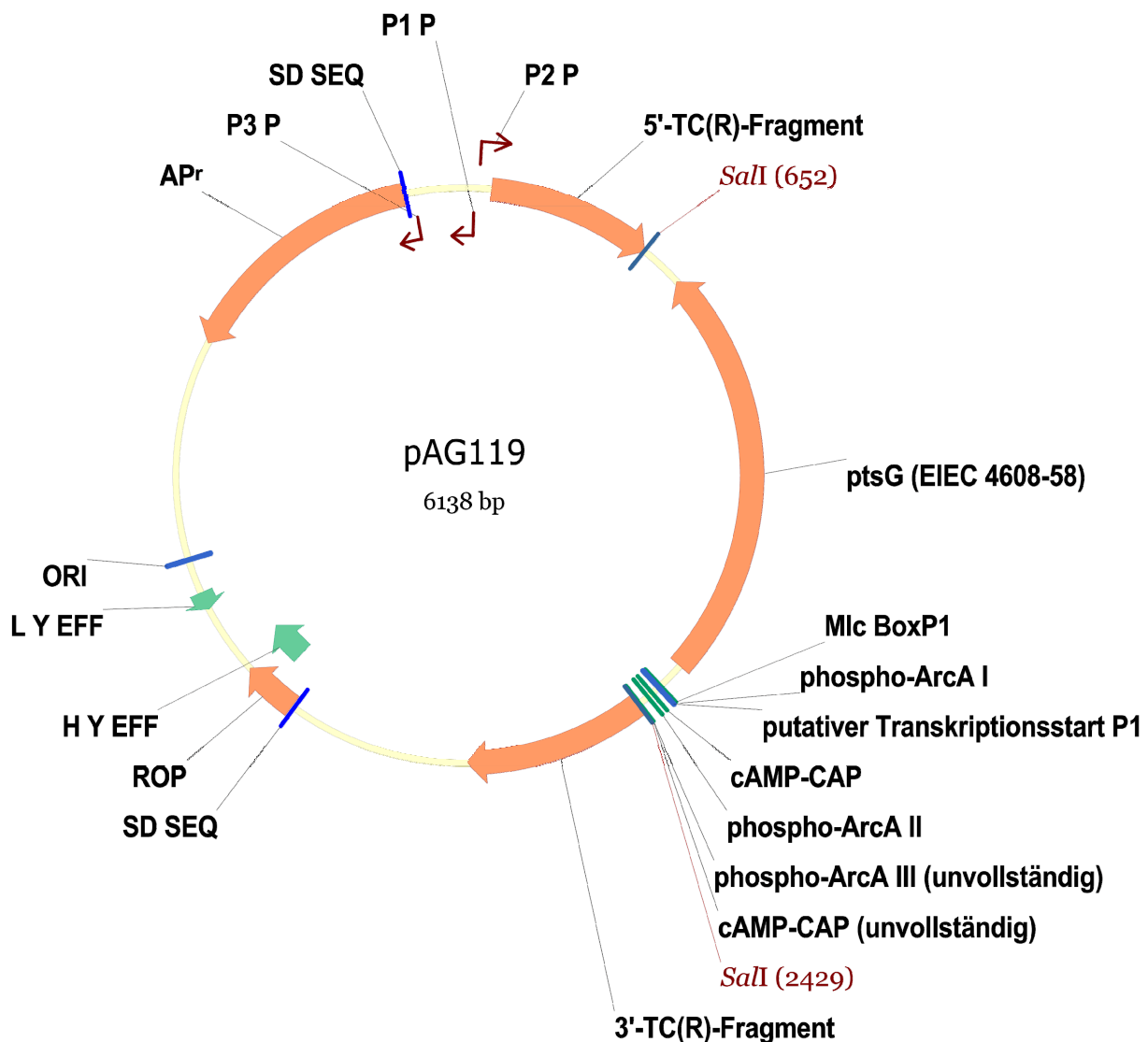
Anhang 1: Vektorkarte von pAG125

Nachfolgend ist das Plasmid pAG125 abgebildet. Durch Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde die kodierende Sequenz des wildtypischen *rfaL*-Gens der O-Antigen-Ligase aus *S. Typhimurium* 14028s von Position -11 bis +1392 relativ zum Translationsstartpunkt mittels PCR amplifiziert. Nach anschließendem Restriktionsverdau wurde das Fragment in die *EcoRI/HindIII*-Restriktionsschnittstelle von pMW- P_{sod} ligiert, einem Derivat von pMW211, in welches der listerielle *sod*-Promotor und eine neue multiple Klonierungsstelle eingefügt wurden (S. Weibel, nicht veröffentlicht).



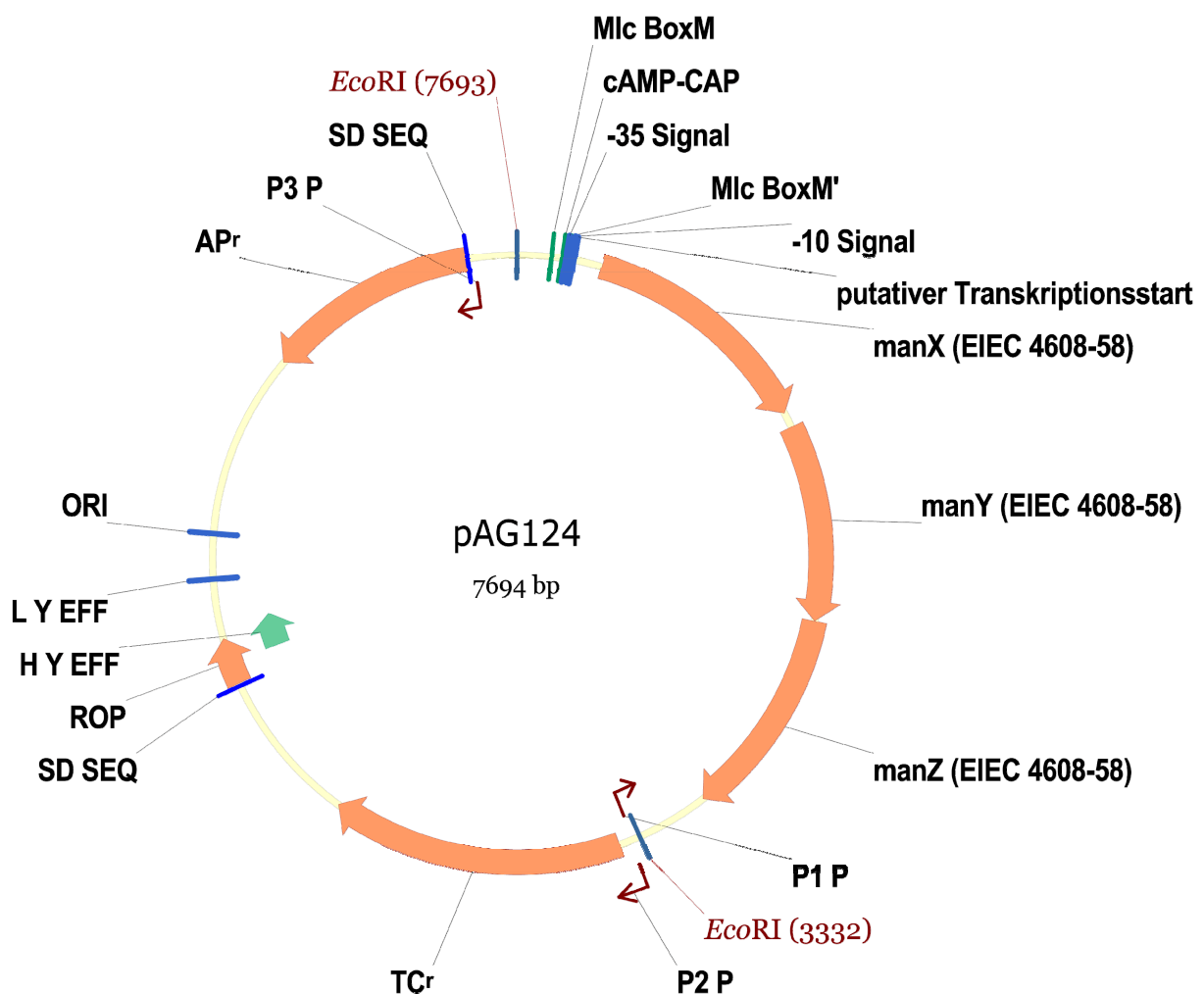
Anhang 2: Vektorkarte von pAG119

Nachfolgend ist das Plasmid pAG119 abgebildet. Durch Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde das wildtypische *ptsG*-Gen für EIICB^{Glc} aus *EIEC* 4608-58 von Position -88 bis +1683 relativ zum Transkriptionsstartpunkt P1 mittels PCR amplifiziert. Nach anschließendem Restriktionsverdau wurde das Fragment revers in die *SalI*-Restriktionsschnittstelle von pBR322 ligiert. Zusätzlich eingetragen sind die Bindestellen der bekannten Transkriptionsregulatoren Mlc, cAMP-CAP und phospho-ArcA sowie der vermutliche Transkriptionsstartpunkt P1 (Plumbridge, 1998b; Jeong *et al.*, 2004). Mangels eines geeigneten PCR-Produkts war die dritte Bindestelle von phospho-ArcA im Promotorbereich jedoch unvollständig und die zweite Bindestelle BoxP2 von Mlc fehlte zusammen mit dem Transkriptionsstartpunkt P2 vollständig.



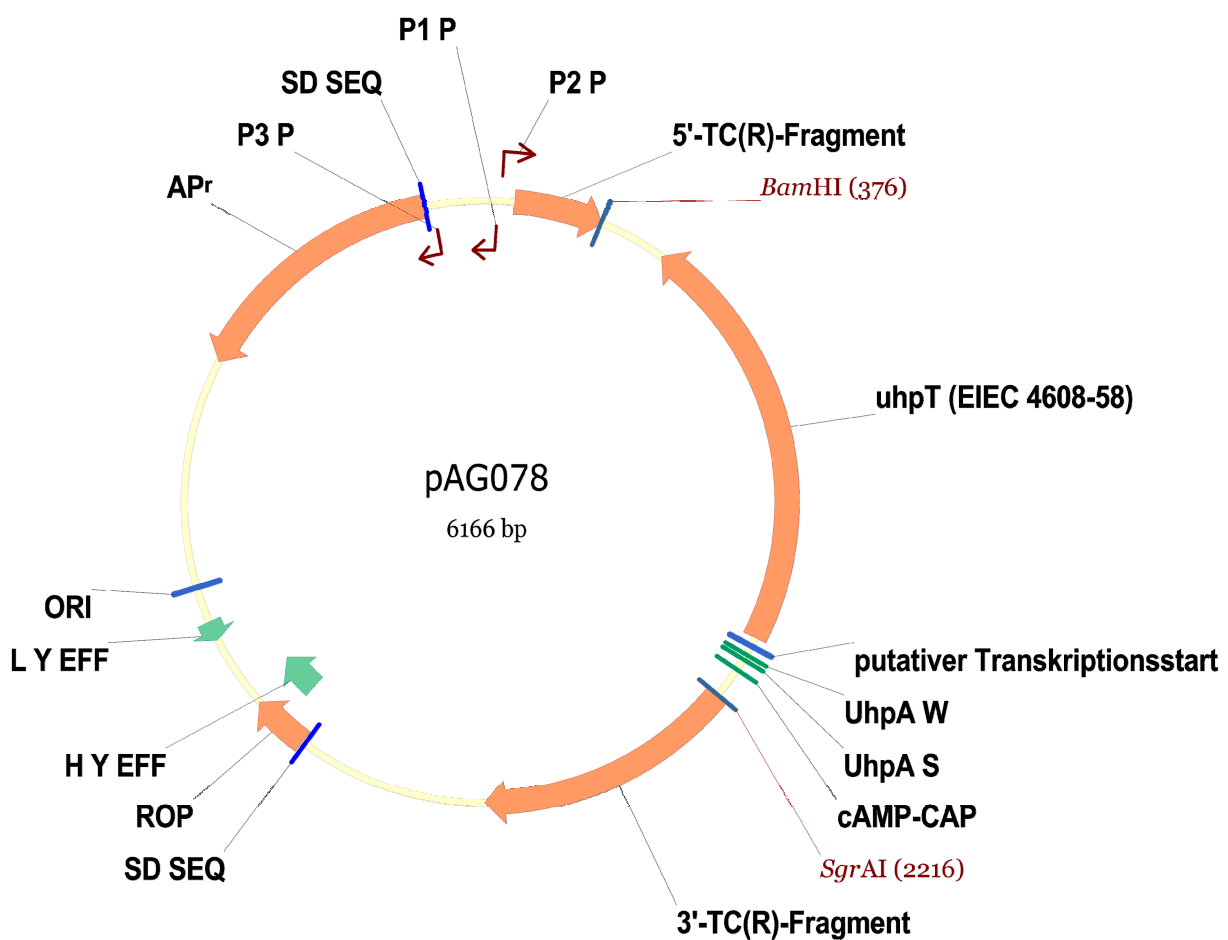
Anhang 3: Vektorkarte von pAG124

Nachfolgend ist das Plasmid pAG124 abgebildet. Durch Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde das wildtypische *manXYZ*-Operon für $EIIAB^{Man}$, IIC^{Man} und IID^{Man} aus *EIEC* 4608-58 von Position -214 bis +3113 relativ zum Transkriptionsstartpunkt mittels PCR amplifiziert. Nach anschließendem Restriktionsverdau wurde das Fragment in die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle von pBR322 ligiert. Zusätzlich eingetragen sind die Bindestellen der bekannten Transkriptionsregulatoren Mlc und cAMP-CAP sowie der vermutliche Transkriptionsstartpunkt (Plumbridge, 1998a).



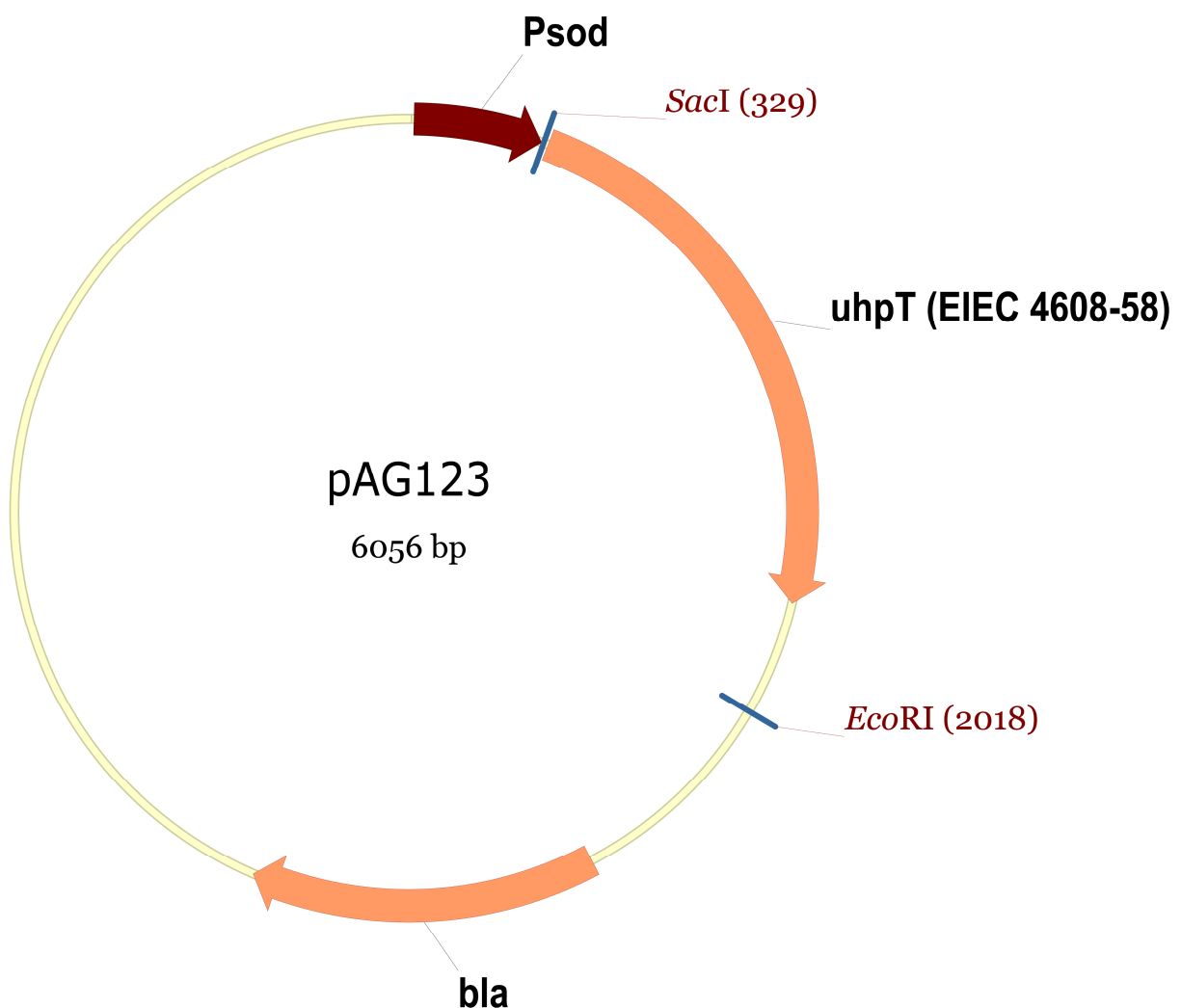
Anhang 4: Vektorkarte von pAG078

Nachfolgend ist das Plasmid pAG078 abgebildet. Durch Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde das wildtypische *uhpT*-Gen des Hexosephosphattransporters aus *EIEC* 4608-58 von Position -189 bis +1644 relativ zum Transkriptionsstartpunkt mittels PCR amplifiziert. Nach anschließendem Restriktionsverdau wurde das Fragment revers in die *Bam*HI/*Sgr*AI-Restriktionsschnittstelle von pBR322 ligiert. Zusätzlich eingetragen sind die Bindestellen der bekannten Transkriptionsregulatoren UhpA und cAMP-CAP sowie der vermutliche Transkriptionsstartpunkt (Merkel *et al.*, 1992; Olekhnovich and Kadner, 2002).



Anhang 5: Vektorkarte von pAG123

Nachfolgend ist das Plasmid pAG123 abgebildet. Durch Auswahl geeigneter Oligonukleotide wurde die kodierende Sequenz des wildtypischen *uhpT*-Gens aus *EIEC* 4608-58 von Position -11 bis +1676 relativ zum Translationsstartpunkt mittels PCR amplifiziert. Nach anschließendem Restriktionsverdau wurde das Fragment in die *SacI/EcoRI*-Restriktionsschnittstelle von pMW- P_{sod} ligiert, einem Derivat von pMW211, in welches der listerielle *sod*-Promotor und eine neue multiple Klonierungsstelle eingefügt wurden (S. Weibel, nicht veröffentlicht).



Anhang 6: Neue Sequenzen der deletierten Genloki in *S. typhimurium* 14028s

Es wurden stets nur Genabschnitte im Bereich des offenen Leserasters deletiert. Der 5'-UTR-Bereich mit Promotor, Transkriptions- und Translationsstart sowie der 3'-UTR-Bereich mit Translations- und Transkriptionsstopp blieben stets unverändert.

unterstrichen: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Amplifikation der Resistenzkassette (65mer) bzw. zur Kontrolle der Deletion (21mer) verwendet wurden.

gelb hinterlegt: durch die Deletion neu eingefügte „Narbensequenz“ mit neuer Ribosomenbindestelle und neuem Startcodon (beide rot hinterlegt). Das neu eingefügte Startcodon lag stets *in-frame* mit dem ursprünglichen Leseraster. Oberhalb der Sequenz sind das N-terminale und das C-terminale Polypeptid angegeben, wie es in der Mutante theoretisch synthetisiert werden sollte.

Sim Δrfc-Lokus:

```

1  GCAGTAGATA GGAGTGTTAA TGAGTGTTAA TATGTCAATA ACACGGTTTT GATATCGGGA AGATAGTGAT GAGTAATGAT TATAGACTAC CAGATTTCAGA
   CGTCATCTAT CCTCACAAAT ACTCACAAAT ATACAGTTAT TGTGCCAAA CTATAGCCCT TCTATCACTA CTCATTACTA ATATCTGATG GTCTAAGTCT
   +2
101 ATATCTTTGCC AGAAGATTTT CCGTACCACA CCTTATTTGC CTGATGGTAA TATTTTTAAT ACTAAGCATT TTTTCTAAAG GCTCTATATG CTTATAGTGT
   TATAGAACGG TCTTCTAAA GGCATGGTGT GGAATAAACG GACTACCATT ATAAAAATTA TGATTCTGTAA AAAAGATTTT CGAGATATAC GAATATCACA
   +2
   .***
201 AGGCTGGAGC TGCTTCGAAG TTCCTATACT TTCTAGAGAA TAGGAACTTC GGAATAGGAA CTAAGGAGGA TATTCATATG CTAAGAAAACA ATAAATAAGT
   TCCGACCTCG ACGAAGCTTC AAGGATATGA AAGATCTCTT ATCCTTGAAG CCTTATCCTT GATTCCTCCT ATAAGTATAC GATTCCTTGT TATTTATCA
301 TATACGGCGG CAATGCCGCC GTTTTATTTG GCTCTGAAGC GTAAAAATTG TTCCTGTAAA GCTTGTGGG TTTGCTGAGC CATCATTACC AACGTAAATT
   ATATGCCGCC GTTACGGCGG CAAAAATAAC CGAGACTTCG CATTTTAAAC AAGGACATTT CGAACAAACC AAACGACTCG GTAGTAATGG TTGCATTTAA
401 ACTTATGATA TATTCATGAT AGTGCTTGGC TTT
   TGAATACTAT ATAAGTACTA TCACGAACGC AAA

```

Stm ΔrfaL-Lokus:

1 TGCTCACCAG AACAGAACCT GGCGAATTTA GATGCCACAA GCGTATTTGG AAAGATTTCAT TAAAGAGACT CTGTCTCATC CCAAACCCTAT TGTGGAGAAA
ACGAGTGGTC TTGTCTTGG CCGCTTAAAT CTACGGTGTT CGCATAAAC TTTCTAAGTA ATTTCTCTGA GACAGAGTAG GGTTTGGATA ACACCTCTTT
 +1 Met Leu Thr Val *** Met Leu Arg
 101 AGATGCTAAC CGTGTAGGCT GGAGCTGCTT CGAAGTTTCTT ATACTTTCTA GAGAATAGGA ACTTCGGAAT AGGAACTAAG GAGGATATTC ATATGCTAAG
TCTACGATTG GCACATCCGA CCTCGACGAA GCTTCAAGGA TATGAAAGAT CTCTTATCCT TGAAGCCTTA TCCTTGATTC CTCCTATAAG TATACGATTC
 +1 Arg Asn Arg ***
 201 AAATAGATAA AAAAAAGCGC TGATACTTAT TACGGTATCA GCGCGTTTTT CATCATCAGG ACTCAAAC TTAATCAAAC AGTTTTTCAT TTGTTCCCTCG
TTTATCTATT TTTTGGCGG ACTATGAATA ATGCCATAGT CGCGCAAAA GTAGTAGTCC TGAGTTAGTG AATAGTTTTG TCAAAAAGTA AACAAAGGAGC
 301 AAACGCTGG CTACATTTT CCAACTGTAT TTTGAAAAACA CCAGGGATTT TGCTTTTTTCG GCAATCTGGT GCGGTTCCCTT ATCAGCA
TTTGGGACCG GAIGTAAAAG GGTTGACATA AAACTTTTGT GGTCCCTAAA ACGAAAAAGC CGTTAGACCA CCGCAAGGAA TAGTCGT

Stm ΔsifA-Lokus:

+2 ATGCGCCCGC AGTTGAGATA AAAAGGTTCG ATTTAATCAA TTATGTAGTC ATTTTACTC CAGTATAAGT GAGATTAATA TGCCGATTAC TATGTTAGG
TACGCGGGCG TCAACTCTAT TTTTCCCAGC TAAATTAGTT AATACATCAG TAAAAATGAG GTCATATTC ACTTAATTAT ACGGCTAATG ATACACATCC
 +2 Leu Glu Leu Leu Arg Ser Ser Tyr Thr Phe *** Met ***
 +1 CTGGAGCTGC TTCGAAAGTTC CTATACTTTC TAGAGAAATAG GAACTTCGGA ATAGGAACATA AGGAGGATAT TCATATGTAA AATCAGACGA CGCTTTCTCA
GACCTCGACG AAGCTTCAAG GATATGAAAG ATCTCTTATC CTTGAAGCCT TATCCCTGAT TCCTCCCTATA AGTATACATT TTAGTCTGCT GCGAAAGAGT
 101 GACGTCACGT TCAGGGTTTA CTCACGTACT TCCTGTTTGC CTACTGAGTA ACCTTTGCC AGGCACAATA ATGCCGCATA TGACCGGATC GGATGAGAAAT
CTGCAGTGCA AGTCCCAAAT GAGTGCATGA AGGACAAAACG GATGACTCAT TGGAGAACGG TCCGTGTTAT TACGGCGTAT ACTGGCTAG CCTACTCTTA
 201 AGTC
TCAG
 301

Stm ΔptsG-Lokus:

1 GCGTAAAGTT CACCGCACAA AAAGGGCGG TGAGCGAGCT TATGAAACA TTCGAAACT CATTTGGCA GAATGTGATA CTTTTAGGC TATCTGGCGC
 CGCATTTCAA GTGGCGGTGT TTTCCCGGCC ACTCGCTCGA ATACCTTTGT AAGCCTTTGA GTAAAACCGT CTTACACTAT GAAAAATCCG ATAGACCGCG

101 TGA AACGTGA TAGCCGTC AAACAAAATCAG ACGTATTTAT TTTACTCTGT GTAATAAATA AAAGGGCACT TAGATGTCTT GTCCACGGCG GGGTTCTCCC
 ACTTTGCACT ATCGGCAGTT TGTTTTAGTC TGCATAAATA AAATGAGACA CATTATTTAT TTTCCCGTGA ATCTACAGGA CAGGTGCCG CCCAAGAGGG

+3 Met Phe Lys Val ***

201 CCCTCGCAA TGCGTGAGAA CGTAGAAAAG CACAAAFACT CAGGAGCACT CTCAATTATG TTTAAGGTGT AGGCTGGAGC TGCCTCGAAG TTCTTATACT
 GGGAGCGGTT ACGCACTCTT GCATCTTTTC GTGTTTATGA GTCCCTCGTGA GAGTTAATAC AAATTCACA TCCGACCTCG ACGAAGCTTC AAGGATATGA

+3 Met Arg Asn Ser ***

301 TTCTAGAGAA TAGGAACCTC GGAATAGGAA CTAAAGGAGGA TATTCATATG CGTAAACAGCT AAGCAGTAAT GATGTTGGG AGAATTAAGG CAGCCATTCC
 AAGATCTCTT ATCCTTGAAG CCTTATCCTT GATTCCTCCT AFAAGTATAC GCATTTGTCGA TTCGTCAATTA CTACAACCCC TCTTAATTTCC GTCGGTAAAGC

401 GCTGCCTTT TTAATGGCG TTTACATGCC GCTCTCCGAC AGTCTGTCAG AACTGATAAT TGGCGGTGAG GCTGACGTTA CGCGGTGCCG CGTAAACAAT
 CGACGGAAAA AATTACCGG AAATGTACGG CGAGAGGCTG TCAGACAGTC TTGACTAATTA ACCGCCACTC CGACTGCAAT GCGCCACGGC GCATTTGTTA

501 GGAACCATCA ATATTGGTGT CGTAGGTTT ATCAAAACAGG TTGTTGATGT TTCCTGTAC GGAGAAAATTT TTCGTACCTT GATAGCGGT AAACAGATCG
 CCTTGGTAGT TATAACCACA GCATCCAAAA TAGTTGTCC AACAACACTACA AAGGGACATG CCTCTTTAAA AAGCAGTGA CTATCGCCA TTTGTCTAGC

601 ACCAGGGCAT AG
 TGGTCGGGTA TC

Stm ΔuhpT-Lokus:

+3 Met Leu Gly Val Gly Trp Ser

1 CGCTGTCGCA GGCCACTTTT CTTGTGGATT TTTACAAATGC CTGCCATTCG CAGGTATAAA AATTAGCTCA GGAGTAATCC ATGCTGGGTG TAGGCTGGAG
 GCGACAGCGT CCGGTGAAAA GGACACCTAA AAATGTTACG GACGGTAAAG GTCCATATTT TTAATCGAGT CCTCATTAGG TACGACCCAC ATCCGACCTC

+3 -SeiCys Phe Glu Val Pro Ile Leu Ser Arg Glu ***

+1 Met Val Asn Ile Ala ***

101 CTGCTTCGAA GTTCTTATAC TTTCTAGAGA ATAGGAACTT CGGAATAGGA ACTAAGGAGG ATATTCATAT GTTCAATATC GCTTAAATGT GTGCATTTGG
 GACGAAAGCTT CAAGGATATG AAGATCTCTT TATCTTTGAA GCCTTATCTT TGAATTCCTCC TATAAGTATA CCAGTTATAG CGAATTTACA CACGTAACCC

201 TAAAGTTTTG CCCGGCTTAA CGCCGGCTT TTTTATGCCT TGCGTTCGTC AGACAGGACA TCCGGGCTCT GCGGTAATATG AAGACAAGCG TTAATAAATC
 ATTGAAAAAC GGGCCGAAT GCGGCCGAA AAAATACGGA ACGCAAGCAG TCTGTCTCTGT AGGCCGAGA CCGCATTTAC TTTGTTCGC AATTATTAG

301 ACATCCCTGAC AGCCAGAAC GTCGAC
 TGTAGGACTG TCCGGTCTTG CAGCTG

Stm Δ manXYZ-Lokus

1 TCCATACAAC GGGCTGCTGC CCTATACCCC ATTCTAATTA AACGGAAGCT AAACATAACA GAGACAACCTG GTTTTTGGCA AAGATTTACC TTCCTTTTGC
AGGTAIGTTG CCCGACGAGC GGATATGGGG TAAGATTAA TTGCCTTCGA TTTGTATTGT CTCTGTTGAC CAAAAACCGT TTCTAAATGG AAGGAAACCGT

101 AAGAGATGTA ACCAGGATAT TTTACACTTC GAAATTTCTC ATTATCGAAA ACAAAATTAC GGATCTCCAT CACACAAAAAT ATTTTTTTTCG ATATCTAAAA
TTCTCTACAT TGGTCCCTATA AAATGTGAAG CTTTAAAGAG TAATAGCTTT TGTTTTAATG CCTAGAGGTA GTGTGTTTTA TAAAAAAGC TATAGATTTT

201 TAAATTCACGA AAATCATGGG TTTTTTCGTTG TAACCCTCAT CTGAAATCGAT TCGCTTGGCG ACGGCGATTTC AAAAAATACA TCTGTCAAGT TGATGTGTTG
ATTAAGTGCT TTTAGTACGC AAAAAGCAAC ATTGGGAGTA GACTTAGCTA AGCGAACGCC TGCCGGTAAG TTTTTTTATGT AGACAGTTCA ACTACACAAC

+2 Val Thr Ile Gly Val Gly Trp Ser Cys Phe Glu Val Pro Ile Leu Ser Arg Glu ***

301 ACAATAATAA AGGAGGTAGC AAGTGACCCAT TGGTGTAGGC TGGAGCTGCT TCGAAGTTCC TATACITTTCT AGAGAATAGG AACITTCGGAA TAGGAACATAA
TGTTATTATT TCCCTCCATCG TTCACTGGTA ACCACATCCG ACCTCGACGA AGCTTCAAGG ATAATGAAAAGA TCCTCTTATCC TTGAAGCCCTT ATCCITTGATT

+3 Met Gly Ile Ala Gly Tyr Ser Val Gly Leu Leu Gly Gln ***

401 GGAGGATATT CATATGGGTA TCGCCGGGCTA CTCCGTAGGA CTGCTGGGCC AGTAAGGCTG TTGTACACTA CCGGGGCCAA ACGGCCCCCGT TTTTTTATTTT
CCCTCCATAAA GTATACCCAT AGCGGCCGAT GAGGCATCCT GACGACCCGG TCATTTCCGAC AACATGTGAT GGCCCCGGTT TGCCCGGGGCA AAAAATAAAG

501 TCTGGAGGAT AAATGACTAT CACGGACCTG GTGCTGATTC TCTTTATTGC CGCATTATTG GCTTACGCTC TCTACGATCA GTTTCATCATG CCCCGTCCGCA
AGACCTCCTA TTTACTGATA GTGCCTGGAC CACGACTAAG AGAAATAACG CGGTAATAAC CGAATGCGAG AGATGCTAGT CAAGTAGTAC GGGGCAGCGT

601 ATGGCCCCAC TCTGCTTTCT ATAGCCCTGC TCCGCCGCGG TCGCGTAGAC AGCGTTATCT TCGTTGGGCT GGTCGCCATC CTTATTTATA ACAACGTAAC
TACCGGGGTG AGACGAAAGA TATCGGGACG AGCGGGCGCC AGCGCATCTG TCGCAATAGA AGCAACCCCGA CCAGCGGTAG GAATAAATAT TGTTGCATTG

701 CAGCCACGGA G
GTCGGTGCCT C

Stm Δg/k-Lokus

1 GCGATTAAAA CCAGGCTTGA CGCTACGCCA ATAATCAGCG CGGGAGCGA CAGCAGCAGC ATCGTTCGGG CACGCGGGTG GAACATAATC TCCTCCCTTAC
 CGCTAATTTT GGTCCGAACT GCGATGCGGT TATTAGTCGC GCCCCTCGCT GTCGTCGTCG TAGCAAGCCC GTGCGCCAC CTTGTATTAG AGAAGGAATG
 101 ACGGGGTCGT ATACCTATTT TGCACAGCCT GCCCGACGGC APTGCTGCAA TTGGTGTGTA AACAAAGAAAG TAAATCTGTG ATGAAGATCT ATATTTATAG
 TGCCCCAGCA TATGGATAAA ACGTGTGCGA CGGGCTGCCG TAAACGACGTT AACACAGACT TTGTTCTTTC APTAAGACAC TACTTCTAGA TATAAATATC
 +2 Met Thr Lys Val
 201 GCAGTCAGCC TGATGGCCGT TGTTGTTATG CCCCATGAA TTTACAGTGT GACAAAAGACT TATTTTGACT TTAGCGGAGC AGTAGAAGAA TGACAAAAGGT
 CGTCAGTCGG ACTACCGGCA ACAACAATAC GGGGTACTT AAATGTCACA CTGTTTCTGA ATAAAACCTGA AATCGCCTCG TCATCTTCTT ACTGTTTCCA
 +2 .Va *** Met Leu ***
 301 GTAGGCTGGA GCTGCTTCGA AGTTCCTATA CTTTCTAGAG AATAGGAACT TCGGAAATAGG AACTAAGGAG GATATTCATA TGCTATAAGC CAGATGGTGG
 CATCCGACCT CGACGAAAGCT TCAAGGATAT GAAAGATCTC TTATCCTTGA AGCCTTATCC TTGATTCCTC CTATAAGTAT ACGATATTCG GTCTACCACC
 401 CATAAACGCC TTATCCGGCC TACAAAAGTG TGTCACTGTG AGGCCTGATA AGCCAGCGT TATCAGGCAA TTAAACATTC TCTTGTCACT CTCAAAACCCG
 GTATTTGCGG AATAGGCCGG ATGTTTTTCC ACAGTAGACA TCCGACTAT TCCGCTCGCA ATAGTCCGTT AATTTGTAAG AGAACAGTCA GAGTTTGCGG
 501 GTGCCACG CCGTTTTTTT CATGCTCTTT CTTGTCATG AATGCTTCAA CTGTCCTGAAT TATTTCACTT TACTCTTGCT GAGCGAAAAG TCAAAACACCA
 CACGGAGTC GCCAAAAA GFAACGGAAA GGACACGTAC TTACGAAAGTT GACAGACTTA ATAAAAGTGA ATGAGAACGA CTCGCTTTC AGTTTGTGGT
 601 GCGCGTTGAG TCATCAGTC ATGGCGGTTA GTCAGGCGAA AACAGGGATT TATTTTACTA TACGTATCCG GTTCGCTGCC TTATTTACGG TTTCAT
 CCGGCAACTC AGTAGTGCAG TACCGCCAAAT CAGTCCGCTT TTGTCCTTAA ATAAAATGAT ATGCATAGG CAAAGCGACGG AATAAATGCC AAAGTA

Anhang 7: Neue Sequenzen der deletierten Genloki in *EIEC* 4608-58, *EIEC* HN280 und *E. coli* K-12

Es wurden stets nur Genabschnitte im Bereich des offenen Leserasters deletiert. Der 5'-UTR-Bereich mit Promotor, Transkriptions- und Translationsstart sowie der 3'-UTR-Bereich mit Translations- und Transkriptionsstopp blieben stets unverändert.

unterstrichen: Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Amplifikation der Resistenzkassette (65mer) bzw. zur Kontrolle der Deletion (21mer) verwendet wurden.

gelb hinterlegt: durch die Deletion neu eingefügte „Narbensequenz“ mit neuer Ribosomenbindestelle und neuem Startcodon (beide rot hinterlegt). Das neu eingefügte Startcodon lag stets *in-frame* mit dem ursprünglichen Leseraster. Oberhalb der Sequenz sind das N-terminale und das C-terminale Polypeptid angegeben, wie es in der Mutante theoretisch synthetisiert werden sollte.

E. coli Δ *ptsG*-Lokus:

```

1  TGGGGGGTGA ATAACCACCGT TTGAAATATT GTGACATATG TTTTGTCAA ATGTGCAACT TCTCCAATGA TCTGAAGTTG AAACGTGATA GCCGTCAAA
ACCCGCCACT TATTGGTGCA AACTTATAA CACGTATAC CACTGTATAC AAAAACAGTTT TACACGTTGA AGAGGTTACT AGACTTCAAC TTTGCACTAT CGGCAGTTTG
101 AAATTGGCAC TGAATTATTT TACTCTGTGT AATAAATAAA GGCGGCTTAG ATGCCCTGTA CACGGCGAGG CTCTCCCCCC TTGCCACGGC TGAGAACGTA
TTTAACCGTG ACTTAATAAA ATGAGACACA TTATTTATTT CCCGCGAATC TACGGGACAT GTGCCGCTCC GAGAGGGGG AACGGTGCCG ACTCTTGCA
+1
201 AAAAAAGCAC CCATACTCAG GAGCACTCTC AATTATGTTT AAGAATGCAG TGTAGGCTTGG AGCTGTCTCG AAGTTCCCTAT ACTTTTCTAGA GAATAGGAAC
TTTTTTTCGTG GGTATGAGTC CTCGTGAGAG TTAATACAAA TTCTTACGTC ACATCCGACC TCGACGAAGC TTCAAGGATA TGAAAGATCT CTTATCCTTG
+1
301 TTCGGAATAG GAACTAAGGA GGATATTCAT ATGCGTAACC ACTAATCCGT AAGACGTTGG GGAGACTAAG GCAGCCAGAT GGCTGCCTTT TTTACAGGTG
AAGCCTTATC CTTGATTCCT CCTATAAGTA TACGCAATTGG TGATTAGGCA TTCTGCAACC CCCTGATTC CGTCGGICTA CCGACGGAAA AAATGTCCAC
401 TTATTCAGAA TTGATACGTG CCGGTAATGC TGAAATTACG CGGTGTCCG TAGACGATAG AACCTTCCAC GTGGTATCG TAGGTTTTGT CGAACAGGTT
AATAAGTCTT AACATATGCAC GGCCATTACG ACTTTAATGC GCCACACGGC ATCTGCTATC TTGGAAAGGTG CAACCATAGC ATCCAAAACA GCTTGTCCAA
501 ATTGACGTTT CCCTGTAACG AGAAGTTTTT CGTCACCTGG TAGCGGGTGA AGAGATCCAC CAGCGCGTAG CTACCTTGCT CGGCGCGGAA GGTGCCATAC
TAAC TGCAAG GGGACATTGC TCTTCAAAAA GCAGTGGACC ATCGCCCACT TCTCTAGGTG GTGCGGCATC GATGGAACGA GCCGCGCCTT CCACGGTATG
601 GGCGTCACGG TGTCGGTATA CACGCGA
CCGCAGTGCC ACAGCCATAT GTGCGCT

```

E. coli Δ manXYZ-Lokus:

1 CGGTGACGAT CCATACTGG GGCTACTGCC CTATACTCCA TGGTTGTAA ACGGGAGTTA AACATATCAG AGACGCCCTCT GATTTGGCAA AGATTTACCT
GCCACTGCTA GGTATGACG CCGATGACGG GATATGAGGT ACCAACAATT TGCCCTCAAT TTGTATAGTC TCTGCGGAGA CTAAACCCGT TCATAAATGGA
 101 TCCTTTGCAA ACGAATGTGA CAAGGATATT TTACCTTTCCG AAATTTCTGC TAATCGAAA TTAAATTAACG GATCTTCATC ACATAAAAATA ATTTTTTCGA
AGGAAACGTT TGCTTACACT GTTCCTATAA AATGGAAAAGC TTTAAAGACG ATTAGCTTTC AAITTTAATGC CTAGAAGTAG TGTATTTTTAT TAAAAAAGCT
 201 TATCTAAAAAT AAATCGCGAA ACGCAGGGGT TTTTGGTTGT AGCCCTTATC TGAAATCGATT CGATTTGTTGA CGACGATTTCA AAAATACATC TGGCACCGTTG
ATAGATTTTA TTTAGCGCTT TGCGTCCCCA AAAACCAACA TCGGGAATAG ACTTAGCTAA GCTAACACCT GCTGCTAAGT TTTTATGTAG ACCGTGCAAC
 +1
 301 AGGTGTTAAC GATAATAAAG GAGGTAGCAA GTGGTGTAGG CTGGAGCTGC TTCGAAGTTC CTATACITTC TAGAGAATAG GAACITTCGG ATAGGAACATA
TCCACAATTG CTATTATTTC CTCCATCGTT CACCACATCC GACCTCGACG AAGCTTCAAG GATATGAAAAG ATCTCTTATC CTTGAAGCCCT TATCCCTTGAT
 +1
 401 AGGAGGATAT TCATATGCTG CTGGGACTGT AAGACTGTTG TACACTACCG GGGCCTTTTG GCCCCGTTTTT TTTTATCTGGA GGATTAATGA CAATCACGGA
TCCCTCCATA AGTATACGAC GACCTTGACA TTCTGACAAC ATGTGATGGC CCCGGAAAAC CGGGGCAAAA AAATAGACCT CCTAATTACT GTTAGTGCCT
 501 CCTGGTACTG ATTCTTTTCA TCGCCGCACT CCTGGCCTTC GCGATCTACG ATCAGTTTCAI CATGCCCCGC CGTAAACGGCC CCACCCTGCT GGCAATTCCT
GGACCATGAC TAAGAAAAGT AGCGGCGTGA GGACCCGGAAG CGCTAGATGC TAGTCAAGTA GTACGGGGCG GCAITGGCCGG GGTGGGACGA CCGTTAAGGA
 601 TTGCTCCGGC GTGGTCGCAT CGATAGCGTT ATCTTCGTCG GATTGATTGT CATTCCTTATC TATAACAACG TCACGGAATCA TGGTGCCTTA ATAACGACAT
AACGAGGCCG CACCAGCGTA GCTATCGCAA TAGAAGCAGC CTAACTAACA GTAAGAATAG ATATTGTTGC AGTGCTTAGT ACCACGCCAAT TATTGCTGTA
 701 GGTTATTAAG CGCACTGGCT CTGATGGGTT
CCAATAATTTC GCGTGACCGA GACTACCCCAA

E. coli Δ *uhpT*-Lokus

1 TTGTGGTTAT CTCTATCGCC GCCGGGATTT CCGCACTGCT GTTACTGCCC TTTTGTGAACG CCCAGACACC GCGCGAAGCG TGATGCATCT CACCTTTTCA
AACACCAATA GAGATAGCGG CGGCCCTAAA GCGGTGACGA CAATGACGGG AAAAACTTGC GCGCTTGG CGCGCTTCGC ACTACGTAGA GTGGAAAAAGT
 101 CTTCATATCC GGCAAAACTA AGAAATTTTC CAGGTTTTGC CTGGACGCTA TCTCAGGCCT GATTTGCTGC TGATTTTTAC AATGCATGCC TCACGCAGGT
GAAGTATAGG CCGTTTTGAT TCTTTAAAAG GTCCAAAACG GACCTGGGAT AGAGTCCGGA CTAAAACGACG ACTAAAAATG TTACGTACGG AGTGCCTCCA
 +2 Met Leu Ala Phe Leu Ser Val Gly Trp Ser Cys Phe Glu Val Pro Ile Leu Ser Arg Glu ***
 201 ATTCAATTCA GGAGTAACCC ATGCTGGCTT TCTTAAAGTGT AGGCTGGAGC TGCCTCGAAG TTCTTATACT TTCTAGAGAA TAGGAACITTC GGAATAGGAA
TAAGTAAAGT CCTCATTTGG TACGACCGAA AGAATTCACA TCCGACCTCG ACGAAGCTTC AAGGATATGA AAGATCTCTT ATCCTTTGAAG CCTTATCCIT
 +3 Met Val Ala ***
 301 CTAAGGAGGA TATTCATATG GTGGCATAAA CGTAACTGGT GACTTTTTGCC CGGCATGACG CCGGGCTTTT TTTTATTATC CGTGACTTCC AGCGTAGTGA
GATTCCTCCT ATAAGTATAC CACCGTATTT GCATTGACCA CTGAAAACGG GCCGTACTGC GGCCCGAAAA AAATAATAAG GCACCTGAAGG TCGCATCACT
 401 AGGCAAACTT CTCGCCATCA AATAGCCCCCT GACTGGTTAG TTTTAGCGCG GGGATCACTG GCAGAGAAAAG AAACGCCATC TGAATAAACG GCTCATCGGG
TCCGTTTTGAA GAGCGGTAGT TTATCGGGGA CTGACCAATC AAAATCGCGC CCCTAGTGAC CGTCTCTTTC TTTGCGGTAG ACTTATTTGC CGAGTAGGCC
 501 TAACGGACCG CATTACGGG CGGCGGCTTT CAAGGCGTCA ATTTGTTCCG CCA
ATTGCCTGGC GTAAGTGCCC GCCGCCGAAA GTTCCGCAGT TAAACAAGGC GGT

Anhang 8: Vergleich offenen Leseraster von *pgtP* aus *E. coli* APEC O1, *EIEC* 4608-58 und *EIEC* HN280

gelb hinterlegt: identische Basen

blau hinterlegt: in zwei Stämmen konserviert, aber zum dritten verschieden

Mutationen die einen Aminosäureaustausch im Protein bewirken sind gerahmt, die Art der Mutation ist angegeben.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	ATGTTATCA	ATAATTTAA	AAACGGGG	CAAGCGGG	GGGATAGT	GTCCGGGG	GAGAAAAT	TCAGGTGACA	TATCGTCGCT	ATCGTATGCA
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	ATGTTATCA	ATAATTTAA	AAACGGGG	CAAGCGGG	GGGATAGT	GTCCGGGG	GAGAAAAT	TCAGGTGACA	TATCGTCGCT	ATCGTATGCA
<i>pgtP</i> EIEC HN280	ATGTTATCA	ATAATTTAA	AAACGGGG	CAAGCGGG	GGGATAGT	GTCCGGGG	GAGAAAAT	TCAGGTGACA	TATCGTCGCT	ATCGTATGCA
										R24H
										G8V
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	TTACTTAG	CGGTAAT	TCTGGG	TATCTTGC	TACTATAT	CGTGCCTA	TATCAACG	CTTATATCA	ACGCTTAT	CTTTAAAG
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	TTACTTAG	CGGTAAT	TCTGGG	TATCTTGC	TACTATAT	CGTGCCTA	TATCAACG	CTTATATCA	ACGCTTAT	CTTTAAAG
<i>pgtP</i> EIEC HN280	TTACTTAG	CGGTAAT	TCTGGG	TATCTTGC	TACTATAT	CGTGCCTA	TATCAACG	CTTATATCA	ACGCTTAT	CTTTAAAG
										L50Stopp
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	CTCAGCGC	CACACAAA	TTGGCGT	ACTGAGT	AGTGTAT	GCTTATCG	CTATGGT	TATCAGC	AAAAGACT	GATGAGT
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	CTCAGCGC	CACACAAA	TTGGCGT	ACTGAGT	AGTGTAT	GCTTATCG	CTATGGT	TATCAGC	AAAAGACT	GATGAGT
<i>pgtP</i> EIEC HN280	CTCAGCGC	CACACAAA	TTGGCGT	ACTGAGT	AGTGTAT	GCTTATCG	CTATGGT	TATCAGC	AAAAGACT	GATGAGT
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	GCCAGTCC	GAAAAGT	CTTTATG	GGCGTGT	GGGCTGT	TATGTGCC	ATCGTTAA	CGTTAA	CGTTGGC	CTGGGAT
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	GCCAGTCC	GAAAAGT	CTTTATG	GGCGTGT	GGGCTGT	TATGTGCC	ATCGTTAA	CGTTAA	CGTTGGC	CTGGGAT
<i>pgtP</i> EIEC HN280	GCCAGTCC	GAAAAGT	CTTTATG	GGCGTGT	GGGCTGT	TATGTGCC	ATCGTTAA	CGTTAA	CGTTGGC	CTGGGAT
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	GCGGCAT	TGGTTA	TTCTGAA	TGGTCTTT	TCCAGGGA	ATGGGCGT	TGGTCC	TTTTCAT	CACTAT	TGCTAACT
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	GCGGCAT	TGGTTA	TTCTGAA	TGGTCTTT	TCCAGGGA	ATGGGCGT	TGGTCC	TTTTCAT	CACTAT	TGCTAACT
<i>pgtP</i> EIEC HN280	GCGGCAT	TGGTTA	TTCTGAA	TGGTCTTT	TCCAGGGA	ATGGGCGT	TGGTCC	TTTTCAT	CACTAT	TGCTAACT
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	CGTGGT	TCGGGT	TGGTCT	TTCTGG	AAATAT	CTCTCATA	AACTCG	GGTGGT	GGTAT	TGTTGGT
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	CGTGGT	TCGGGT	TGGTCT	TTCTGG	AAATAT	CTCTCATA	AACTCG	GGTGGT	GGTAT	TGTTGGT
<i>pgtP</i> EIEC HN280	CGTGGT	TCGGGT	TGGTCT	TTCTGG	AAATAT	CTCTCATA	AACTCG	GGTGGT	GGTAT	TGTTGGT
										I164V
<i>pgtP</i> E. coli APEC01	GGCAGCG	GACACT	GGCAAA	GTGCGG	ATATAT	CTGGTCC	GCGCTG	GCCTG	GCCTG	CGTAA
<i>pgtP</i> EIEC 4608-58	GGCAGCG	GACACT	GGCAAA	GTGCGG	ATATAT	CTGGTCC	GCGCTG	GCCTG	GCCTG	CGTAA
<i>pgtP</i> EIEC HN280	GGCAGCG	GACACT	GGCAAA	GTGCGG	ATATAT	CTGGTCC	GCGCTG	GCCTG	GCCTG	CGTAA

pgtP E. coli APEC01	631	640	650	660	670	680	690	700	710	720
pgtP EIEC 4608-58	TCCCCACA	TCAGGAAAGGTTCTA	CCCTC	TCTGGAAAGAGATGATGCCCGGAAAGAAAAGTCGTCCTGAAATA	CCCGACAGACCGGTA	AAAAAGCACCA				
pgtP EIEC HN280	TCCCCACG	TCAGGAAAGGTTCTG	CCCTC	CTGGAAAGAGATGATGCCCGGAAAGAAAAGTCGTCCTGAAATA	CCCGACAGACCGGTA	AAAAAGCACCA				
	H213R									
pgtP E. coli APEC01	721	730	740	750	760	770	780	790	800	810
pgtP EIEC 4608-58	GAAAAACATGAGCGCC	TTTCAGATTTTCTGCAC	TTTATGATATACGCCAA	TAAAAATGCCTGGTATGTC	TCACTGTTGAC	GTATTTGTATAC				
pgtP EIEC HN280	GAAAAACATGAGCGCC	TTTCAGATTTTCTGCAC	TTTATGATATACGCCAA	TAAAAATGCCTGGTATGTC	TCACTGTTGAC	GTATTTGTATAC				
pgtP E. coli APEC01	811	820	830	840	850	860	870	880	890	900
pgtP EIEC 4608-58	ATGGTGGCTTCGGGATG	ATTAGCTGGTTGCCTAT	TTTATCTGCTGACGGTGA	AAACATTTTCA	AAAGAACAAAAT	GAGCGTCGCA	TTTTTTA			
pgtP EIEC HN280	ATGGTGGCTTCGGGATG	ATTAGCTGGTTGCCTAT	TTTATCTGCTGACGGTGA	AAACATTTTCA	AAAGAACAAAAT	GAGCGTCGCA	TTTTTTA			
pgtP E. coli APEC01	901	910	920	930	940	950	960	970	980	990
pgtP EIEC 4608-58	TTTTTTGAAATGGGCGG	CATCCCTTCCACGCTACT	TGGCTGTTGGTTGT	CTCAGACAAAAC	TGTTAAAGGGCGT	CGTATGCCAT	TGGCGGATG			
pgtP EIEC HN280	TTTTTTGAAATGGGCGG	ATCCCTTCCACGCTACT	TGGCTGTTGGTTGT	CTCAGACAAAAC	TGTTAAAGGGCGT	CGTATGCCAT	TGGCGGATG			
pgtP E. coli APEC01	991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
pgtP EIEC 4608-58	ATTTGTATGGCGCTGA	TTTTTCATTTGCCCTGAT	TGGCTACTGGAAAAGTGA	ATCGT	TGTTTATGGTGACA	ATTTTGTGCTGCCAT	TGTTGGT			
pgtP EIEC HN280	ATTTGTATGGCGCTGA	TTTTTCATTTGCCCTGAT	TGGCTACTGGAAAAGTGA	ATCGT	TGTTTATGGTGACA	ATTTTGTGCTGCCAT	TGTTGGT			
pgtP E. coli APEC01	1081	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
pgtP EIEC 4608-58	TGCTGTGATTTACGTTCC	ACAATTTCTGGCTTC	CGTTCCAGACTATGGAG	ATCGTCCAGCTTT	TGCTGTTGGCTCCG	CGGTAGGTTACGT				
pgtP EIEC HN280	TGCTGTGATTTACGTTCC	ACAATTTCTGGCTTC	CGTTCCAGACTATGGAG	ATCGTCCAGCTTT	TGCTGTTGGCTCCG	CGGTAGGTTACGT				
pgtP E. coli APEC01	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
pgtP EIEC 4608-58	GGTTTTATGAGCTATA	ICTTCGGTGCATCTCT	GGGCAACAGCCCTG	TTGGTATATGGTCGAT	CATATTTGGCTGG	CGATGGCGGATTTTAT				
pgtP EIEC HN280	GGTTTTATGAGCTATA	ICTTCGGTGCATCTCT	GGGCAACAGCCCTG	TTGGTATATGGTCGAT	CATATTTGGCTGG	CGATGGCGGATTTTAT				
pgtP E. coli APEC01	1261	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350
pgtP EIEC 4608-58	CTTCTTGGCTGCGGGT	ATATTTGTTGCATCAT	TTTTTGTGCTGGT	TATCACATCGTGGTGC	AAATTGAACTTTG	AACCGTCA	CAGAGCCGCATAT			
pgtP EIEC HN280	CTTCTTGGCTGCGGGT	ATATTTGTTGCATCAT	TTTTTGTGCTGGT	TATCACATCGTGGTGC	AAATTGAACTTTG	AACCGTCA	CAGAGCCGCATAT			
pgtP E. coli APEC01	1351	1365								
pgtP EIEC 4608-58	ATAAAAAGAC	CACTGA								
pgtP EIEC HN280	ATAAAAAGAC	CACTGA								

Anhang 9: Vergleich der Proteinsequenzen von PgtP aus *S. Typhimurium* LT2, *EIEC* 4608-58 und *EIEC* HN280

gelb hinterlegt: identische AS

blau hinterlegt: in zwei Stämmen konserviert, aber zum dritten nur ähnlich oder verschieden

grün hinterlegt: in *Stm* ähnliche AS wie bei den *EIEC*

das offene Leseraster von *EIEC* HN280 besitzt an der AS-Position 50 ein Stoppcodon (TGA)

	1	10	20	30	40	50
PgtP <i>Stm</i> LT2	MLTILKTGQSAHKVPPEKVAQTYGRYRIQALLSVFLGYLAYYIVRNNFTL					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	MLSIFKTVQAADSVPAEKIQVTYHRYRMQALLSVFLGYLAYYIVRNNFTL					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	MLSIFKTVQAADSVPAEKIQVTYHRYRMQALLSVFLGYLAYYIVRNNFT-					
	51	60	70	80	90	100
PgtP <i>Stm</i> LT2	STPYLKEQLDLSATQIGLLSSCMLIAYGISKGVMSLADKASPKVFMACG					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	STPYLKEQLDLSATQIGVLLSSCMLIAYGISKGVMSLADKASPKVFMACG					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	50 STPYLKEQLDLSATQIGVLLSSCMLIAYGISKGVMSLADKASPKVFMACG					
	101	110	120	130	140	150
PgtP <i>Stm</i> LT2	LVLCAIVNVGLGFSSAFWIFAALVVFNGLFQGMGVGPSFITIANWFPRE					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	LVLCAIVNVGLGFSTAFWIFAALVILNGLFQGMGVGPSFITIANWFPRE					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	100 LVLCAIVNVGLGFSTAFWIFAALVILNGLFQGMGVGPSFITIANWFPRE					
	151	160	170	180	190	200
PgtP <i>Stm</i> LT2	RGRVGAFWNISHNVGGGIVAPIVGAFAALGSEHWQSASYIVPACVAVIF					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	RGRVGAFWNISHNVGGGIVAPIVGAFAALGSEHWQSASYIVPACVAIVF					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	150 RGRVGAFWNISHNVGGGIVAPIVGAFAALGSEHWQSASYIVPACVAIVF					
	201	210	220	230	240	250
PgtP <i>Stm</i> LT2	ALIVLVLGKGSPRKEGLPSLEQMMPEEKVVLKTKNTAKAPENMSAWQIFC					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	AVIVLILGKGSPRQEGFPSLEEMMPEEKVVLNTRQTVKAPENMSAFQIFC					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	200 AVIVLILGKGSPRQEGFPSLEEMMPEEKVVLNTRQTVKAPENMSAFQIFC					
	251	260	270	280	290	300
PgtP <i>Stm</i> LT2	TYVLRNKNAWYISLVDV FVYMVRFGMISWLPYLLTVKHFSKEQMSVAFLL					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	TYVLRNKNAWYVSLVDV FVYMVRFGMISWLPYLLTVKHFSKEQMSVAFLL					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	250 TYVLRNKNAWYVSLVDV FVYMVRFGMISWLPYLLTVKHFSKEQMSVAFLL					
	301	310	320	330	340	350
PgtP <i>Stm</i> LT2	FFEWAAIPSTLLAGWLSDKLFKRRMPLAMICMALIFVCLIGYWKSESLL					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	FFEWAAIPSTLLAGWLSDKLFKRRMPLAMICMALIFICLIGYWKSESLEF					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	300 FFEWAAIPSTLLAGWLSDKLFKRRMPLAMICMALIFICLIGYWKSESLEF					
	351	360	370	380	390	400
PgtP <i>Stm</i> LT2	MVTIFAAIVGCLIIYVPQFLASVQTMEIVPSFAVGS AVGLRGFMSYIFGAS					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	MVTIFAAIVGCLIIYVPQFLASVQTMEIVPSFAVGS AVGLRGFMSYIFGAS					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	350 MVTIFAAIVGCLIIYVPQFLASVQTMEIVPSFAVGS AVGLRGFMSYIFGAS					
	401	410	420	430	440	450
PgtP <i>Stm</i> LT2	LGTSLFGVMVDKLGWYGGFYLLMGGIVCCILFCYLSHRGAI ELERQRQNA					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	LGTSLFGIMVDHIGWHGGFYLLGCGIICCIIFCWL SHRGAI ELERHRAAY					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	400 LGTSLFGIMVDHIGWHGGFYLLGCGIICCIIFCWL SHRGAI ELERHRAAY					
	451	463				
PgtP <i>Stm</i> LT2	LHNQDSLQLADAQ					
PgtP <i>EIEC</i> 4608-58	IKEH-----					
PgtP <i>EIEC</i> HN280	450 IKEH-----					

Anhang 10: Tabellen ¹³C-Versuch „Bakterien kultiviert in RPMI“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von den Aminosäuren aufgelistet, die von den Bakterien nach 6 (*EIEC*) bzw. 8 (*Stm* 14028s) stündigem Wachstum in RPMI mit 10 % FCS und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 35 und 36).

Das Markierungsmuster ist in Form von XY-Gruppen angegeben (Römisch-Margl *et al.*, 2007). In dieser Darstellungsform repräsentiert jede Stelle ein C-Atom. Die erste Stelle repräsentiert C-1, die zweite Stelle C-2 usw.; eine „1“ kennzeichnet ein ¹³C-Atom, eine „0“ ein ¹²C-Atom. „X“ und „Y“ kennzeichnen entweder ¹²C- oder ¹³C-Atome. Während der Markierungsstatus von X nicht definiert ist, ist die Gesamtanzahl an ¹³C-Atomen bei Y bekannt und außerhalb der Klammer angegeben. Die genaue Position der ¹³C-Atome bei Y ist jedoch unbekannt.

		<i>EIEC</i> 4608-58 kultiviert in RPMI 1640 mit FCS		<i>EIEC</i> HN280 kultiviert in RPMI 1640 mit FCS	
		Wildtyp	Δ <i>ptsG, manXYZ, uhpT</i>	Wildtyp	Δ <i>ptsG, manXYZ, uhpT</i>
Ser-390	{000}	46,88% ± 0,59%	91,18% ± 1,22%	41,09% ± 0,85%	93,97% ± 0,29%
	{YYY}1	14,99% ± 0,58%	4,20% ± 1,15%	14,69% ± 0,63%	2,71% ± 0,24%
	{YYY}2	5,52% ± 0,02%	1,50% ± 0,10%	6,03% ± 0,12%	1,64% ± 0,06%
	{111}	32,60% ± 0,04%	3,12% ± 0,04%	38,19% ± 0,43%	1,67% ± 0,02%
Gly-246	{00}	78,94% ± 0,06%	95,03% ± 0,01%	74,06% ± 0,05%	97,47% ± 0,15%
	{YY}1	3,59% ± 0,03%	3,44% ± 0,01%	3,67% ± 0,03%	1,27% ± 0,10%
	{11}	17,47% ± 0,03%	1,52% ± 0,01%	22,28% ± 0,02%	1,26% ± 0,05%
Ala-260	{000}	41,43% ± 0,14%	91,33% ± 0,03%	37,84% ± 0,07%	95,98% ± 0,12%
	{YYY}1	1,16% ± 0,04%	3,62% ± 0,03%	1,48% ± 0,10%	0,79% ± 0,13%
	{YYY}2	2,97% ± 0,01%	0,63% ± 0,06%	3,07% ± 0,03%	0,53% ± 0,02%
	{111}	54,44% ± 0,15%	4,42% ± 0,01%	57,60% ± 0,08%	2,70% ± 0,00%
Val-288	{00000}	90,85% ± 0,30%	94,09% ± 0,04%	87,85% ± 0,25%	98,90% ± 0,15%
	{YYYYY}1	0,00% ± 0,00%	5,32% ± 0,08%	0,50% ± 0,29%	0,58% ± 0,17%
	{YYYYY}2	1,96% ± 0,03%	0,31% ± 0,05%	2,43% ± 0,09%	0,25% ± 0,02%
	{YYYYY}3	2,87% ± 0,29%	0,25% ± 0,01%	2,56% ± 0,06%	0,25% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,28% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,43% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	4,04% ± 0,02%	0,01% ± 0,00%	6,23% ± 0,07%	0,02% ± 0,02%
Leu-274	{X00000}	99,94% ± 0,01%	94,83% ± 0,10%	99,50% ± 0,05%	99,18% ± 0,03%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	5,01% ± 0,09%	0,42% ± 0,07%	0,66% ± 0,06%
	{XYYYYY}2	0,01% ± 0,00%	0,16% ± 0,02%	0,05% ± 0,04%	0,15% ± 0,03%
	{XYYYYY}3	0,04% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{X11111}	0,02% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	89,07% ± 0,03%	91,12% ± 0,42%	88,22% ± 0,11%	96,74% ± 0,22%
	{YYYYY}1	0,00% ± 0,00%	5,18% ± 0,35%	0,76% ± 0,04%	1,25% ± 0,19%
	{YYYYY}2	7,00% ± 0,08%	3,02% ± 0,29%	6,95% ± 0,02%	1,53% ± 0,05%
	{YYYYY}3	0,62% ± 0,05%	0,45% ± 0,06%	0,49% ± 0,05%	0,24% ± 0,02%
	{YYYYY}4	2,45% ± 0,03%	0,17% ± 0,02%	2,85% ± 0,05%	0,17% ± 0,02%
	{11111}	0,86% ± 0,01%	0,07% ± 0,00%	0,74% ± 0,01%	0,07% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	99,34% ± 0,08%	93,89% ± 0,18%	98,52% ± 0,23%	99,03% ± 0,18%
	{YYYYY}1	0,12% ± 0,08%	5,51% ± 0,17%	1,04% ± 0,31%	0,89% ± 0,28%
	{YYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,14% ± 0,13%	0,08% ± 0,11%
	{YYYYY}3	0,20% ± 0,00%	0,11% ± 0,02%	0,04% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,34% ± 0,02%	0,49% ± 0,07%	0,23% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	76,93% ± 0,07%	93,88% ± 0,12%	81,25% ± 0,21%	97,65% ± 0,08%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	3,19% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	1,74% ± 0,08%	0,84% ± 0,04%	1,37% ± 0,04%	0,74% ± 0,08%
	{YYYY}3	20,32% ± 0,12%	2,01% ± 0,03%	16,73% ± 0,12%	1,53% ± 0,01%
	{1111}	1,00% ± 0,09%	0,08% ± 0,02%	0,66% ± 0,11%	0,09% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	98,16% ± 0,92%	91,96% ± 1,75%	99,15% ± 0,72%	99,65% ± 0,43%
	{YYYY}1	1,82% ± 0,95%	8,04% ± 1,75%	0,77% ± 0,82%	0,34% ± 0,44%
	{YYYY}2	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,12%	0,00% ± 0,01%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

		<i>EIEC</i> 4608-58 kultiviert in RPMI 1640 mit FCS		<i>EIEC</i> HN280 kultiviert in RPMI 1640 mit FCS	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ile-200	{X00000}	99,71% ± 0,01%	95,13% ± 0,10%	99,48% ± 0,03%	99,54% ± 0,06%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	4,52% ± 0,13%	0,26% ± 0,02%	0,30% ± 0,08%
	{YYYYYYY}2	0,29% ± 0,01%	0,35% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,26% ± 0,05%	0,17% ± 0,02%
Lys-431	{000000}	97,83% ± 0,15%	93,49% ± 0,20%	97,16% ± 0,31%	99,64% ± 0,07%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	5,99% ± 0,17%	0,05% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,76% ± 0,12%	0,11% ± 0,16%	0,91% ± 0,37%	0,06% ± 0,07%
	{YYYYYYY}3	1,22% ± 0,09%	0,41% ± 0,13%	1,28% ± 0,13%	0,29% ± 0,02%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	0,19% ± 0,14%	0,00% ± 0,00%	0,54% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%
{111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,05%	0,01% ± 0,02%	
His-440	{000000}	92,38% ± 0,11%	86,30% ± 0,45%	97,08% ± 0,94%	99,19% ± 0,46%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	5,53% ± 0,60%	0,00% ± 0,00%	0,74% ± 0,47%
	{YYYYYYY}2	0,65% ± 0,06%	4,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYY}3	0,80% ± 0,04%	1,02% ± 0,19%	0,51% ± 0,55%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,27% ± 0,02%	0,47% ± 0,14%	0,47% ± 0,05%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYY}5	4,17% ± 0,08%	2,59% ± 0,28%	1,02% ± 0,71%	0,00% ± 0,01%
{111111}	1,73% ± 0,21%	0,05% ± 0,08%	0,91% ± 0,17%	0,04% ± 0,01%	
Phe-336	{000000000}	99,18% ± 0,02%	88,68% ± 0,61%	99,18% ± 0,77%	99,89% ± 0,10%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,50% ± 0,08%	10,96% ± 0,67%	0,67% ± 0,77%	0,10% ± 0,12%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,19% ± 0,03%	0,26% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,05% ± 0,05%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%	0,03% ± 0,04%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,03% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,04% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	
Tyr-466	{000000000}	99,66% ± 0,23%	90,59% ± 0,79%	99,97% ± 0,05%	100,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,13% ± 0,22%	8,66% ± 0,53%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,52% ± 0,34%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,11% ± 0,03%	0,11% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,07% ± 0,11%	0,07% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,03% ± 0,05%	0,03% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	41,28%	5,52%	47,11%	3,67%
Gly-246	19,26%	3,25%	24,11%	1,89%
Ala-260	56,81%	6,05%	60,14%	3,32%
Val-288	6,77%	1,37%	9,19%	0,38%
Leu-274	0,04%	1,07%	0,12%	0,20%
Glu-432	5,99%	2,72%	6,24%	1,21%
Pro-286	0,42%	1,56%	0,49%	0,21%
Asp-418	17,12%	2,80%	13,89%	1,60%
Thr-404	0,46%	2,01%	0,23%	0,09%
Ile-200	0,11%	1,05%	0,32%	0,22%
Lys-488	1,02%	1,24%	1,46%	0,18%
His-440	6,00%	5,30%	2,33%	0,18%
Phe-336	0,24%	1,37%	0,19%	0,02%
Tyr-466	0,15%	1,22%	0,00%	0,00%

Salmonella Typhimurium 14028s kultiviert in RPMI 1640 mit FCS

		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	$\Delta sifA$	$\Delta sifA, ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	32,37% \pm 0,12%	90,84% \pm 0,54%	33,75% \pm 0,77%	92,77% \pm 0,44%
	{YYY}1	13,43% \pm 0,27%	4,48% \pm 0,63%	11,34% \pm 0,48%	3,14% \pm 0,57%
	{YYY}2	6,20% \pm 0,06%	1,93% \pm 0,14%	5,75% \pm 0,04%	0,81% \pm 0,38%
	{111}	48,00% \pm 0,15%	2,75% \pm 0,03%	49,16% \pm 0,31%	3,28% \pm 0,22%
Gly-246	{00}	69,45% \pm 0,13%	97,15% \pm 0,14%	68,63% \pm 0,12%	97,45% \pm 0,08%
	{YY}1	4,71% \pm 0,10%	1,35% \pm 0,12%	4,48% \pm 0,13%	1,01% \pm 0,13%
	{11}	25,84% \pm 0,05%	1,50% \pm 0,02%	26,89% \pm 0,01%	1,54% \pm 0,08%
Ala-260	{000}	32,94% \pm 0,11%	95,73% \pm 0,30%	33,55% \pm 0,07%	95,45% \pm 0,33%
	{YYY}1	0,77% \pm 0,04%	0,23% \pm 0,20%	0,79% \pm 0,04%	0,40% \pm 0,28%
	{YYY}2	2,66% \pm 0,02%	0,36% \pm 0,03%	2,63% \pm 0,01%	0,42% \pm 0,04%
	{111}	63,63% \pm 0,12%	3,68% \pm 0,08%	63,03% \pm 0,09%	3,74% \pm 0,05%
Val-288	{00000}	89,29% \pm 0,06%	99,15% \pm 0,17%	90,26% \pm 0,16%	99,38% \pm 0,27%
	{YYYYY}1	0,44% \pm 0,04%	0,36% \pm 0,18%	0,57% \pm 0,09%	0,04% \pm 0,07%
	{YYYYY}2	1,79% \pm 0,05%	0,15% \pm 0,03%	1,72% \pm 0,01%	0,25% \pm 0,08%
	{YYYYY}3	1,92% \pm 0,02%	0,27% \pm 0,04%	1,78% \pm 0,03%	0,25% \pm 0,01%
	{YYYYY}4	0,36% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,01%	0,31% \pm 0,02%	0,05% \pm 0,09%
	{11111}	6,19% \pm 0,05%	0,06% \pm 0,03%	5,37% \pm 0,09%	0,03% \pm 0,05%
Leu-274	{X00000}	99,72% \pm 0,09%	99,84% \pm 0,03%	99,63% \pm 0,22%	99,70% \pm 0,05%
	{XYYYYY}1	0,27% \pm 0,09%	0,15% \pm 0,03%	0,36% \pm 0,22%	0,00% \pm 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,29% \pm 0,04%
	{XYYYYY}3	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,01%
	{XYYYYY}4	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,01% \pm 0,01%
	{X11111}	0,01% \pm 0,00%	0,01% \pm 0,00%	0,01% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
Glu-432	{00000}	90,86% \pm 0,14%	99,26% \pm 0,64%	92,19% \pm 0,31%	99,34% \pm 0,04%
	{YYYYY}1	0,78% \pm 0,18%	0,37% \pm 0,34%	1,03% \pm 0,21%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYY}2	6,83% \pm 0,02%	0,24% \pm 0,21%	5,55% \pm 0,10%	0,49% \pm 0,06%
	{YYYYY}3	0,26% \pm 0,02%	0,01% \pm 0,02%	0,15% \pm 0,07%	0,10% \pm 0,02%
	{YYYYY}4	0,96% \pm 0,01%	0,09% \pm 0,08%	0,85% \pm 0,04%	0,04% \pm 0,06%
	{11111}	0,31% \pm 0,03%	0,02% \pm 0,04%	0,23% \pm 0,02%	0,03% \pm 0,03%
Pro-286	{00000}	98,79% \pm 0,55%	99,27% \pm 0,15%	98,21% \pm 0,24%	
	{YYYYY}1	0,57% \pm 0,50%	0,43% \pm 0,16%	0,51% \pm 0,15%	
	{YYYYY}2	0,60% \pm 0,03%	0,30% \pm 0,04%	0,43% \pm 0,15%	
	{YYYYY}3	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,01% \pm 0,02%	
	{YYYYY}4	0,03% \pm 0,06%	0,00% \pm 0,00%	0,82% \pm 0,11%	
	{11111}	0,01% \pm 0,02%	0,00% \pm 0,00%	0,02% \pm 0,02%	
Asp-418	{0000}	94,40% \pm 0,14%	99,09% \pm 0,01%	95,13% \pm 0,18%	99,08% \pm 0,07%
	{YYYY}1	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYY}2	0,57% \pm 0,15%	0,05% \pm 0,08%	0,33% \pm 0,20%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYY}3	4,79% \pm 0,02%	0,76% \pm 0,10%	4,31% \pm 0,05%	0,92% \pm 0,08%
	{1111}	0,25% \pm 0,00%	0,11% \pm 0,04%	0,23% \pm 0,04%	0,01% \pm 0,01%
Thr-404	{0000}	99,48% \pm 0,32%	99,57% \pm 0,55%	98,91% \pm 1,02%	
	{YYYY}1	0,27% \pm 0,46%	0,00% \pm 0,00%	0,97% \pm 1,13%	
	{YYYY}2	0,22% \pm 0,19%	0,33% \pm 0,48%	0,11% \pm 0,19%	
	{YYYY}3	0,03% \pm 0,05%	0,04% \pm 0,07%	0,01% \pm 0,02%	
	{1111}	0,01% \pm 0,01%	0,06% \pm 0,11%	0,00% \pm 0,00%	

Salmonella Typhimurium 14028s kultiviert in RPMI 1640 mit FCS

	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	$\Delta sifA$	$\Delta sifA, ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,50% ± 0,09%	98,59% ± 0,39%	99,63% ± 0,11%	99,44% ± 0,52%
	{YYYYYYY}1	0,39% ± 0,02%	0,13% ± 0,05%	0,22% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,22% ± 0,02%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{X11111}	0,11% ± 0,10%	1,27% ± 0,36%	0,15% ± 0,05%	0,32% ± 0,49%
Lys-431	{000000}	96,90% ± 0,19%	99,10% ± 0,62%	96,86% ± 0,14%	
	{YYYYYYY}1	0,08% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,16% ± 0,14%	
	{YYYYYYY}2	1,19% ± 0,18%	0,28% ± 0,25%	1,19% ± 0,04%	
	{YYYYYYY}3	1,66% ± 0,13%	0,01% ± 0,02%	1,68% ± 0,02%	
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,38% ± 0,50%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}5	0,08% ± 0,05%	0,09% ± 0,15%	0,04% ± 0,03%	
{111111}	0,08% ± 0,05%	0,14% ± 0,23%	0,08% ± 0,03%		
His-440	{000000}	95,58% ± 0,17%	96,75% ± 0,97%	95,41% ± 0,11%	
	{YYYYYYY}1	0,29% ± 0,25%	0,26% ± 0,24%	0,28% ± 0,25%	
	{YYYYYYY}2	0,24% ± 0,13%	1,60% ± 0,53%	0,14% ± 0,08%	
	{YYYYYYY}3	0,32% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%	0,39% ± 0,05%	
	{YYYYYYY}4	0,17% ± 0,04%	0,07% ± 0,13%	0,14% ± 0,03%	
	{YYYYYYY}5	1,54% ± 0,10%	0,42% ± 0,58%	1,83% ± 0,05%	
{111111}	1,86% ± 0,02%	0,87% ± 1,00%	1,81% ± 0,12%		
Phe-336	{00000000}	99,42% ± 0,12%	98,99% ± 0,55%	98,10% ± 0,56%	96,89% ± 0,84%
	{YYYYYYYYY}1	0,08% ± 0,15%	0,16% ± 0,27%	1,34% ± 0,55%	0,91% ± 0,36%
	{YYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYY}3	0,02% ± 0,03%	0,11% ± 0,19%	0,03% ± 0,04%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,15% ± 0,26%	0,01% ± 0,01%	0,36% ± 0,02%
	{YYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,12% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	1,34% ± 0,52%
	{YYYYYYYYY}6	0,09% ± 0,01%	0,11% ± 0,09%	0,12% ± 0,00%	0,09% ± 0,09%
	{YYYYYYYYY}7	0,08% ± 0,01%	0,17% ± 0,15%	0,09% ± 0,01%	0,28% ± 0,09%
	{YYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,11% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
{11111111}	0,30% ± 0,01%	0,03% ± 0,02%	0,31% ± 0,04%	0,08% ± 0,04%	
Tyr-466	{000000000}	99,25% ± 0,41%	97,94% ± 0,72%	99,01% ± 0,38%	96,94% ± 0,86%
	{YYYYYYYYY}1	0,02% ± 0,03%	0,89% ± 0,77%	0,00% ± 0,00%	0,28% ± 0,32%
	{YYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,39% ± 0,44%
	{YYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,32% ± 0,28%	0,00% ± 0,00%	0,21% ± 0,20%
	{YYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,35% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,40% ± 0,10%
	{YYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,25% ± 0,44%	0,00% ± 0,00%	0,17% ± 0,16%
	{YYYYYYYYY}6	0,18% ± 0,03%	0,24% ± 0,21%	0,21% ± 0,04%	0,31% ± 0,31%
	{YYYYYYYYY}7	0,14% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,22% ± 0,04%	0,54% ± 0,84%
	{YYYYYYYYY}8	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,03%	0,10% ± 0,17%
{111111111}	0,38% ± 0,34%	0,03% ± 0,05%	0,53% ± 0,29%	0,67% ± 0,23%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	56,61%	5,53%	56,78%	4,87%
Gly-246	28,19%	2,18%	29,13%	2,05%
Ala-260	65,66%	4,00%	65,04%	4,15%
Val-288	8,44%	0,36%	7,48%	0,33%
Leu-274	0,07%	0,04%	0,08%	0,12%
Glu-432	4,12%	0,27%	3,43%	0,32%
Pro-286	0,39%	0,21%	0,95%	0,00%
Asp-418	4,12%	0,70%	3,63%	0,70%
Thr-404	0,21%	0,26%	0,31%	0,00%
Ile-200	0,19%	1,30%	0,20%	0,42%
Lys-488	1,39%	0,56%	1,37%	0,00%
His-440	3,55%	1,85%	3,71%	0,00%
Phe-336	0,44%	0,53%	0,62%	1,39%
Tyr-466	0,64%	0,68%	0,87%	1,84%

Anhang 11: Tabellen ¹³C-Versuch „nicht infizierte Caco-2-Zellen“

In der folgenden Tabelle sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von den Aminosäuren aufgelistet, die von nicht infizierten Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 33). Dazu wurden die Zellen zu Beginn des Versuches zunächst 1 h in frischem RPMI 1640 mit oder ohne 10 % FCS inkubiert. Im Anschluß wurde das Medium entfernt und durch 20 ml RPMI mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. Nach 30 min wurde das Medium erneut durch frisches RPMI mit 10% FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM D-[U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert. 6 bzw. 8 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die Zellen, wie bei den Methoden unter 3.4.10 beschrieben, geerntet. Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h ohne FCS, 6 h markiert		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h mit FCS, 6 h markiert		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h mit FCS, 8 h markiert	
		Zellfraktion		Zellfraktion		Zellfraktion	
Ser-390	{000}	97,45% ±	0,15%	97,30% ±	0,40%	91,37% ±	0,84%
	{YYY}1	0,00% ±	0,00%	0,26% ±	0,28%	3,77% ±	0,58%
	{YYY}2	1,00% ±	0,11%	0,84% ±	0,16%	2,05% ±	0,17%
	{111}	1,55% ±	0,24%	1,59% ±	0,08%	2,82% ±	0,15%
Gly-246	{00}	97,94% ±	0,05%	97,98% ±	0,02%	94,95% ±	0,08%
	{YY}1	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	1,18% ±	0,09%
	{11}	2,06% ±	0,05%	2,02% ±	0,02%	3,86% ±	0,03%
Ala-260	{000}	87,62% ±	0,13%	88,37% ±	0,08%	84,25% ±	0,15%
	{YYY}1	0,05% ±	0,06%	0,03% ±	0,05%	0,22% ±	0,10%
	{YYY}2	0,54% ±	0,02%	0,52% ±	0,01%	0,40% ±	0,01%
	{111}	11,78% ±	0,06%	11,08% ±	0,04%	15,13% ±	0,11%
Val-288	{00000}	99,98% ±	0,01%	99,97% ±	0,03%	99,77% ±	0,22%
	{YYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,14% ±	0,20%
	{YYYYY}2	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,03% ±	0,04%
	{YYYYY}3	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,04% ±	0,04%
	{YYYYY}4	0,02% ±	0,01%	0,02% ±	0,02%	0,00% ±	0,00%
	{11111}	0,00% ±	0,00%	0,01% ±	0,02%	0,02% ±	0,01%
Leu-274	{X00000}	99,98% ±	0,01%	99,97% ±	0,01%	99,82% ±	0,07%
	{XYYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,18% ±	0,07%
	{XYYYYY}2	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%
	{XYYYYY}4	0,01% ±	0,01%	0,03% ±	0,01%	0,00% ±	0,00%
	{X11111}	0,01% ±	0,00%	0,01% ±	0,01%	0,00% ±	0,01%
Glu-432	{00000}	90,92% ±	0,20%	91,92% ±	0,11%	87,23% ±	0,11%
	{YYYYY}1	0,46% ±	0,24%	0,37% ±	0,10%	1,95% ±	0,26%
	{YYYYY}2	5,37% ±	0,07%	4,79% ±	0,09%	6,21% ±	0,26%
	{YYYYY}3	1,39% ±	0,03%	1,28% ±	0,04%	1,80% ±	0,04%
	{YYYYY}4	1,35% ±	0,03%	1,22% ±	0,03%	1,95% ±	0,03%
	{11111}	0,50% ±	0,02%	0,41% ±	0,00%	0,85% ±	0,03%
Pro-286	{00000}	96,34% ±	0,31%	96,68% ±	0,07%	96,33% ±	0,43%
	{YYYYY}1	0,15% ±	0,14%	0,06% ±	0,08%	0,08% ±	0,08%
	{YYYYY}2	2,26% ±	0,12%	2,31% ±	0,10%	2,15% ±	0,27%
	{YYYYY}3	0,43% ±	0,09%	0,46% ±	0,04%	1,14% ±	0,12%
	{YYYYY}4	0,70% ±	0,20%	0,37% ±	0,09%	0,31% ±	0,03%
	{11111}	0,12% ±	0,12%	0,12% ±	0,02%	0,00% ±	0,00%
Asp-418	{0000}	96,25% ±	0,13%	95,73% ±	1,23%	93,15% ±	0,12%
	{YYYY}1	0,17% ±	0,15%	0,12% ±	0,13%	1,99% ±	0,15%
	{YYYY}2	2,27% ±	0,08%	2,64% ±	0,94%	2,78% ±	0,22%
	{YYYY}3	1,05% ±	0,01%	0,96% ±	0,18%	1,51% ±	0,05%
	{1111}	0,26% ±	0,06%	0,55% ±	0,57%	0,56% ±	0,02%
Thr-404	{0000}	97,71% ±	1,15%	85,94% ±	18,71%	99,38% ±	0,41%
	{YYYY}1	0,72% ±	0,72%	5,83% ±	10,09%	0,19% ±	0,22%
	{YYYY}2	0,61% ±	0,59%	1,05% ±	1,82%	0,11% ±	0,10%
	{YYYY}3	0,40% ±	0,25%	1,44% ±	2,38%	0,32% ±	0,33%
	{1111}	0,56% ±	0,37%	5,73% ±	7,85%	0,00% ±	0,00%

		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h ohne FCS, 6 h markiert		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h mit FCS, 6 h markiert		nicht infizierte Caco-2-Zellen 1 h mit FCS, 8 h markiert	
		Zellfraktion		Zellfraktion		Zellfraktion	
Ile-200	{X00000}	99,69% ±	0,09%	99,74% ±	0,07%	99,72% ±	0,06%
	{XYYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,15% ±	0,05%
	{XYYYYY}2	0,13% ±	0,20%	0,05% ±	0,01%	0,12% ±	0,03%
	{XYYYYY}3	0,05% ±	0,05%	0,05% ±	0,01%	0,00% ±	0,01%
	{XYYYYY}4	0,01% ±	0,01%	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%
	{X11111}	0,12% ±	0,14%	0,16% ±	0,07%	0,01% ±	0,01%
Lys-431	{000000}	99,71% ±	0,06%	99,52% ±	0,10%	97,46% ±	0,55%
	{YYYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,06% ±	0,11%	1,51% ±	0,16%
	{YYYYYY}2	0,16% ±	0,03%	0,23% ±	0,20%	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYY}3	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,22% ±	0,33%
	{YYYYYY}4	0,01% ±	0,02%	0,04% ±	0,07%	0,05% ±	0,08%
	{YYYYYY}5	0,08% ±	0,10%	0,08% ±	0,08%	0,61% ±	0,36%
{111111}	0,04% ±	0,01%	0,07% ±	0,09%	0,16% ±	0,20%	
His-440	{000000}	99,42% ±	0,18%	99,45% ±	0,72%		
	{YYYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,06% ±	0,10%		
	{YYYYYY}2	0,17% ±	0,01%	0,42% ±	0,68%		
	{YYYYYY}3	0,00% ±	0,00%	0,02% ±	0,02%		
	{YYYYYY}4	0,28% ±	0,22%	0,00% ±	0,01%		
	{YYYYYY}5	0,05% ±	0,07%	0,05% ±	0,05%		
{111111}	0,08% ±	0,12%	0,00% ±	0,00%			
Phe-336	{00000000}	99,20% ±	0,23%	99,09% ±	0,40%	98,79% ±	0,43%
	{YYYYYYYY}1	0,54% ±	0,16%	0,75% ±	0,40%	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,74% ±	0,36%
	{YYYYYYYY}3	0,09% ±	0,08%	0,03% ±	0,02%	0,07% ±	0,12%
	{YYYYYYYY}4	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,05% ±	0,08%
	{YYYYYYYY}5	0,07% ±	0,03%	0,04% ±	0,01%	0,06% ±	0,02%
	{YYYYYYYY}6	0,00% ±	0,00%	0,02% ±	0,02%	0,03% ±	0,04%
	{YYYYYYYY}7	0,02% ±	0,03%	0,01% ±	0,01%	0,05% ±	0,05%
	{YYYYYYYY}8	0,05% ±	0,01%	0,03% ±	0,04%	0,08% ±	0,07%
{11111111}	0,02% ±	0,03%	0,03% ±	0,02%	0,13% ±	0,13%	
Tyr-466	{00000000}	97,67% ±	2,06%	80,00% ±	30,17%	98,59% ±	0,83%
	{YYYYYYYY}1	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYY}2	0,14% ±	0,19%	2,54% ±	4,40%	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYY}3	0,43% ±	0,61%	1,45% ±	1,41%	0,36% ±	0,63%
	{YYYYYYYY}4	0,00% ±	0,00%	2,44% ±	3,34%	0,28% ±	0,25%
	{YYYYYYYY}5	0,78% ±	1,10%	1,09% ±	1,84%	0,22% ±	0,19%
	{YYYYYYYY}6	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYY}7	0,00% ±	0,00%	0,16% ±	0,28%	0,52% ±	0,89%
	{YYYYYYYY}8	0,01% ±	0,01%	1,40% ±	0,54%	0,00% ±	0,00%
{11111111}	0,98% ±	1,37%	10,93% ±	18,79%	0,02% ±	0,04%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,22%	2,24%	5,44%
Gly-246	2,06%	2,02%	4,45%
Ala-260	12,16%	11,44%	15,47%
Val-288	0,02%	0,03%	0,09%
Leu-274	0,02%	0,03%	0,04%
Glu-432	4,65%	4,14%	6,37%
Pro-286	1,87%	1,63%	1,80%
Asp-418	2,23%	2,62%	3,59%
Thr-404	1,35%	8,79%	0,34%
Ile-200	0,21%	0,21%	0,09%
Lys-488	0,17%	0,25%	1,06%
His-440	0,37%	0,20%	0,00%
Phe-336	0,21%	0,19%	0,50%
Tyr-466	1,60%	15,04%	0,79%

Anhang 12: Tabellen ¹³C-Versuch „vormarkierte, nicht infizierte Caco-2-Zellen“

In der folgenden Tabelle sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren aufgelistet, die aus nicht infizierten mit ¹³C vormarkierten Caco-2-Zellen isoliert wurden (s. auch Abb. 34B unten). Für die Vormarkierung wurden die Zellen permanent in RPMI mit 10 % FCS und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose kultiviert. Zu Beginn des Versuches wurde das [U-¹³C₆]-Glukose-haltige Medium gegen RPMI 1640 mit 10% FCS und unmarkierter Glukose ersetzt, die Zellen 1 h darin inkubiert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert. 7 h nach Absenkung der Gentamicinkonzentration wurden die Zellen geerntet. Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

nicht infizierte ¹³C-Caco-2-Zellen
1 h mit FCS, 7 h mit ¹²C-Glukose

		Zellfraktion	
Ser-390	{000}	73,21% ±	1,01%
	{YYY}1	10,37% ±	0,99%
	{YYY}2	7,13% ±	0,06%
	{111}	9,30% ±	0,04%
Gly-246	{00}	86,67% ±	0,04%
	{YY}1	1,79% ±	0,03%
	{11}	11,54% ±	0,03%
Ala-260	{000}	45,49% ±	0,05%
	{YYY}1	1,15% ±	0,04%
	{YYY}2	2,77% ±	0,03%
	{111}	50,58% ±	0,09%
Val-288	{00000}	99,62% ±	0,31%
	{YYYYY}1	0,38% ±	0,31%
	{YYYYY}2	0,00% ±	0,00%
	{YYYYY}3	0,00% ±	0,00%
	{YYYYY}4	0,00% ±	0,00%
	{11111}	0,00% ±	0,00%
Leu-274	{X00000}	99,83% ±	0,06%
	{XYYYYY}1	0,17% ±	0,06%
	{XYYYYY}2	0,00% ±	0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ±	0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ±	0,00%
	{X11111}	0,00% ±	0,00%
Glu-432	{00000}	72,28% ±	0,32%
	{YYYYY}1	2,33% ±	0,14%
	{YYYYY}2	11,20% ±	0,06%
	{YYYYY}3	4,51% ±	0,03%
	{YYYYY}4	5,78% ±	0,06%
	{11111}	3,91% ±	0,07%
Pro-286	{00000}	78,56% ±	0,39%
	{YYYYY}1	2,18% ±	0,04%
	{YYYYY}2	9,51% ±	0,25%
	{YYYYY}3	3,51% ±	0,05%
	{YYYYY}4	4,00% ±	0,13%
	{11111}	2,24% ±	0,12%
Asp-418	{0000}	75,97% ±	0,34%
	{YYYY}1	1,64% ±	0,34%
	{YYYY}2	9,66% ±	0,05%
	{YYYY}3	8,34% ±	0,14%
	{1111}	4,39% ±	0,03%
Thr-404	{0000}	99,46% ±	0,67%
	{YYYY}1	0,44% ±	0,76%
	{YYYY}2	0,07% ±	0,12%
	{YYYY}3	0,00% ±	0,00%
	{1111}	0,03% ±	0,06%

nicht infizierte ¹³C-Caco-2-Zellen
1 h mit FCS, 7 h mit ¹²C-Glukose
Zellfraktion

Ile-200	{X00000}	98,29% ±	0,16%
	{XYYYYY}1	1,68% ±	0,14%
	{XYYYYY}2	0,00% ±	0,01%
	{XYYYYY}3	0,00% ±	0,00%
	{XYYYYY}4	0,01% ±	0,02%
	{X11111}	0,01% ±	0,02%
Lys-431	{000000}	66,34% ±	57,46%
	{YYYYYY}1	6,41% ±	10,90%
	{YYYYYY}2	0,50% ±	0,86%
	{YYYYYY}3	19,08% ±	32,97%
	{YYYYYY}4	2,82% ±	4,88%
	{YYYYYY}5	3,07% ±	5,32%
{111111}	1,78% ±	2,54%	
His-440	{000000}	98,72% ±	0,96%
	{YYYYYY}1	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYY}2	0,20% ±	0,35%
	{YYYYYY}3	0,64% ±	1,10%
	{YYYYYY}4	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYY}5	0,06% ±	0,01%
{111111}	0,38% ±	0,33%	
Phe-336	{000000000}	99,50% ±	0,40%
	{YYYYYYYYYY}1	0,07% ±	0,09%
	{YYYYYYYYYY}2	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYYYY}3	0,02% ±	0,04%
	{YYYYYYYYYY}4	0,01% ±	0,01%
	{YYYYYYYYYY}5	0,04% ±	0,06%
	{YYYYYYYYYY}6	0,15% ±	0,18%
	{YYYYYYYYYY}7	0,00% ±	0,00%
	{YYYYYYYYYY}8	0,08% ±	0,13%
{111111111}	0,14% ±	0,01%	
Tyr-466	{000000000}	52,66% ±	44,95%
	{YYYYYYYYYY}1	4,45% ±	7,71%
	{YYYYYYYYYY}2	0,12% ±	0,21%
	{YYYYYYYYYY}3	0,40% ±	0,69%
	{YYYYYYYYYY}4	0,13% ±	0,22%
	{YYYYYYYYYY}5	3,24% ±	2,32%
	{YYYYYYYYYY}6	2,02% ±	3,45%
	{YYYYYYYYYY}7	5,03% ±	4,37%
	{YYYYYYYYYY}8	6,32% ±	10,95%
{111111111}	25,62% ±	44,37%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	17,51%
Gly-246	12,43%
Ala-260	52,81%
Val-288	0,08%
Leu-274	0,04%
Glu-432	16,18%
Pro-286	11,78%
Asp-418	15,89%
Thr-404	0,17%
Ile-200	0,36%
Lys-488	16,99%
His-440	0,82%
Phe-336	0,34%
Tyr-466	39,01%

Anhang 13: Tabellen ¹³C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten *EIEC* 4608-58“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von ¹³C-vormarkierten Caco-2-Zellen isoliert wurden (s. auch Abb. 34). Für die Vormarkierung wurden die Zellen permanent in RPMI mit 10% FCS und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose kultiviert. Zu Beginn des Versuches wurde das [U-¹³C₆]-Glukose-haltige Medium gegen RPMI 1640 mit 10% FCS, unmarkierter Glukose und den Bakterien ersetzt, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert. 6 h nach Absenkung der Gentamicinkonzentration wurden die Bakterien und Zellen geerntet. Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>	Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>
Ser-390	{000}	65,05% ± 0,86%	65,07% ± 0,28%	67,97% ± 0,02%	68,21% ± 0,61%
	{YYY}1	13,37% ± 0,68%	13,24% ± 0,23%	12,31% ± 0,15%	12,19% ± 0,45%
	{YYY}2	8,25% ± 0,13%	8,28% ± 0,20%	7,86% ± 0,13%	7,99% ± 0,11%
	{111}	13,33% ± 0,10%	13,41% ± 0,05%	11,87% ± 0,04%	11,60% ± 0,28%
Gly-246	{00}	82,13% ± 0,05%	82,01% ± 0,06%	83,40% ± 0,05%	83,82% ± 0,62%
	{YY}1	1,90% ± 0,08%	2,00% ± 0,02%	2,10% ± 0,01%	1,80% ± 0,15%
	{11}	15,97% ± 0,04%	15,99% ± 0,07%	14,50% ± 0,05%	14,39% ± 0,48%
Ala-260	{000}	42,67% ± 0,07%	42,21% ± 0,03%	48,73% ± 0,01%	49,41% ± 0,14%
	{YYY}1	1,15% ± 0,03%	1,31% ± 0,00%	1,08% ± 0,03%	1,10% ± 0,08%
	{YYY}2	2,06% ± 0,02%	2,21% ± 0,01%	1,86% ± 0,04%	1,85% ± 0,03%
	{111}	54,12% ± 0,10%	54,27% ± 0,04%	48,33% ± 0,02%	47,64% ± 0,02%
Val-288	{00000}	99,56% ± 0,13%	99,66% ± 0,04%	99,66% ± 0,12%	99,67% ± 0,15%
	{YYYYY}1	0,32% ± 0,14%	0,26% ± 0,06%	0,28% ± 0,16%	0,26% ± 0,16%
	{YYYYY}2	0,07% ± 0,04%	0,03% ± 0,04%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,04% ± 0,03%	0,03% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,05% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,64% ± 0,17%	99,66% ± 0,03%	99,55% ± 0,08%	99,52% ± 0,08%
	{XYYYYY}1	0,35% ± 0,17%	0,34% ± 0,03%	0,44% ± 0,09%	0,48% ± 0,08%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	66,02% ± 0,25%	65,54% ± 0,17%	68,81% ± 0,14%	69,44% ± 0,14%
	{YYYYY}1	2,93% ± 0,19%	2,85% ± 0,13%	3,20% ± 0,10%	2,91% ± 0,12%
	{YYYYY}2	13,24% ± 0,18%	13,36% ± 0,19%	12,37% ± 0,05%	12,04% ± 0,11%
	{YYYYY}3	5,58% ± 0,09%	5,68% ± 0,09%	5,03% ± 0,09%	5,07% ± 0,07%
	{YYYYY}4	7,05% ± 0,10%	7,29% ± 0,10%	6,23% ± 0,08%	6,18% ± 0,11%
	{11111}	5,18% ± 0,10%	5,29% ± 0,02%	4,35% ± 0,02%	4,37% ± 0,08%
Pro-286	{00000}	76,02% ± 0,86%	75,68% ± 0,23%	77,63% ± 0,63%	77,31% ± 0,28%
	{YYYYY}1	1,51% ± 0,15%	1,74% ± 0,13%	1,79% ± 0,04%	1,62% ± 0,13%
	{YYYYY}2	11,15% ± 0,47%	11,18% ± 0,08%	10,80% ± 0,07%	10,49% ± 0,03%
	{YYYYY}3	4,27% ± 0,21%	4,40% ± 0,07%	4,26% ± 0,11%	4,15% ± 0,04%
	{YYYYY}4	4,45% ± 0,17%	4,47% ± 0,10%	4,15% ± 0,10%	4,08% ± 0,12%
	{11111}	2,60% ± 0,25%	2,53% ± 0,22%	1,37% ± 0,50%	2,35% ± 0,12%
Asp-418	{0000}	75,64% ± 1,02%	74,54% ± 0,17%	73,17% ± 0,55%	73,73% ± 0,12%
	{YYYY}1	3,70% ± 0,45%	3,71% ± 0,22%	4,19% ± 0,52%	4,01% ± 0,21%
	{YYYY}2	8,73% ± 0,09%	9,09% ± 0,09%	9,82% ± 0,11%	9,45% ± 0,13%
	{YYYY}3	7,61% ± 0,30%	8,08% ± 0,05%	8,27% ± 0,05%	8,23% ± 0,10%
	{1111}	4,33% ± 0,18%	4,57% ± 0,03%	4,55% ± 0,03%	4,58% ± 0,09%
Thr-404	{0000}	98,86% ± 1,19%	99,06% ± 0,32%	99,39% ± 0,19%	99,35% ± 0,11%
	{YYYY}1	0,04% ± 0,03%	0,46% ± 0,47%	0,00% ± 0,00%	0,22% ± 0,22%
	{YYYY}2	0,89% ± 1,31%	0,25% ± 0,22%	0,32% ± 0,33%	0,18% ± 0,32%
	{YYYY}3	0,21% ± 0,15%	0,23% ± 0,07%	0,29% ± 0,18%	0,25% ± 0,07%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> 4608-58 (Versuch 1)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,34% ± 0,15%	99,29% ± 0,08%	98,18% ± 0,16%	99,07% ± 0,23%
	{YYYYYYY}1	0,22% ± 0,09%	0,12% ± 0,04%	0,61% ± 0,09%	0,27% ± 0,06%
	{YYYYYYY}2	0,11% ± 0,03%	0,15% ± 0,04%	0,48% ± 0,05%	0,21% ± 0,03%
	{YYYYYYY}3	0,08% ± 0,01%	0,09% ± 0,01%	0,25% ± 0,01%	0,10% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,09% ± 0,01%	0,09% ± 0,01%	0,25% ± 0,01%	0,11% ± 0,00%
	{X11111}	0,16% ± 0,06%	0,25% ± 0,05%	0,23% ± 0,01%	0,24% ± 0,13%
Lys-488	{000000}	98,53% ± 0,29%	98,76% ± 0,12%	98,33% ± 0,47%	98,54% ± 0,21%
	{YYYYYYY}1	1,06% ± 0,39%	1,03% ± 0,17%	1,22% ± 0,30%	1,00% ± 0,23%
	{YYYYYYY}2	0,25% ± 0,10%	0,06% ± 0,06%	0,06% ± 0,10%	0,18% ± 0,24%
	{YYYYYYY}3	0,03% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%	0,09% ± 0,16%	0,06% ± 0,07%
	{YYYYYYY}4	0,03% ± 0,02%	0,04% ± 0,02%	0,06% ± 0,06%	0,06% ± 0,11%
	{YYYYYYY}5	0,10% ± 0,02%	0,08% ± 0,07%	0,23% ± 0,12%	0,16% ± 0,11%
His-440	{111111}	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{000000}		94,35% ± 1,50%		
	{YYYYYYY}1		0,94% ± 1,31%		
	{YYYYYYY}2		0,70% ± 0,80%		
	{YYYYYYY}3		2,29% ± 0,58%		
	{YYYYYYY}4		0,32% ± 0,28%		
Phe-336	{YYYYYYY}5		1,07% ± 0,65%		
	{111111}		0,33% ± 0,41%		
	{00000000}	99,06% ± 0,20%	98,75% ± 0,38%	99,05% ± 0,27%	99,37% ± 0,11%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,81% ± 0,20%	0,83% ± 0,13%	0,75% ± 0,12%	0,57% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,05% ± 0,08%	0,02% ± 0,02%	0,08% ± 0,08%	0,05% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,01%	0,08% ± 0,10%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,05% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Tyr-466	{YYYYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,28% ± 0,13%	0,07% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{11111111}	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{00000000}	99,18% ± 0,41%	99,25% ± 0,28%	99,49% ± 0,09%	98,85% ± 0,67%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,66% ± 0,41%	0,59% ± 0,42%	0,16% ± 0,28%	0,53% ± 0,47%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,23% ± 0,13%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,10% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%	0,27% ± 0,30%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,02%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,06%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,03% ± 0,03%	0,05% ± 0,05%	0,10% ± 0,12%	0,13% ± 0,22%
{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,15% ± 0,25%	
{11111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	23,28%	23,34%	21,21%	20,99%
Gly-246	16,92%	16,99%	15,55%	15,29%
Ala-260	55,88%	56,18%	49,93%	49,24%
Val-288	0,13%	0,10%	0,09%	0,10%
Leu-274	0,07%	0,07%	0,10%	0,10%
Glu-432	20,05%	20,44%	17,94%	17,75%
Pro-286	13,48%	13,57%	11,92%	12,62%
Asp-418	15,33%	16,11%	16,71%	16,48%
Thr-404	0,62%	0,41%	0,38%	0,33%
Ile-200	0,37%	0,47%	0,89%	0,53%
Lys-488	0,38%	0,30%	0,51%	0,43%
His-440	0,00%	2,97%	0,00%	0,00%
Phe-336	0,25%	0,52%	0,29%	0,15%
Tyr-466	0,16%	0,18%	0,18%	0,45%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	76,88% ± 1,89%	77,13% ± 0,30%	77,59% ± 0,71%	76,75% ± 1,34%
	{YYY}1	11,09% ± 1,46%	10,87% ± 0,43%	11,03% ± 0,58%	11,41% ± 0,92%
	{YYY}2	5,74% ± 0,26%	6,10% ± 0,36%	5,77% ± 0,10%	5,88% ± 0,34%
	{111}	6,29% ± 0,17%	5,90% ± 0,22%	5,61% ± 0,04%	5,95% ± 0,09%
Gly-246	{00}	89,80% ± 0,13%	90,25% ± 0,10%	90,99% ± 0,27%	89,91% ± 0,16%
	{YY}1	1,31% ± 0,03%	1,55% ± 0,05%	1,03% ± 0,11%	1,32% ± 0,10%
	{11}	8,89% ± 0,10%	8,20% ± 0,06%	7,97% ± 0,15%	8,78% ± 0,07%
Ala-260	{000}	40,60% ± 0,27%	43,77% ± 0,19%	47,80% ± 0,25%	46,07% ± 0,26%
	{YYY}1	1,40% ± 0,05%	1,32% ± 0,05%	1,35% ± 0,05%	1,33% ± 0,05%
	{YYY}2	3,14% ± 0,03%	2,90% ± 0,07%	2,81% ± 0,05%	2,92% ± 0,04%
	{111}	54,87% ± 0,29%	52,01% ± 0,18%	48,03% ± 0,31%	49,68% ± 0,24%
Val-288	{00000}	99,69% ± 0,18%	99,19% ± 0,15%	99,78% ± 0,06%	99,72% ± 0,10%
	{YYYYY}1	0,21% ± 0,14%	0,68% ± 0,29%	0,21% ± 0,06%	0,28% ± 0,11%
	{YYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,09% ± 0,03%	0,07% ± 0,09%	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,01% ± 0,01%	0,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,88% ± 0,04%	99,90% ± 0,02%	99,77% ± 0,08%	99,87% ± 0,05%
	{XYYYYY}1	0,10% ± 0,03%	0,10% ± 0,02%	0,22% ± 0,08%	0,11% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	64,30% ± 0,22%	64,97% ± 0,54%	71,65% ± 0,48%	68,91% ± 0,42%
	{YYYYY}1	2,73% ± 0,07%	2,63% ± 0,31%	2,77% ± 0,22%	2,73% ± 0,17%
	{YYYYY}2	13,03% ± 0,13%	13,14% ± 0,47%	10,71% ± 0,09%	11,48% ± 0,22%
	{YYYYY}3	6,41% ± 0,09%	5,91% ± 0,00%	5,11% ± 0,03%	5,49% ± 0,12%
	{YYYYY}4	7,52% ± 0,14%	7,36% ± 0,02%	5,53% ± 0,13%	6,29% ± 0,07%
	{11111}	6,01% ± 0,12%	5,99% ± 0,07%	4,22% ± 0,10%	5,10% ± 0,08%
Pro-286	{00000}	80,76% ± 3,25%	86,46% ± 0,24%	79,43% ± 0,76%	77,97% ± 1,43%
	{YYYYY}1	1,58% ± 0,52%	1,18% ± 0,18%	1,97% ± 0,11%	2,14% ± 0,20%
	{YYYYY}2	8,35% ± 1,01%	5,62% ± 0,12%	8,62% ± 0,49%	8,85% ± 0,93%
	{YYYYY}3	2,74% ± 1,09%	2,18% ± 0,04%	3,55% ± 0,10%	3,90% ± 0,13%
	{YYYYY}4	4,09% ± 1,00%	2,79% ± 0,14%	3,83% ± 0,12%	4,56% ± 0,24%
	{11111}	2,48% ± 0,47%	1,78% ± 0,03%	2,61% ± 0,12%	2,58% ± 0,50%
Asp-418	{0000}	73,73% ± 0,31%	76,47% ± 0,14%	73,29% ± 0,07%	71,94% ± 0,08%
	{YYYY}1	2,95% ± 0,17%	1,73% ± 0,11%	3,29% ± 0,20%	3,48% ± 0,18%
	{YYYY}2	9,57% ± 0,17%	8,52% ± 0,15%	10,09% ± 0,04%	10,20% ± 0,15%
	{YYYY}3	8,86% ± 0,26%	7,93% ± 0,07%	8,76% ± 0,25%	9,22% ± 0,18%
	{1111}	4,88% ± 0,11%	5,34% ± 0,02%	4,57% ± 0,09%	5,16% ± 0,15%
Thr-404	{0000}	98,82% ± 0,53%	98,43% ± 1,37%	99,13% ± 0,26%	99,14% ± 0,33%
	{YYYY}1	0,55% ± 0,95%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,15%
	{YYYY}2	0,60% ± 0,53%	0,79% ± 0,82%	0,87% ± 0,26%	0,77% ± 0,48%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,02% ± 0,04%	0,76% ± 0,90%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> 4608-58 (Versuch 2)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,22% ± 0,32%	97,92% ± 1,64%	99,58% ± 0,15%	99,03% ± 0,08%
	{YYYYYYY}1	0,11% ± 0,08%	0,17% ± 0,08%	0,15% ± 0,07%	0,18% ± 0,07%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,01%	0,11% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%
	{X11111}	0,67% ± 0,28%	1,75% ± 1,64%	0,27% ± 0,12%	0,72% ± 0,08%
Lys-488	{000000}	99,48% ± 0,07%	55,59% ± 38,75%	99,75% ± 0,10%	99,74% ± 0,22%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	6,49% ± 11,24%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,15%
	{YYYYYYY}2	0,10% ± 0,11%	8,50% ± 6,14%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,36% ± 0,11%	4,95% ± 7,63%	0,23% ± 0,08%	0,15% ± 0,14%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	4,40% ± 4,21%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,06% ± 0,07%	12,88% ± 12,16%	0,01% ± 0,02%	0,03% ± 0,05%
His-440	{000000}	99,17% ± 0,51%	98,25% ± 0,83%	99,27% ± 0,06%	99,66% ± 0,45%
	{YYYYYYY}1	0,58% ± 0,44%	0,08% ± 0,11%	0,69% ± 0,14%	0,29% ± 0,49%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,62% ± 0,88%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,12% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYY}4	0,03% ± 0,04%	0,17% ± 0,24%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
Phe-336	{000000000}	99,19% ± 0,62%	98,76% ± 0,85%	99,74% ± 0,20%	99,37% ± 0,53%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,40% ± 0,70%	0,20% ± 0,35%	0,00% ± 0,00%	0,36% ± 0,63%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,22% ± 0,20%	0,00% ± 0,00%	0,17% ± 0,14%	0,20% ± 0,17%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,04% ± 0,07%	0,14% ± 0,24%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,10% ± 0,10%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,02% ± 0,04%	0,13% ± 0,23%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,07% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,05%	0,02% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,37% ± 0,37%	0,01% ± 0,01%	0,04% ± 0,06%
	{111111111}	0,04% ± 0,05%	0,23% ± 0,40%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
Tyr-466	{000000000}	99,86% ± 0,12%	99,43% ± 0,33%	93,51% ± 4,01%	92,12% ± 7,04%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,19%	0,58% ± 0,60%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,12% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	1,52% ± 2,62%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,10% ± 0,18%	0,70% ± 1,21%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%	1,18% ± 2,04%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	2,82% ± 4,05%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	1,38% ± 1,25%	0,00% ± 0,00%
	{111111111}	0,14% ± 0,12%	0,04% ± 0,07%	0,13% ± 0,22%	5,19% ± 5,01%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	13,81%	13,59%	13,13%	13,68%
Gly-246	9,54%	8,97%	8,49%	9,43%
Ala-260	57,42%	54,38%	50,36%	52,07%
Val-288	0,10%	0,23%	0,05%	0,06%
Leu-274	0,03%	0,02%	0,05%	0,04%
Glu-432	21,63%	21,20%	16,55%	18,57%
Pro-286	11,06%	7,80%	11,64%	12,54%
Asp-418	17,05%	15,98%	17,01%	18,04%
Thr-404	0,46%	1,17%	0,43%	0,41%
Ile-200	0,69%	1,89%	0,30%	0,80%
Lys-488	0,27%	28,20%	0,14%	0,12%
His-440	0,27%	1,07%	0,14%	0,08%
Phe-336	0,22%	0,77%	0,09%	0,14%
Tyr-466	0,14%	0,24%	4,24%	6,35%

Anhang 14: Tabellen ¹³C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten *EIEC* HN280“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologienverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von ¹³C-vormarkierten Caco-2-Zellen isoliert wurden (s. auch Abb. 34). Für die Vormarkierung wurden die Zellen permanent in RPMI mit 10% FCS und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose kultiviert. Zu Beginn des Versuches wurde das [U-¹³C₆]-Glukose-haltige Medium gegen RPMI 1640 mit 10% FCS, unmarkierter Glukose und den Bakterien ersetzt, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert. 6 h nach Absenkung der Gentamicinkonzentration wurden die Bakterien und Zellen geerntet. Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	90,52% ± 0,45%	86,80% ± 0,44%	77,54% ± 1,22%	78,57% ± 0,95%
	{YYY}1	4,04% ± 0,33%	5,27% ± 0,56%	9,68% ± 0,85%	9,06% ± 0,83%
	{YYY}2	2,49% ± 0,04%	3,29% ± 0,35%	5,45% ± 0,34%	5,17% ± 0,26%
	{111}	2,95% ± 0,13%	4,64% ± 0,09%	7,33% ± 0,10%	7,20% ± 0,17%
Gly-246	{00}	94,83% ± 0,10%	93,84% ± 0,06%	89,90% ± 0,20%	89,64% ± 0,07%
	{YY}1	0,97% ± 0,11%	1,03% ± 0,08%	1,11% ± 0,11%	1,15% ± 0,02%
	{11}	4,20% ± 0,01%	5,13% ± 0,03%	9,00% ± 0,10%	9,20% ± 0,06%
Ala-260	{000}	82,15% ± 0,14%	72,55% ± 0,26%	49,66% ± 0,05%	50,92% ± 0,22%
	{YYY}1	0,70% ± 0,02%	0,73% ± 0,04%	1,23% ± 0,09%	1,35% ± 0,08%
	{YYY}2	0,97% ± 0,04%	1,47% ± 0,01%	2,64% ± 0,02%	2,62% ± 0,07%
	{111}	16,18% ± 0,07%	25,25% ± 0,24%	46,47% ± 0,12%	45,12% ± 0,11%
Val-288	{00000}	98,63% ± 0,27%	99,46% ± 0,11%	99,71% ± 0,08%	99,60% ± 0,26%
	{YYYYY}1	0,31% ± 0,21%	0,35% ± 0,17%	0,27% ± 0,09%	0,35% ± 0,24%
	{YYYYY}2	0,50% ± 0,08%	0,12% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,52% ± 0,09%	0,07% ± 0,06%	0,01% ± 0,02%	0,03% ± 0,03%
	{YYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,04% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,04%
Leu-274	{X00000}	99,75% ± 0,11%	99,72% ± 0,12%	99,72% ± 0,24%	99,77% ± 0,09%
	{XYYYYY}1	0,19% ± 0,11%	0,23% ± 0,10%	0,22% ± 0,23%	0,17% ± 0,15%
	{XYYYYY}2	0,05% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,03% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,03%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	87,88% ± 0,59%	82,73% ± 0,56%	72,04% ± 0,16%	73,09% ± 0,05%
	{YYYYY}1	1,37% ± 0,18%	1,60% ± 0,90%	2,90% ± 0,13%	2,48% ± 0,19%
	{YYYYY}2	5,12% ± 0,29%	6,93% ± 0,33%	11,23% ± 0,14%	11,15% ± 0,24%
	{YYYYY}3	1,92% ± 0,01%	2,86% ± 0,08%	4,82% ± 0,11%	4,69% ± 0,06%
	{YYYYY}4	2,10% ± 0,07%	3,35% ± 0,05%	5,25% ± 0,06%	4,95% ± 0,04%
	{11111}	1,60% ± 0,06%	2,52% ± 0,08%	3,76% ± 0,02%	3,65% ± 0,07%
Pro-286	{00000}	91,80% ± 0,47%	91,45% ± 0,33%	83,75% ± 0,42%	84,00% ± 0,93%
	{YYYYY}1	1,22% ± 0,26%	0,84% ± 0,15%	1,43% ± 0,37%	1,29% ± 0,80%
	{YYYYY}2	3,48% ± 0,19%	3,85% ± 0,19%	7,45% ± 0,44%	7,53% ± 0,55%
	{YYYYY}3	1,32% ± 0,10%	1,44% ± 0,09%	2,77% ± 0,11%	2,89% ± 0,08%
	{YYYYY}4	1,32% ± 0,04%	1,51% ± 0,14%	2,96% ± 0,04%	2,81% ± 0,12%
	{11111}	0,86% ± 0,05%	0,91% ± 0,06%	1,64% ± 0,03%	1,48% ± 0,22%
Asp-418	{0000}	92,58% ± 0,31%	89,03% ± 0,04%	75,57% ± 0,32%	75,66% ± 0,29%
	{YYYY}1	0,89% ± 0,36%	0,95% ± 0,25%	3,00% ± 0,24%	3,11% ± 0,52%
	{YYYY}2	2,88% ± 0,08%	4,51% ± 0,13%	9,81% ± 0,17%	9,69% ± 0,28%
	{YYYY}3	2,60% ± 0,05%	3,69% ± 0,25%	7,83% ± 0,70%	7,94% ± 0,20%
	{1111}	1,06% ± 0,03%	1,83% ± 0,09%	3,78% ± 0,19%	3,60% ± 0,10%
Thr-404	{0000}	99,46% ± 0,03%	98,37% ± 0,66%	97,94% ± 1,48%	96,68% ± 2,03%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,88% ± 1,17%	0,63% ± 1,09%	2,00% ± 0,85%
	{YYYY}2	0,45% ± 0,10%	0,32% ± 0,39%	0,82% ± 0,80%	0,55% ± 0,61%
	{YYYY}3	0,09% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%	0,30% ± 0,51%	0,04% ± 0,07%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,43% ± 0,38%	0,31% ± 0,53%	0,74% ± 0,77%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280 (Versuch 1)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	97,91% ± 1,06%	94,81% ± 1,56%	97,87% ± 1,53%	97,77% ± 1,96%
	{YYYYYYY}1	0,29% ± 0,12%	0,26% ± 0,10%	0,10% ± 0,08%	0,14% ± 0,12%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,03% ± 0,03%	0,10% ± 0,07%	0,07% ± 0,08%	0,06% ± 0,05%
	{YYYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,03%	0,03% ± 0,00%
	{X11111}	1,77% ± 1,15%	4,82% ± 1,56%	1,93% ± 1,37%	2,00% ± 1,83%
Lys-488	{000000}	99,42% ± 0,28%	99,14% ± 0,58%	99,36% ± 0,21%	98,89% ± 0,50%
	{YYYYYYY}1	0,10% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,13%
	{YYYYYYY}2	0,14% ± 0,23%	0,01% ± 0,01%	0,20% ± 0,34%	0,21% ± 0,36%
	{YYYYYYY}3	0,17% ± 0,15%	0,35% ± 0,32%	0,43% ± 0,43%	0,37% ± 0,38%
	{YYYYYYY}4	0,02% ± 0,04%	0,41% ± 0,26%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,16% ± 0,27%	0,08% ± 0,13%	0,02% ± 0,03%	0,45% ± 0,46%
His-440	{000000}	98,16% ± 1,45%	96,84% ± 1,96%	99,33% ± 0,58%	97,86% ± 1,86%
	{YYYYYYY}1	0,80% ± 1,33%	0,44% ± 0,38%	0,47% ± 0,41%	0,84% ± 1,45%
	{YYYYYYY}2	0,51% ± 0,88%	0,59% ± 0,79%	0,00% ± 0,00%	0,32% ± 0,30%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,91% ± 0,86%	0,07% ± 0,11%	0,52% ± 0,91%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%	0,18% ± 0,32%
	{111111}	0,22% ± 0,28%	0,37% ± 0,33%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
Phe-336	{000000000}	99,64% ± 0,43%	98,13% ± 0,90%	99,68% ± 0,07%	98,00% ± 0,22%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,14% ± 0,24%	0,24% ± 0,41%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,04% ± 0,06%	0,15% ± 0,25%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,03% ± 0,05%	0,33% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%	0,19% ± 0,26%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,41% ± 0,51%	0,01% ± 0,01%	1,02% ± 0,41%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,04% ± 0,05%	0,35% ± 0,61%	0,14% ± 0,10%	0,15% ± 0,26%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,17% ± 0,29%	0,06% ± 0,11%	0,33% ± 0,57%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,07% ± 0,13%	0,16% ± 0,28%	0,04% ± 0,06%	0,08% ± 0,14%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,12% ± 0,20%
	{111111111}	0,01% ± 0,01%	0,06% ± 0,10%	0,03% ± 0,03%	0,09% ± 0,08%
Tyr-466	{000000000}	99,06% ± 1,25%	98,45% ± 1,01%		
	{YYYYYYYYYYY}1	0,39% ± 0,67%	0,58% ± 1,01%		
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}3	0,09% ± 0,16%	0,35% ± 0,60%		
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,18% ± 0,32%		
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}7	0,19% ± 0,33%	0,08% ± 0,13%		
	{111111111}	0,27% ± 0,33%	0,35% ± 0,49%		

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	5,96%	8,59%	14,19%	13,67%
Gly-246	4,69%	5,65%	9,55%	9,78%
Ala-260	17,06%	26,47%	48,64%	47,31%
Val-288	0,61%	0,16%	0,07%	0,11%
Leu-274	0,06%	0,08%	0,08%	0,07%
Glu-432	6,75%	10,01%	15,93%	15,37%
Pro-286	4,34%	4,69%	8,94%	8,73%
Asp-418	4,67%	7,09%	15,31%	15,18%
Thr-404	0,30%	0,81%	1,10%	1,54%
Ile-200	1,85%	4,94%	2,02%	2,09%
Lys-488	0,32%	0,54%	0,29%	0,72%
His-440	0,79%	1,85%	0,24%	0,90%
Phe-336	0,15%	0,84%	0,20%	1,08%
Tyr-466	0,46%	0,65%	0,00%	0,00%

Infektion vorkrankter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	85,29% ± 0,28%	79,90% ± 0,34%	77,74% ± 0,70%	76,52% ± 0,47%
	{YYY}1	6,90% ± 0,27%	9,47% ± 0,20%	11,04% ± 0,40%	11,13% ± 0,41%
	{YYY}2	4,19% ± 0,11%	5,48% ± 0,19%	5,68% ± 0,26%	6,38% ± 0,08%
	{111}	3,62% ± 0,02%	5,15% ± 0,08%	5,54% ± 0,06%	5,97% ± 0,04%
Gly-246	{00}	93,48% ± 0,10%	91,27% ± 0,11%	90,92% ± 0,37%	89,44% ± 0,24%
	{YY}1	1,22% ± 0,08%	1,38% ± 0,09%	0,87% ± 0,44%	1,69% ± 0,17%
	{11}	5,30% ± 0,03%	7,35% ± 0,05%	8,21% ± 0,08%	8,87% ± 0,07%
Ala-260	{000}	70,78% ± 0,04%	53,43% ± 0,35%	47,24% ± 0,24%	45,83% ± 0,18%
	{YYY}1	1,05% ± 0,04%	1,16% ± 0,12%	1,31% ± 0,00%	1,35% ± 0,03%
	{YYY}2	1,66% ± 0,02%	2,44% ± 0,04%	2,82% ± 0,01%	2,90% ± 0,02%
	{111}	26,50% ± 0,07%	42,96% ± 0,23%	48,62% ± 0,24%	49,93% ± 0,18%
Val-288	{00000}	98,46% ± 0,02%	99,40% ± 0,12%	99,71% ± 0,11%	99,54% ± 0,08%
	{YYYYY}1	0,53% ± 0,04%	0,52% ± 0,07%	0,28% ± 0,11%	0,46% ± 0,08%
	{YYYYY}2	0,48% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,48% ± 0,01%	0,07% ± 0,06%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,05% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,84% ± 0,05%	99,90% ± 0,05%	99,80% ± 0,08%	99,73% ± 0,04%
	{XYYYYY}1	0,13% ± 0,05%	0,09% ± 0,03%	0,12% ± 0,02%	0,26% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,03% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	80,42% ± 0,21%	70,82% ± 0,31%	70,49% ± 0,04%	68,59% ± 1,14%
	{YYYYY}1	2,30% ± 0,13%	2,43% ± 0,14%	3,04% ± 0,14%	2,96% ± 0,56%
	{YYYYY}2	7,24% ± 0,04%	10,40% ± 0,12%	11,26% ± 0,08%	11,74% ± 0,05%
	{YYYYY}3	3,19% ± 0,06%	5,11% ± 0,07%	5,21% ± 0,06%	5,53% ± 0,15%
	{YYYYY}4	3,80% ± 0,05%	6,23% ± 0,06%	5,68% ± 0,04%	6,37% ± 0,23%
	{11111}	3,04% ± 0,02%	5,02% ± 0,01%	4,32% ± 0,03%	4,82% ± 0,16%
Pro-286	{00000}	85,47% ± 0,45%	83,61% ± 0,12%	80,92% ± 0,82%	76,96% ± 1,46%
	{YYYYY}1	1,93% ± 0,18%	1,89% ± 0,08%	1,90% ± 0,14%	2,20% ± 0,18%
	{YYYYY}2	6,07% ± 0,30%	6,53% ± 0,00%	7,81% ± 0,61%	9,36% ± 0,55%
	{YYYYY}3	2,31% ± 0,18%	2,73% ± 0,05%	3,41% ± 0,11%	3,91% ± 0,27%
	{YYYYY}4	2,64% ± 0,06%	3,15% ± 0,10%	3,75% ± 0,06%	4,89% ± 0,10%
	{11111}	1,57% ± 0,21%	2,09% ± 0,02%	2,22% ± 0,21%	2,67% ± 0,44%
Asp-418	{0000}	88,48% ± 0,39%	80,89% ± 0,25%	73,49% ± 0,26%	73,07% ± 0,19%
	{YYYY}1	0,75% ± 0,30%	1,41% ± 0,42%	3,17% ± 0,09%	2,68% ± 0,13%
	{YYYY}2	4,42% ± 0,06%	7,17% ± 0,14%	10,15% ± 0,26%	10,25% ± 0,11%
	{YYYY}3	4,05% ± 0,03%	6,43% ± 0,02%	8,62% ± 0,23%	8,70% ± 0,03%
	{1111}	2,29% ± 0,01%	4,10% ± 0,01%	4,56% ± 0,05%	5,29% ± 0,02%
Thr-404	{0000}	99,49% ± 0,22%	99,33% ± 0,23%	99,02% ± 0,47%	99,65% ± 0,10%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,02%
	{YYYY}2	0,51% ± 0,22%	0,50% ± 0,20%	0,94% ± 0,54%	0,34% ± 0,12%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,17% ± 0,16%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280 (Versuch 2)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	98,92% \pm 0,16%	98,43% \pm 0,96%	98,00% \pm 0,34%	99,53% \pm 0,08%
	{YYYYYYY}1	0,17% \pm 0,05%	0,16% \pm 0,07%	0,23% \pm 0,07%	0,21% \pm 0,02%
	{YYYYYYY}2	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% \pm 0,00%	0,05% \pm 0,02%	0,12% \pm 0,05%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% \pm 0,00%	0,03% \pm 0,01%	0,03% \pm 0,01%	0,00% \pm 0,00%
	{X11111}	0,90% \pm 0,20%	1,32% \pm 0,90%	1,62% \pm 0,36%	0,26% \pm 0,09%
Lys-488	{000000}	98,10% \pm 1,24%	95,00% \pm 4,72%	99,68% \pm 0,07%	99,79% \pm 0,02%
	{YYYYYYY}1	1,19% \pm 1,15%	1,10% \pm 1,20%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,20% \pm 0,17%	1,56% \pm 0,68%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,41% \pm 0,36%	0,59% \pm 0,87%	0,26% \pm 0,11%	0,20% \pm 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,00% \pm 0,00%	0,43% \pm 0,75%	0,01% \pm 0,01%	0,00% \pm 0,00%
	{111111}	0,10% \pm 0,06%	0,78% \pm 0,95%	0,06% \pm 0,05%	0,01% \pm 0,02%
His-440	{000000}	99,71% \pm 0,12%	98,69% \pm 0,57%	98,99% \pm 0,86%	99,34% \pm 0,37%
	{YYYYYYY}1	0,05% \pm 0,09%	0,77% \pm 0,30%	0,32% \pm 0,34%	0,41% \pm 0,40%
	{YYYYYYY}2	0,20% \pm 0,18%	0,00% \pm 0,00%	0,16% \pm 0,16%	0,02% \pm 0,02%
	{YYYYYYY}3	0,04% \pm 0,07%	0,01% \pm 0,02%	0,17% \pm 0,30%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% \pm 0,00%	0,02% \pm 0,03%	0,08% \pm 0,14%	0,00% \pm 0,00%
	{111111}	0,00% \pm 0,00%	0,22% \pm 0,39%	0,23% \pm 0,20%	0,22% \pm 0,01%
Phe-336	{000000000}	99,85% \pm 0,09%	99,58% \pm 0,26%	99,76% \pm 0,15%	99,95% \pm 0,06%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,01% \pm 0,02%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,05% \pm 0,07%	0,00% \pm 0,00%	0,08% \pm 0,11%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,01% \pm 0,01%	0,07% \pm 0,12%	0,03% \pm 0,05%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,03% \pm 0,03%	0,12% \pm 0,09%	0,03% \pm 0,05%	0,03% \pm 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,04% \pm 0,06%	0,07% \pm 0,10%	0,01% \pm 0,01%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,01% \pm 0,02%	0,02% \pm 0,04%	0,00% \pm 0,00%	0,01% \pm 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,01% \pm 0,00%	0,07% \pm 0,13%	0,01% \pm 0,02%	0,00% \pm 0,00%
	{111111111}	0,00% \pm 0,00%	0,06% \pm 0,05%	0,03% \pm 0,06%	0,00% \pm 0,00%
Tyr-466	{000000000}	99,79% \pm 0,30%	99,94% \pm 0,10%	67,98% \pm 16,93%	99,54% \pm 0,29%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	5,06% \pm 8,76%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	8,73% \pm 7,83%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	2,02% \pm 3,50%	0,00% \pm 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	0,11% \pm 0,19%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	1,57% \pm 2,72%	0,09% \pm 0,15%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% \pm 0,00%	0,00% \pm 0,00%	1,63% \pm 2,83%	0,00% \pm 0,00%
	{111111111}	0,00% \pm 0,00%	0,06% \pm 0,10%	10,56% \pm 13,09%	0,27% \pm 0,46%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	8,72%	11,96%	13,01%	13,93%
Gly-246	5,91%	8,04%	8,65%	9,71%
Ala-260	27,96%	44,98%	50,94%	52,31%
Val-288	0,63%	0,16%	0,07%	0,09%
Leu-274	0,06%	0,03%	0,07%	0,06%
Glu-432	11,35%	17,71%	17,10%	18,51%
Pro-286	7,88%	9,24%	10,77%	13,12%
Asp-418	7,73%	12,86%	16,90%	17,62%
Thr-404	0,26%	0,42%	0,50%	0,17%
Ile-200	0,94%	1,41%	1,76%	0,30%
Lys-488	0,57%	2,51%	0,19%	0,11%
His-440	0,10%	0,61%	0,48%	0,27%
Phe-336	0,06%	0,24%	0,13%	0,03%
Tyr-466	0,19%	0,06%	19,42%	0,38%

Anhang 15: Tabellen ¹³C-Versuche „vormarkierte Caco-2-Zellen infiziert mit FCS behandelten *S. Typhimurium* 14028s“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologienverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von ¹³C-vormarkierten Caco-2-Zellen isoliert wurden (s. auch Abb. 34). Für die Vormarkierung wurden die Zellen permanent in RPMI mit 10% FCS und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose kultiviert. Zu Beginn des Versuches wurde das [U-¹³C₆]-Glukose-haltige Medium gegen RPMI 1640 mit 10% FCS, unmarkierter Glukose und den Bakterien ersetzt, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml verringert. 8 h nach Absenkung der Gentamicinkonzentration wurden die Bakterien und Zellen geerntet. Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>	Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>
Ser-390	{000}	81,12% ± 0,91%	78,60% ± 0,82%	76,30% ± 0,58%	73,77% ± 0,22%
	{YYY}1	8,62% ± 0,78%	9,80% ± 0,35%	11,37% ± 0,48%	13,65% ± 0,25%
	{YYY}2	4,83% ± 0,16%	5,49% ± 0,40%	6,07% ± 0,01%	6,35% ± 0,17%
	{111}	5,44% ± 0,08%	6,10% ± 0,11%	6,26% ± 0,10%	6,23% ± 0,04%
Gly-246	{00}	91,31% ± 0,05%	90,03% ± 0,14%	89,29% ± 0,02%	87,27% ± 0,08%
	{YY}1	1,48% ± 0,05%	1,75% ± 0,07%	1,68% ± 0,07%	3,66% ± 0,03%
	{11}	7,20% ± 0,02%	8,22% ± 0,07%	9,03% ± 0,05%	9,07% ± 0,08%
Ala-260	{000}	62,66% ± 0,34%	57,75% ± 0,46%	46,96% ± 0,45%	46,05% ± 0,19%
	{YYY}1	1,12% ± 0,08%	1,50% ± 0,11%	1,38% ± 0,05%	2,90% ± 0,04%
	{YYY}2	2,13% ± 0,07%	2,49% ± 0,07%	2,91% ± 0,04%	2,90% ± 0,04%
	{111}	34,09% ± 0,21%	38,26% ± 0,29%	48,75% ± 0,36%	48,16% ± 0,24%
Val-288	{00000}	98,62% ± 0,04%	98,36% ± 0,07%	99,76% ± 0,10%	94,32% ± 0,08%
	{YYYYY}1	0,54% ± 0,11%	0,67% ± 0,12%	0,23% ± 0,10%	5,66% ± 0,11%
	{YYYYY}2	0,27% ± 0,06%	0,34% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYY}3	0,33% ± 0,03%	0,34% ± 0,03%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,24% ± 0,03%	0,28% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,66% ± 0,04%	99,70% ± 0,04%	99,83% ± 0,01%	94,50% ± 0,03%
	{XYYYYY}1	0,15% ± 0,08%	0,11% ± 0,04%	0,16% ± 0,02%	5,49% ± 0,03%
	{XYYYYY}2	0,10% ± 0,04%	0,06% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,03% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,03% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,04% ± 0,01%	0,07% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	72,93% ± 0,41%	69,98% ± 0,28%	69,12% ± 0,11%	66,09% ± 0,42%
	{YYYYY}1	2,60% ± 0,23%	3,02% ± 0,23%	2,85% ± 0,23%	6,68% ± 0,20%
	{YYYYY}2	10,09% ± 0,28%	11,04% ± 0,08%	11,43% ± 0,03%	10,92% ± 0,15%
	{YYYYY}3	4,81% ± 0,08%	5,32% ± 0,05%	5,70% ± 0,09%	5,71% ± 0,02%
	{YYYYY}4	5,43% ± 0,11%	6,00% ± 0,07%	6,22% ± 0,03%	6,05% ± 0,08%
	{11111}	4,14% ± 0,05%	4,64% ± 0,07%	4,68% ± 0,08%	4,55% ± 0,04%
Pro-286	{00000}	83,74% ± 0,35%	81,45% ± 0,65%	77,42% ± 1,23%	72,85% ± 0,31%
	{YYYYY}1	1,84% ± 0,01%	2,16% ± 0,05%	2,25% ± 0,26%	6,30% ± 0,05%
	{YYYYY}2	6,48% ± 0,23%	7,37% ± 0,32%	9,16% ± 0,61%	9,18% ± 0,32%
	{YYYYY}3	2,85% ± 0,05%	3,37% ± 0,16%	4,04% ± 0,18%	4,38% ± 0,07%
	{YYYYY}4	3,03% ± 0,08%	3,52% ± 0,14%	4,32% ± 0,16%	4,47% ± 0,07%
	{11111}	2,06% ± 0,03%	2,14% ± 0,12%	2,80% ± 0,10%	2,83% ± 0,06%
Asp-418	{0000}	80,38% ± 0,25%	77,87% ± 0,19%	71,77% ± 0,15%	68,83% ± 0,13%
	{YYYY}1	2,63% ± 0,22%	2,87% ± 0,13%	3,35% ± 0,27%	6,54% ± 0,12%
	{YYYY}2	7,11% ± 0,16%	8,18% ± 0,05%	10,62% ± 0,05%	10,35% ± 0,11%
	{YYYY}3	6,56% ± 0,12%	7,39% ± 0,08%	9,35% ± 0,16%	9,33% ± 0,12%
	{1111}	3,32% ± 0,03%	3,69% ± 0,08%	4,90% ± 0,09%	4,95% ± 0,02%
Thr-404	{0000}	99,10% ± 0,23%	98,74% ± 0,22%	98,32% ± 0,74%	92,90% ± 0,83%
	{YYYY}1	0,32% ± 0,12%	0,32% ± 0,39%	0,88% ± 0,41%	5,47% ± 0,34%
	{YYYY}2	0,54% ± 0,17%	0,90% ± 0,44%	0,80% ± 0,52%	1,63% ± 0,51%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,04% ± 0,08%	0,04% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s (Versuch 1)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	98,56% ± 0,34%	98,75% ± 0,68%	98,94% ± 0,21%	93,89% ± 0,13%
	{YYYYYYY}1	0,19% ± 0,04%	0,11% ± 0,03%	0,19% ± 0,02%	5,40% ± 0,05%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,02% ± 0,02%	0,04% ± 0,03%	0,03% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	1,23% ± 0,28%	1,09% ± 0,63%	0,83% ± 0,20%	0,70% ± 0,13%
Lys-488	{000000}	98,51% ± 0,71%	99,33% ± 0,19%	99,76% ± 0,13%	93,75% ± 0,31%
	{YYYYYYY}1	0,63% ± 0,77%	0,06% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	5,94% ± 0,18%
	{YYYYYYY}2	0,21% ± 0,21%	0,15% ± 0,25%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,08%
	{YYYYYYY}3	0,58% ± 0,11%	0,37% ± 0,14%	0,23% ± 0,11%	0,25% ± 0,07%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,08% ± 0,13%	0,08% ± 0,07%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%
His-440	{000000}	99,29% ± 0,19%	98,85% ± 0,61%	99,90% ± 0,07%	93,52% ± 0,52%
	{YYYYYYY}1	0,52% ± 0,26%	0,73% ± 0,68%	0,08% ± 0,09%	6,05% ± 0,19%
	{YYYYYYY}2	0,02% ± 0,04%	0,09% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,14% ± 0,12%
	{YYYYYYY}3	0,03% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,15% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,09%
	{111111}	0,11% ± 0,18%	0,08% ± 0,09%	0,01% ± 0,02%	0,07% ± 0,08%
Phe-336	{000000000}	99,62% ± 0,08%	99,20% ± 0,46%	99,72% ± 0,32%	90,58% ± 0,45%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,09% ± 0,15%	0,18% ± 0,32%	0,22% ± 0,37%	9,04% ± 0,43%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,09% ± 0,02%	0,05% ± 0,06%	0,01% ± 0,01%	0,29% ± 0,10%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,01%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,02% ± 0,02%	0,06% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,03% ± 0,04%	0,08% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,03% ± 0,03%	0,04% ± 0,07%	0,04% ± 0,04%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,06% ± 0,06%	0,09% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{111111111}	0,06% ± 0,11%	0,26% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
Tyr-466	{000000000}	99,84% ± 0,11%	99,84% ± 0,17%		
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}3	0,05% ± 0,09%	0,11% ± 0,09%		
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,09%		
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{111111111}	0,09% ± 0,12%	0,00% ± 0,00%		

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	11,53%	13,03%	14,09%	15,02%
Gly-246	7,94%	9,10%	9,87%	10,90%
Ala-260	35,88%	40,42%	51,15%	51,05%
Val-288	0,65%	0,77%	0,05%	1,14%
Leu-274	0,14%	0,16%	0,04%	1,11%
Glu-432	15,93%	17,65%	18,22%	18,52%
Pro-286	9,16%	10,35%	12,80%	13,96%
Asp-418	12,45%	14,04%	18,06%	18,76%
Thr-404	0,40%	0,57%	0,62%	2,18%
Ile-200	1,28%	1,14%	0,90%	1,78%
Lys-488	0,54%	0,33%	0,13%	1,14%
His-440	0,23%	0,42%	0,03%	1,29%
Phe-336	0,18%	0,47%	0,06%	1,14%
Tyr-466	0,12%	0,07%	0,00%	0,00%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s (Versuch 2)
bakterielle AS

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	77,08% ± 0,74%	73,11% ± 0,30%	74,50% ± 1,26%	74,01% ± 0,07%
	{YYY}1	10,22% ± 0,67%	11,68% ± 0,39%	11,23% ± 1,05%	11,16% ± 0,03%
	{YYY}2	5,49% ± 0,05%	6,26% ± 0,01%	6,17% ± 0,18%	6,20% ± 0,07%
	{111}	7,20% ± 0,12%	8,95% ± 0,09%	8,10% ± 0,07%	8,63% ± 0,03%
Gly-246	{00}	89,43% ± 0,05%	87,12% ± 0,06%	88,39% ± 0,17%	88,50% ± 0,39%
	{YY}1	1,33% ± 0,01%	1,81% ± 0,03%	1,39% ± 0,12%	2,25% ± 0,13%
	{11}	9,24% ± 0,06%	11,07% ± 0,03%	10,23% ± 0,07%	9,25% ± 0,28%
Ala-260	{000}	58,54% ± 0,16%	47,41% ± 0,19%	52,25% ± 0,07%	52,72% ± 0,14%
	{YYY}1	0,95% ± 0,07%	1,22% ± 0,04%	0,97% ± 0,04%	1,08% ± 0,01%
	{YYY}2	2,19% ± 0,01%	2,80% ± 0,01%	2,51% ± 0,01%	2,55% ± 0,02%
	{111}	38,32% ± 0,09%	48,58% ± 0,21%	44,28% ± 0,08%	43,65% ± 0,13%
Val-288	{00000}	99,01% ± 0,11%	99,30% ± 0,06%	99,81% ± 0,10%	99,65% ± 0,20%
	{YYYYY}1	0,40% ± 0,06%	0,48% ± 0,06%	0,15% ± 0,14%	0,26% ± 0,23%
	{YYYYY}2	0,29% ± 0,07%	0,13% ± 0,03%	0,01% ± 0,02%	0,05% ± 0,04%
	{YYYYY}3	0,24% ± 0,02%	0,07% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%	0,03% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,05% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,84% ± 0,08%	99,85% ± 0,01%	99,87% ± 0,01%	99,92% ± 0,04%
	{XYYYYY}1	0,14% ± 0,07%	0,14% ± 0,01%	0,11% ± 0,02%	0,07% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	75,41% ± 0,28%	70,38% ± 0,16%	72,97% ± 0,20%	73,08% ± 0,23%
	{YYYYY}1	3,01% ± 0,19%	3,30% ± 0,20%	3,14% ± 0,09%	3,36% ± 0,05%
	{YYYYY}2	9,82% ± 0,04%	11,59% ± 0,06%	10,84% ± 0,15%	10,49% ± 0,12%
	{YYYYY}3	4,02% ± 0,08%	5,01% ± 0,10%	4,52% ± 0,06%	4,45% ± 0,08%
	{YYYYY}4	4,68% ± 0,03%	5,88% ± 0,04%	5,14% ± 0,03%	5,14% ± 0,04%
	{11111}	3,07% ± 0,01%	3,84% ± 0,02%	3,38% ± 0,02%	3,48% ± 0,05%
Pro-286	{00000}	80,54% ± 0,52%	77,68% ± 0,40%	78,91% ± 0,24%	80,38% ± 0,45%
	{YYYYY}1	1,59% ± 0,15%	1,58% ± 0,15%	1,62% ± 0,16%	1,59% ± 0,09%
	{YYYYY}2	8,90% ± 0,31%	10,31% ± 0,15%	9,88% ± 0,26%	9,93% ± 0,09%
	{YYYYY}3	3,60% ± 0,08%	4,09% ± 0,05%	3,87% ± 0,03%	4,06% ± 0,06%
	{YYYYY}4	3,39% ± 0,02%	4,04% ± 0,03%	3,70% ± 0,01%	3,77% ± 0,09%
	{11111}	1,98% ± 0,04%	2,31% ± 0,05%	2,02% ± 0,11%	0,27% ± 0,47%
Asp-418	{0000}	82,23% ± 0,36%	77,15% ± 0,15%	75,21% ± 0,26%	74,71% ± 0,42%
	{YYYY}1	3,16% ± 0,19%	4,05% ± 0,22%	4,06% ± 0,11%	4,36% ± 0,30%
	{YYYY}2	6,55% ± 0,21%	8,36% ± 0,16%	9,29% ± 0,19%	9,39% ± 0,07%
	{YYYY}3	5,24% ± 0,08%	6,71% ± 0,05%	7,45% ± 0,04%	7,50% ± 0,12%
	{1111}	2,82% ± 0,02%	3,73% ± 0,06%	3,98% ± 0,08%	4,03% ± 0,07%
Thr-404	{0000}	98,71% ± 0,25%	98,78% ± 0,18%	98,98% ± 0,37%	98,17% ± 0,82%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	1,21% ± 0,37%	1,22% ± 0,18%	0,83% ± 0,64%	1,54% ± 0,76%
	{YYYY}3	0,08% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,34%	0,09% ± 0,15%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,28%

Infektion vormarkierter Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s (Versuch 2)
bakterielle AS

		Wildtyp		$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp		$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$		Wildtyp	
Ile-200	{X00000}	99,61% ± 0,02%	99,78% ± 0,13%	99,77% ± 0,15%	99,72% ± 0,20%		
	{XYYYYY}1	0,27% ± 0,05%	0,19% ± 0,15%	0,21% ± 0,15%	0,14% ± 0,17%		
	{XYYYYY}2	0,10% ± 0,08%	0,03% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,13% ± 0,05%		
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{X11111}	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%		
Lys-488	{000000}	98,83% ± 0,46%	98,54% ± 0,49%	99,01% ± 0,34%	98,08% ± 0,99%		
	{YYYYYY}1	0,68% ± 0,43%	1,10% ± 0,43%	0,53% ± 0,17%	0,98% ± 0,18%		
	{YYYYYY}2	0,25% ± 0,16%	0,16% ± 0,10%	0,40% ± 0,10%	0,31% ± 0,30%		
	{YYYYYY}3	0,16% ± 0,10%	0,05% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,12% ± 0,21%		
	{YYYYYY}4	0,03% ± 0,02%	0,06% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,14%		
	{YYYYYY}5	0,05% ± 0,01%	0,05% ± 0,03%	0,02% ± 0,02%	0,25% ± 0,43%		
{111111}	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,05%	0,04% ± 0,07%	0,17% ± 0,24%			
His-440	{000000}	99,81% ± 0,07%	99,46% ± 0,09%	99,19% ± 0,41%			
	{YYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,31% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%			
	{YYYYYY}2	0,08% ± 0,05%	0,20% ± 0,05%	0,05% ± 0,08%			
	{YYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%	0,12% ± 0,20%			
	{YYYYYY}4	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,32% ± 0,21%			
	{YYYYYY}5	0,07% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,10%			
{111111}	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,13% ± 0,17%				
Phe-336	{00000000}	98,76% ± 0,11%	98,95% ± 0,12%	98,95% ± 0,14%	98,94% ± 0,33%		
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}2	1,10% ± 0,12%	0,99% ± 0,06%	0,92% ± 0,19%	0,92% ± 0,45%		
	{YYYYYYYY}3	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}4	0,05% ± 0,06%	0,05% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}5	0,06% ± 0,06%	0,01% ± 0,02%	0,03% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%		
	{YYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,04% ± 0,04%		
	{YYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,06%	0,02% ± 0,02%		
	{YYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,06%	0,05% ± 0,09%		
	{11111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
Tyr-466	{00000000}	98,97% ± 0,39%	98,96% ± 0,35%	84,04% ± 8,16%	85,99% ± 8,20%		
	{YYYYYYYY}1	0,62% ± 0,39%	0,39% ± 0,25%	0,43% ± 0,74%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	1,11% ± 1,92%	4,44% ± 6,28%		
	{YYYYYYYY}3	0,26% ± 0,04%	0,05% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}4	0,07% ± 0,02%	0,07% ± 0,08%	0,86% ± 1,49%	0,64% ± 0,90%		
	{YYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	1,88% ± 1,64%	5,46% ± 7,73%		
	{YYYYYYYY}6	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	1,77% ± 2,45%	3,47% ± 4,91%		
	{YYYYYYYY}7	0,05% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	4,28% ± 3,70%	0,00% ± 0,00%		
	{11111111}	0,02% ± 0,03%	0,53% ± 0,22%	5,63% ± 5,23%	0,00% ± 0,00%		

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	14,27%	17,02%	15,96%	16,49%
Gly-246	9,90%	11,98%	10,92%	10,38%
Ala-260	40,09%	50,85%	46,27%	45,71%
Val-288	0,40%	0,21%	0,05%	0,11%
Leu-274	0,05%	0,04%	0,04%	0,02%
Glu-432	13,75%	16,85%	15,17%	15,13%
Pro-286	10,73%	12,43%	11,58%	10,01%
Asp-418	10,82%	13,95%	15,23%	15,45%
Thr-404	0,67%	0,61%	0,56%	1,04%
Ile-200	0,11%	0,05%	0,06%	0,09%
Lys-488	0,34%	0,38%	0,28%	0,76%
His-440	0,12%	0,13%	0,58%	0,00%
Phe-336	0,31%	0,25%	0,29%	0,30%
Tyr-466	0,25%	0,62%	12,34%	6,62%

Anhang 16: Tabellen ¹³C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten *EIEC* 4608-58“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologengeverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 27-30). Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10 % FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10 % FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 6 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>	Wildtyp	<i>ΔptsG, manXYZ, uhpT</i>
Ser-390	{000}	97,04% ± 0,36%	98,71% ± 0,05%	97,36% ± 0,54%	97,89% ± 0,26%
	{YYY}1	0,35% ± 0,27%	0,00% ± 0,00%	0,30% ± 0,48%	0,10% ± 0,14%
	{YYY}2	0,67% ± 0,12%	0,38% ± 0,09%	0,81% ± 0,08%	0,68% ± 0,18%
	{111}	1,94% ± 0,02%	0,91% ± 0,04%	1,52% ± 0,03%	1,33% ± 0,04%
Gly-246	{00}	98,65% ± 0,02%	99,39% ± 0,03%	98,15% ± 0,01%	98,36% ± 0,06%
	{YY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11}	1,35% ± 0,02%	0,61% ± 0,03%	1,85% ± 0,01%	1,64% ± 0,06%
Ala-260	{000}	87,40% ± 0,08%	93,12% ± 0,08%	86,19% ± 0,02%	86,55% ± 0,08%
	{YYY}1	0,05% ± 0,02%	0,03% ± 0,05%	0,05% ± 0,02%	0,05% ± 0,05%
	{YYY}2	0,54% ± 0,01%	0,25% ± 0,01%	0,58% ± 0,03%	0,55% ± 0,03%
	{111}	12,01% ± 0,06%	6,60% ± 0,03%	13,18% ± 0,02%	12,86% ± 0,06%
Val-288	{00000}	96,59% ± 0,06%	99,87% ± 0,08%	99,97% ± 0,01%	99,89% ± 0,06%
	{YYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	0,53% ± 0,02%	0,05% ± 0,05%	0,01% ± 0,01%	0,06% ± 0,02%
	{YYYYY}3	0,49% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,18% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{11111}	2,21% ± 0,02%	0,06% ± 0,02%	0,02% ± 0,01%	0,04% ± 0,03%
Leu-274	{X00000}	99,96% ± 0,02%	99,98% ± 0,01%	99,98% ± 0,01%	99,98% ± 0,01%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%
	{X11111}	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	94,00% ± 0,21%	97,73% ± 0,10%	91,48% ± 0,11%	92,32% ± 0,16%
	{YYYYY}1	0,19% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,54% ± 0,09%	0,45% ± 0,15%
	{YYYYY}2	3,06% ± 0,15%	1,43% ± 0,05%	4,88% ± 0,05%	4,36% ± 0,09%
	{YYYYY}3	0,81% ± 0,03%	0,38% ± 0,06%	1,25% ± 0,03%	1,13% ± 0,03%
	{YYYYY}4	1,42% ± 0,01%	0,34% ± 0,01%	1,32% ± 0,02%	1,23% ± 0,01%
	{11111}	0,52% ± 0,01%	0,12% ± 0,00%	0,52% ± 0,01%	0,52% ± 0,00%
Pro-286	{00000}	97,96% ± 0,35%	96,85% ± 0,70%	96,77% ± 1,12%	95,82% ± 0,25%
	{YYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,05%	0,07% ± 0,06%	0,11% ± 0,15%
	{YYYYY}2	1,68% ± 0,40%	1,50% ± 0,13%	2,35% ± 0,43%	2,16% ± 0,51%
	{YYYYY}3	0,36% ± 0,08%	0,27% ± 0,09%	0,43% ± 0,07%	0,43% ± 0,10%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	1,26% ± 0,77%	0,33% ± 0,56%	1,30% ± 0,30%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,04%	0,06% ± 0,10%	0,18% ± 0,06%
Asp-418	{0000}	90,80% ± 0,23%	97,78% ± 0,15%	96,18% ± 0,21%	96,44% ± 0,06%
	{YYYY}1	0,25% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%	0,29% ± 0,16%	0,19% ± 0,12%
	{YYYY}2	2,80% ± 0,07%	1,36% ± 0,21%	2,23% ± 0,08%	2,03% ± 0,09%
	{YYYY}3	5,53% ± 0,03%	0,72% ± 0,05%	1,06% ± 0,03%	1,11% ± 0,02%
	{1111}	0,62% ± 0,02%	0,14% ± 0,04%	0,23% ± 0,02%	0,24% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	98,84% ± 0,09%	98,77% ± 0,52%	99,34% ± 0,33%	98,34% ± 0,62%
	{YYYY}1	0,93% ± 0,09%	1,19% ± 0,49%	0,64% ± 0,32%	1,64% ± 0,65%
	{YYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}3	0,19% ± 0,07%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,03% ± 0,03%	0,03% ± 0,03%	0,03% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ile-200	{X00000}	99,81% ± 0,03%	99,84% ± 0,04%	99,91% ± 0,01%	99,91% ± 0,03%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,09% ± 0,02%	0,05% ± 0,00%	0,06% ± 0,00%	0,03% ± 0,01%
	{YYYYYYY}3	0,04% ± 0,01%	0,05% ± 0,01%	0,02% ± 0,00%	0,03% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,05% ± 0,01%	0,06% ± 0,03%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%
Lys-488	{000000}	98,94% ± 0,21%	99,59% ± 0,14%	99,64% ± 0,10%	99,71% ± 0,07%
	{YYYYYYY}1	0,06% ± 0,08%	0,12% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,46% ± 0,05%	0,22% ± 0,03%	0,33% ± 0,09%	0,28% ± 0,05%
	{YYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,06% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	0,40% ± 0,12%	0,04% ± 0,04%	0,03% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%
{111111}	0,07% ± 0,06%	0,03% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	
His-440	{000000}	98,48% ± 0,06%	99,47% ± 0,07%	99,78% ± 0,06%	99,76% ± 0,11%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,57% ± 0,11%	0,34% ± 0,06%	0,16% ± 0,05%	0,17% ± 0,10%
	{YYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,08% ± 0,05%	0,04% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	0,82% ± 0,02%	0,15% ± 0,05%	0,04% ± 0,03%	0,07% ± 0,03%
{111111}	0,04% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	
Phe-336	{000000000}	99,03% ± 0,51%	98,64% ± 0,49%	99,33% ± 0,55%	98,86% ± 0,39%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,64% ± 0,52%	1,14% ± 0,42%	0,61% ± 0,53%	1,04% ± 0,36%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,01%	0,05% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,07% ± 0,06%	0,06% ± 0,06%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,05% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%
{111111111}	0,20% ± 0,02%	0,03% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	
Tyr-466	{000000000}	99,14% ± 0,08%	98,98% ± 1,10%		99,75% ± 0,11%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		0,14% ± 0,20%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%		0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%		0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%		0,09% ± 0,12%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,05% ± 0,03%	0,02% ± 0,02%		0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,79% ± 0,08%	0,98% ± 1,11%		0,00% ± 0,00%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,50%	1,16%	2,17%	1,82%
Gly-246	1,35%	0,61%	1,85%	1,64%
Ala-260	12,38%	6,78%	13,58%	13,24%
Val-288	2,86%	0,09%	0,02%	0,07%
Leu-274	0,03%	0,02%	0,02%	0,02%
Glu-432	3,41%	1,19%	4,39%	4,01%
Pro-286	0,89%	1,86%	1,53%	2,36%
Asp-418	6,23%	1,36%	2,21%	2,13%
Thr-404	0,41%	0,33%	0,19%	0,43%
Ile-200	0,12%	0,11%	0,05%	0,06%
Lys-488	0,61%	0,16%	0,13%	0,11%
His-440	0,97%	0,26%	0,11%	0,12%
Phe-336	0,37%	0,27%	0,11%	0,18%
Tyr-466	0,84%	1,01%	0,00%	0,09%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	95,65% ± 0,37%	97,17% ± 0,25%	96,62% ± 0,19%	95,65% ± 0,75%
	{YYY}1	1,67% ± 0,39%	2,29% ± 0,36%	1,33% ± 0,19%	2,93% ± 0,77%
	{YYY}2	1,26% ± 0,04%	0,08% ± 0,14%	1,33% ± 0,01%	0,66% ± 0,02%
	{111}	1,42% ± 0,03%	0,45% ± 0,16%	0,72% ± 0,02%	0,77% ± 0,07%
Gly-246	{00}	97,72% ± 0,19%	99,50% ± 0,05%	97,81% ± 0,02%	98,33% ± 0,08%
	{YY}1	0,77% ± 0,17%	0,03% ± 0,04%	0,73% ± 0,02%	0,34% ± 0,09%
	{11}	1,51% ± 0,03%	0,47% ± 0,02%	1,46% ± 0,02%	1,33% ± 0,01%
Ala-260	{000}	87,43% ± 0,03%	96,28% ± 0,07%	91,94% ± 2,95%	91,01% ± 0,07%
	{YYY}1	0,43% ± 0,06%	0,02% ± 0,04%	0,24% ± 0,23%	0,06% ± 0,05%
	{YYY}2	0,55% ± 0,02%	0,11% ± 0,02%	0,26% ± 0,23%	0,35% ± 0,04%
	{111}	11,60% ± 0,04%	3,59% ± 0,04%	7,57% ± 2,52%	8,58% ± 0,03%
Val-288	{00000}	95,93% ± 0,34%	99,47% ± 0,09%	99,61% ± 0,12%	99,74% ± 0,05%
	{YYYYY}1	0,26% ± 0,23%	0,24% ± 0,02%	0,39% ± 0,12%	0,21% ± 0,07%
	{YYYYY}2	0,36% ± 0,31%	0,08% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYY}3	0,72% ± 0,02%	0,06% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,27% ± 0,22%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	2,47% ± 0,03%	0,14% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,77% ± 0,04%	99,85% ± 0,05%	99,86% ± 0,03%	99,82% ± 0,09%
	{XYYYYY}1	0,21% ± 0,04%	0,14% ± 0,05%	0,14% ± 0,04%	0,18% ± 0,09%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	91,64% ± 0,29%	96,84% ± 0,10%	89,66% ± 0,24%	90,06% ± 0,22%
	{YYYYY}1	1,27% ± 0,26%	1,45% ± 0,04%	1,63% ± 0,23%	2,01% ± 0,33%
	{YYYYY}2	3,96% ± 0,15%	1,23% ± 0,07%	5,65% ± 0,15%	5,16% ± 0,15%
	{YYYYY}3	0,84% ± 0,02%	0,22% ± 0,07%	1,33% ± 0,01%	1,23% ± 0,09%
	{YYYYY}4	1,61% ± 0,00%	0,19% ± 0,00%	1,30% ± 0,02%	1,15% ± 0,01%
	{11111}	0,68% ± 0,01%	0,08% ± 0,01%	0,43% ± 0,01%	0,39% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	96,76% ± 0,22%	97,88% ± 0,12%	96,88% ± 0,19%	97,12% ± 0,07%
	{YYYYY}1	0,80% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	1,02% ± 0,30%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYY}2	1,65% ± 0,09%	1,25% ± 0,08%	1,56% ± 0,08%	1,73% ± 0,07%
	{YYYYY}3	0,31% ± 0,03%	0,77% ± 0,04%	0,27% ± 0,03%	0,90% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,34% ± 0,04%	0,08% ± 0,04%	0,22% ± 0,03%	0,25% ± 0,03%
	{11111}	0,15% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%	0,05% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	90,56% ± 0,04%	97,12% ± 0,10%	97,40% ± 0,13%	95,39% ± 0,27%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	1,31% ± 0,20%	0,00% ± 0,00%	1,93% ± 0,28%
	{YYYY}2	2,64% ± 0,07%	1,06% ± 0,08%	1,55% ± 0,14%	1,81% ± 0,04%
	{YYYY}3	5,99% ± 0,07%	0,37% ± 0,02%	0,84% ± 0,00%	0,63% ± 0,05%
	{1111}	0,82% ± 0,02%	0,15% ± 0,01%	0,21% ± 0,00%	0,25% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	99,58% ± 0,16%	66,12% ± 57,26%	99,97% ± 0,03%	99,02% ± 0,11%
	{YYYY}1	0,08% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	0,33% ± 0,24%	31,13% ± 53,73%	0,02% ± 0,04%	0,74% ± 0,38%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	1,54% ± 1,84%	0,00% ± 0,00%	0,23% ± 0,33%
	{1111}	0,02% ± 0,02%	1,22% ± 1,78%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> 4608-58 (Versuch 2)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,58% ± 0,07%	98,51% ± 0,29%	99,70% ± 0,02%	99,75% ± 0,05%
	{YYYYYYY}1	0,13% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{X11111}	0,28% ± 0,04%	1,40% ± 0,29%	0,27% ± 0,02%	0,20% ± 0,03%
Lys-488	{000000}	98,37% ± 0,09%	98,65% ± 0,36%	99,62% ± 0,10%	98,67% ± 0,13%
	{YYYYYYY}1	0,17% ± 0,19%	0,80% ± 0,59%	0,07% ± 0,07%	0,84% ± 0,11%
	{YYYYYYY}2	0,17% ± 0,16%	0,21% ± 0,19%	0,00% ± 0,00%	0,28% ± 0,21%
	{YYYYYYY}3	0,66% ± 0,12%	0,13% ± 0,23%	0,27% ± 0,07%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,45% ± 0,08%	0,13% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,01%
His-440	{000000}	98,10% ± 0,19%	93,18% ± 3,07%	99,90% ± 0,02%	
	{YYYYYYY}1	0,30% ± 0,14%	0,81% ± 1,00%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}2	0,01% ± 0,01%	1,51% ± 0,32%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}3	0,08% ± 0,04%	0,72% ± 0,63%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}4	0,07% ± 0,01%	0,76% ± 0,64%	0,00% ± 0,00%	
	{111111}	1,41% ± 0,03%	1,09% ± 1,16%	0,02% ± 0,03%	
Phe-336	{000000000}	99,60% ± 0,09%	97,15% ± 0,48%	99,85% ± 0,03%	98,94% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,05% ± 0,09%	0,01% ± 0,02%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,05% ± 0,08%	0,85% ± 0,40%	0,02% ± 0,03%	0,96% ± 0,13%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,26% ± 0,33%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,35% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,30% ± 0,31%	0,02% ± 0,04%	0,01% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,03% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,04%	0,08% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,02% ± 0,02%	0,16% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111111}	0,23% ± 0,01%	0,44% ± 0,21%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
Tyr-466	{000000000}	99,60% ± 0,09%	97,87% ± 0,85%	88,69% ± 2,55%	75,10% ± 8,96%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	1,01% ± 0,88%	0,00% ± 0,00%	2,45% ± 3,49%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,16% ± 0,29%	1,24% ± 2,15%	1,02% ± 1,77%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,12% ± 0,21%	4,31% ± 4,26%	6,16% ± 4,68%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,59% ± 0,89%	2,89% ± 5,01%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,56% ± 0,46%	1,35% ± 2,34%	8,27% ± 11,07%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	1,94% ± 1,86%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,20%	0,65% ± 1,13%	1,91% ± 2,34%
	{111111111}	0,40% ± 0,09%	0,03% ± 0,05%	3,11% ± 4,78%	0,26% ± 0,45%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,82%	1,27%	2,05%	2,18%
Gly-246	1,90%	0,48%	1,82%	1,50%
Ala-260	12,11%	3,67%	7,82%	8,83%
Val-288	3,31%	0,26%	0,08%	0,08%
Leu-274	0,06%	0,04%	0,04%	0,04%
Glu-432	4,31%	1,14%	4,85%	4,51%
Pro-286	1,42%	1,05%	1,21%	1,43%
Asp-418	6,63%	1,28%	1,61%	2,11%
Thr-404	0,20%	17,94%	0,01%	0,55%
Ile-200	0,31%	1,45%	0,27%	0,21%
Lys-488	0,97%	0,45%	0,18%	0,41%
His-440	1,35%	4,35%	0,09%	0,00%
Phe-336	0,29%	1,59%	0,07%	0,27%
Tyr-466	0,40%	0,73%	6,39%	11,47%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)
bakterielle AS

		$\Delta manXYZ, uhpT$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ser-390	{000}	96,63% ± 0,38%	90,57% ± 0,16%	91,38% ± 0,07%	90,30% ± 0,47%
	{YYY}1	0,50% ± 0,44%	4,32% ± 0,19%	3,25% ± 0,12%	4,78% ± 0,42%
	{YYY}2	1,33% ± 0,10%	1,85% ± 0,09%	2,40% ± 0,09%	1,91% ± 0,01%
	{111}	1,54% ± 0,08%	3,26% ± 0,13%	2,97% ± 0,03%	3,01% ± 0,04%
Gly-246	{00}	97,50% ± 0,15%	95,12% ± 0,08%	95,85% ± 0,14%	96,30% ± 0,03%
	{YY}1	0,90% ± 0,13%	1,57% ± 0,05%	1,29% ± 0,11%	0,79% ± 0,04%
	{11}	1,61% ± 0,04%	3,32% ± 0,07%	2,86% ± 0,03%	2,92% ± 0,01%
Ala-260	{000}	85,34% ± 0,14%	72,37% ± 0,21%	74,78% ± 0,03%	71,34% ± 0,10%
	{YYY}1	0,47% ± 0,12%	0,56% ± 0,11%	0,81% ± 0,03%	0,97% ± 0,12%
	{YYY}2	0,42% ± 0,02%	0,87% ± 0,05%	1,29% ± 0,02%	1,73% ± 0,00%
	{111}	13,77% ± 0,06%	26,19% ± 0,08%	23,12% ± 0,05%	25,97% ± 0,04%
Val-288	{00000}	95,23% ± 0,14%	90,20% ± 0,19%	92,84% ± 0,10%	90,42% ± 0,10%
	{YYYYY}1	0,41% ± 0,07%	0,33% ± 0,16%	0,68% ± 0,13%	0,44% ± 0,10%
	{YYYYY}2	0,80% ± 0,09%	2,17% ± 0,10%	1,70% ± 0,03%	2,47% ± 0,01%
	{YYYYY}3	0,87% ± 0,01%	2,25% ± 0,06%	1,76% ± 0,02%	2,46% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,08% ± 0,01%	0,30% ± 0,02%	0,30% ± 0,01%	0,41% ± 0,01%
	{11111}	2,60% ± 0,04%	4,77% ± 0,05%	2,72% ± 0,00%	3,80% ± 0,02%
Leu-274	{X00000}	99,80% ± 0,01%	99,85% ± 0,11%	99,65% ± 0,05%	99,78% ± 0,04%
	{XYYYYY}1	0,18% ± 0,01%	0,11% ± 0,11%	0,34% ± 0,04%	0,21% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	90,01% ± 0,29%	84,32% ± 0,48%	82,90% ± 0,09%	80,82% ± 0,40%
	{YYYYY}1	1,17% ± 0,35%	2,18% ± 0,37%	2,12% ± 0,09%	3,04% ± 0,43%
	{YYYYY}2	5,21% ± 0,19%	7,89% ± 0,18%	9,35% ± 0,17%	10,05% ± 0,12%
	{YYYYY}3	1,05% ± 0,04%	2,00% ± 0,10%	2,20% ± 0,01%	2,43% ± 0,06%
	{YYYYY}4	1,87% ± 0,03%	2,58% ± 0,02%	2,53% ± 0,06%	2,70% ± 0,03%
	{11111}	0,68% ± 0,01%	1,02% ± 0,01%	0,90% ± 0,00%	0,95% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	96,08% ± 0,07%	95,45% ± 0,44%	94,10% ± 0,05%	94,30% ± 0,19%
	{YYYYY}1	1,17% ± 0,12%	0,12% ± 0,13%	1,26% ± 0,18%	0,30% ± 0,24%
	{YYYYY}2	1,82% ± 0,06%	2,81% ± 0,12%	3,15% ± 0,10%	3,41% ± 0,18%
	{YYYYY}3	0,40% ± 0,05%	1,06% ± 0,07%	0,65% ± 0,03%	1,27% ± 0,03%
	{YYYYY}4	0,39% ± 0,07%	0,47% ± 0,25%	0,61% ± 0,01%	0,58% ± 0,02%
	{11111}	0,13% ± 0,01%	0,10% ± 0,05%	0,24% ± 0,02%	0,14% ± 0,07%
Asp-418	{0000}	88,80% ± 0,06%	81,09% ± 0,22%	83,22% ± 0,39%	77,74% ± 0,36%
	{YYYY}1	0,04% ± 0,08%	2,74% ± 0,20%	1,38% ± 0,18%	3,75% ± 0,33%
	{YYYY}2	3,48% ± 0,08%	5,52% ± 0,10%	7,01% ± 0,16%	7,49% ± 0,10%
	{YYYY}3	6,76% ± 0,12%	9,10% ± 0,04%	7,18% ± 0,06%	9,51% ± 0,04%
	{1111}	0,92% ± 0,03%	1,55% ± 0,06%	1,21% ± 0,02%	1,51% ± 0,03%
Thr-404	{0000}	99,06% ± 0,81%	99,07% ± 0,40%	99,58% ± 0,09%	98,94% ± 0,31%
	{YYYY}1	0,94% ± 0,81%	0,10% ± 0,18%	0,07% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,51% ± 0,53%	0,34% ± 0,22%	0,57% ± 0,06%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,32% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,46% ± 0,31%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,06%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)
bakterielle AS

		$\Delta manXYZ, uhpT$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ile-200	{X00000}	97,97% ± 0,08%	99,68% ± 0,14%	99,55% ± 0,03%	99,68% ± 0,17%
	{YYYYYYY}1	1,72% ± 0,10%	0,17% ± 0,17%	0,21% ± 0,03%	0,07% ± 0,05%
	{YYYYYYY}2	0,28% ± 0,09%	0,08% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,03%	0,23% ± 0,04%	0,23% ± 0,12%
Lys-488	{000000}	98,91% ± 0,02%	94,73% ± 0,95%	97,53% ± 0,06%	96,03% ± 0,45%
	{YYYYYYY}1	0,07% ± 0,11%	1,44% ± 0,24%	0,25% ± 0,07%	1,13% ± 0,19%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,57% ± 0,99%	0,56% ± 0,11%	0,78% ± 0,20%
	{YYYYYYY}3	0,65% ± 0,06%	0,78% ± 0,95%	1,02% ± 0,01%	0,90% ± 0,28%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,96% ± 0,89%	0,09% ± 0,01%	0,40% ± 0,05%
	{YYYYYYY}5	0,24% ± 0,02%	1,29% ± 0,62%	0,34% ± 0,03%	0,65% ± 0,08%
{111111}	0,13% ± 0,04%	0,22% ± 0,19%	0,20% ± 0,01%	0,12% ± 0,07%	
His-440	{000000}	97,48% ± 0,33%	93,82% ± 0,88%	94,13% ± 0,33%	92,54% ± 0,14%
	{YYYYYYY}1	0,18% ± 0,32%	0,27% ± 0,47%	0,40% ± 0,38%	0,28% ± 0,09%
	{YYYYYYY}2	0,14% ± 0,21%	0,33% ± 0,34%	0,70% ± 0,11%	0,78% ± 0,06%
	{YYYYYYY}3	0,04% ± 0,05%	1,08% ± 0,08%	0,39% ± 0,04%	0,82% ± 0,19%
	{YYYYYYY}4	0,12% ± 0,07%	0,13% ± 0,17%	0,40% ± 0,04%	0,48% ± 0,14%
	{YYYYYYY}5	1,92% ± 0,11%	4,12% ± 0,43%	3,81% ± 0,02%	4,92% ± 0,07%
{111111}	0,12% ± 0,04%	0,25% ± 0,29%	0,17% ± 0,01%	0,19% ± 0,14%	
Phe-336	{000000000}	98,80% ± 0,30%	98,69% ± 0,60%	99,46% ± 0,03%	98,41% ± 0,22%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,59% ± 0,43%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,70% ± 0,14%	0,00% ± 0,00%	0,93% ± 0,19%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,05% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%	0,04% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,33% ± 0,56%	0,20% ± 0,20%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,11% ± 0,08%	0,06% ± 0,03%	0,14% ± 0,01%	0,12% ± 0,09%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,06% ± 0,01%	0,17% ± 0,18%	0,10% ± 0,01%	0,18% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,10% ± 0,17%	0,03% ± 0,02%	0,21% ± 0,02%
{111111111}	0,07% ± 0,09%	0,06% ± 0,05%	0,23% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	
Tyr-466	{000000000}	99,86% ± 0,05%	98,63% ± 0,33%	99,79% ± 0,02%	99,00% ± 0,31%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,63% ± 0,28%	0,00% ± 0,00%	0,36% ± 0,44%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,16% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,13% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,14%	0,00% ± 0,00%	0,13% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,13%	0,00% ± 0,00%	0,14% ± 0,13%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%
{111111111}	0,14% ± 0,05%	0,37% ± 0,03%	0,21% ± 0,02%	0,03% ± 0,03%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,59%	5,93%	5,65%	5,87%
Gly-246	2,06%	4,10%	3,51%	3,31%
Ala-260	14,21%	26,96%	24,25%	27,44%
Val-288	3,59%	7,29%	4,83%	6,67%
Leu-274	0,06%	0,06%	0,08%	0,05%
Glu-432	5,13%	7,88%	8,41%	9,20%
Pro-286	1,65%	2,26%	2,63%	2,79%
Asp-418	7,74%	11,82%	10,45%	13,33%
Thr-404	0,23%	0,52%	0,20%	0,66%
Ile-200	0,48%	0,12%	0,28%	0,26%
Lys-488	0,67%	2,76%	1,29%	1,82%
His-440	1,89%	4,46%	4,11%	5,32%
Phe-336	0,45%	0,60%	0,44%	0,68%
Tyr-466	0,14%	0,66%	0,21%	0,41%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

		$\Delta manXYZ, uhpT$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ser-390	{000}	96,72% ± 0,27%	95,16% ± 0,34%	96,01% ± 0,50%	95,83% ± 0,07%
	{YYY}1	1,31% ± 0,26%	1,73% ± 0,31%	1,33% ± 0,57%	1,55% ± 0,14%
	{YYY}2	1,24% ± 0,04%	1,64% ± 0,03%	1,43% ± 0,10%	1,52% ± 0,09%
	{111}	0,73% ± 0,03%	1,48% ± 0,04%	1,24% ± 0,06%	1,10% ± 0,02%
Gly-246	{00}	98,07% ± 0,18%	96,67% ± 0,10%	96,92% ± 0,03%	97,20% ± 0,06%
	{YY}1	0,62% ± 0,11%	0,68% ± 0,08%	0,91% ± 0,05%	0,77% ± 0,06%
	{11}	1,31% ± 0,06%	2,65% ± 0,02%	2,17% ± 0,03%	2,03% ± 0,01%
Ala-260	{000}	91,70% ± 0,12%	88,84% ± 0,23%	89,84% ± 0,11%	90,01% ± 0,07%
	{YYY}1	0,41% ± 0,07%	0,31% ± 0,20%	0,33% ± 0,09%	0,36% ± 0,06%
	{YYY}2	0,26% ± 0,04%	0,30% ± 0,02%	0,43% ± 0,01%	0,41% ± 0,03%
	{111}	7,63% ± 0,03%	10,55% ± 0,05%	9,40% ± 0,04%	9,21% ± 0,08%
Val-288	{00000}	99,46% ± 0,09%	99,57% ± 0,12%	99,69% ± 0,12%	99,62% ± 0,15%
	{YYYYY}1	0,54% ± 0,08%	0,42% ± 0,11%	0,30% ± 0,13%	0,34% ± 0,17%
	{YYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,01%
Leu-274	{X00000}	99,74% ± 0,04%	99,74% ± 0,04%	99,86% ± 0,03%	99,83% ± 0,04%
	{XXXXXX}1	0,25% ± 0,03%	0,25% ± 0,04%	0,13% ± 0,02%	0,17% ± 0,04%
	{XXXXXX}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XXXXXX}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XXXXXX}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	91,54% ± 0,11%	87,90% ± 0,33%	88,78% ± 0,17%	87,97% ± 0,10%
	{YYYYY}1	1,65% ± 0,12%	1,76% ± 0,33%	1,42% ± 0,12%	1,63% ± 0,10%
	{YYYYY}2	4,44% ± 0,02%	6,48% ± 0,05%	6,09% ± 0,10%	6,37% ± 0,03%
	{YYYYY}3	0,99% ± 0,03%	1,58% ± 0,02%	1,57% ± 0,08%	1,73% ± 0,05%
	{YYYYY}4	1,03% ± 0,01%	1,66% ± 0,04%	1,59% ± 0,04%	1,70% ± 0,03%
	{11111}	0,35% ± 0,00%	0,63% ± 0,01%	0,55% ± 0,01%	0,61% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	96,69% ± 0,26%	96,63% ± 0,26%	96,71% ± 0,06%	96,93% ± 0,06%
	{YYYYY}1	0,95% ± 0,27%	0,87% ± 0,20%	1,12% ± 0,14%	0,96% ± 0,06%
	{YYYYY}2	1,76% ± 0,03%	1,77% ± 0,13%	1,55% ± 0,12%	1,51% ± 0,09%
	{YYYYY}3	0,31% ± 0,02%	0,37% ± 0,02%	0,35% ± 0,01%	0,32% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,20% ± 0,03%	0,25% ± 0,01%	0,16% ± 0,02%	0,17% ± 0,01%
	{11111}	0,09% ± 0,01%	0,11% ± 0,02%	0,12% ± 0,04%	0,09% ± 0,01%
Asp-418	{0000}	97,25% ± 0,05%	96,71% ± 0,03%	96,84% ± 0,04%	96,72% ± 0,05%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	1,66% ± 0,06%	1,99% ± 0,07%	1,86% ± 0,09%	1,88% ± 0,07%
	{YYYY}3	0,85% ± 0,02%	1,02% ± 0,04%	1,01% ± 0,06%	1,09% ± 0,02%
	{1111}	0,23% ± 0,01%	0,28% ± 0,01%	0,29% ± 0,01%	0,31% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	99,93% ± 0,05%	99,85% ± 0,14%	99,63% ± 0,40%	99,79% ± 0,12%
	{YYYY}1	0,02% ± 0,03%	0,12% ± 0,17%	0,35% ± 0,43%	0,09% ± 0,16%
	{YYYY}2	0,05% ± 0,07%	0,03% ± 0,05%	0,02% ± 0,03%	0,12% ± 0,14%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

		$\Delta manXYZ, uhpT$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ile-200	{X00000}	98,14% ± 0,09%	98,05% ± 0,10%	99,41% ± 0,12%	98,05% ± 0,06%
	{XYYYYY}1	1,68% ± 0,05%	1,76% ± 0,14%	0,06% ± 0,03%	1,89% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,17% ± 0,08%	0,17% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,04%
	{XYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,53% ± 0,14%	0,00% ± 0,00%
Lys-488	{000000}	99,74% ± 0,12%	99,70% ± 0,11%	99,43% ± 0,30%	99,24% ± 0,75%
	{YYYYYY}1	0,03% ± 0,06%	0,04% ± 0,07%	0,24% ± 0,21%	0,03% ± 0,06%
	{YYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}3	0,20% ± 0,04%	0,20% ± 0,08%	0,27% ± 0,09%	0,16% ± 0,12%
	{YYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,35%
	{YYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,33% ± 0,58%
{111111}	0,03% ± 0,03%	0,06% ± 0,04%	0,05% ± 0,04%	0,04% ± 0,03%	
His-440	{000000}	99,70% ± 0,09%	99,68% ± 0,32%	99,61% ± 0,09%	99,65% ± 0,27%
	{YYYYYY}1	0,27% ± 0,08%	0,27% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%	0,23% ± 0,29%
	{YYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,11%	0,03% ± 0,03%
	{YYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,11% ± 0,05%	0,04% ± 0,02%
{111111}	0,03% ± 0,01%	0,05% ± 0,02%	0,08% ± 0,09%	0,05% ± 0,01%	
Phe-336	{00000000}	99,81% ± 0,30%	99,94% ± 0,03%	99,89% ± 0,08%	99,81% ± 0,15%
	{YYYYYYYY}1	0,16% ± 0,28%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,08% ± 0,13%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}4	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,06% ± 0,06%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}6	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%
	{YYYYYYYY}7	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{11111111}	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%
Tyr-466	{00000000}	99,69% ± 0,12%	99,42% ± 0,35%	97,47% ± 1,68%	98,36% ± 1,35%
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,19%	0,19% ± 0,33%	0,06% ± 0,11%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,97% ± 1,46%	0,76% ± 1,31%
	{YYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,16% ± 0,28%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,37% ± 0,45%
	{YYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}8	0,06% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{11111111}	0,25% ± 0,08%	0,47% ± 0,49%	1,18% ± 1,46%	0,43% ± 0,45%

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	1,99%	3,14%	2,63%	2,63%
Gly-246	1,62%	2,99%	2,63%	2,42%
Ala-260	7,94%	10,85%	9,80%	9,61%
Val-288	0,11%	0,09%	0,07%	0,10%
Leu-274	0,06%	0,05%	0,03%	0,04%
Glu-432	3,88%	5,85%	5,49%	5,88%
Pro-286	1,33%	1,41%	1,29%	1,22%
Asp-418	1,70%	2,04%	1,98%	2,06%
Thr-404	0,03%	0,05%	0,10%	0,08%
Ile-200	0,41%	0,43%	0,54%	0,41%
Lys-488	0,14%	0,17%	0,23%	0,53%
His-440	0,08%	0,10%	0,27%	0,13%
Phe-336	0,04%	0,03%	0,06%	0,09%
Tyr-466	0,31%	0,49%	1,61%	0,90%

Anhang 17: Tabellen ¹³C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit nicht FCS behandelten *EIEC* 4608-58“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden. Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 ohne FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10% FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 6 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	96,79% ± 0,56%	97,79% ± 0,65%	96,13% ± 0,77%	96,95% ± 0,39%
	{YYY}1	1,52% ± 0,52%	1,18% ± 0,79%	1,62% ± 0,27%	1,33% ± 0,34%
	{YYY}2	0,27% ± 0,28%	0,10% ± 0,17%	0,68% ± 0,62%	0,22% ± 0,38%
	{111}	1,42% ± 0,13%	0,94% ± 0,08%	1,57% ± 0,18%	1,50% ± 0,21%
Gly-246	{00}	98,12% ± 0,25%	98,71% ± 0,22%	98,30% ± 0,08%	98,77% ± 0,35%
	{YY}1	0,33% ± 0,23%	0,38% ± 0,21%	0,26% ± 0,12%	0,09% ± 0,11%
	{11}	1,55% ± 0,17%	0,91% ± 0,02%	1,44% ± 0,04%	1,14% ± 0,27%
Ala-260	{000}	85,11% ± 2,58%	88,95% ± 0,33%	84,86% ± 3,60%	85,25% ± 0,51%
	{YYY}1	5,24% ± 2,79%	2,94% ± 0,20%	3,52% ± 3,70%	2,77% ± 0,54%
	{YYY}2	0,52% ± 0,23%	0,46% ± 0,17%	0,55% ± 0,12%	0,33% ± 0,09%
	{111}	9,13% ± 0,04%	7,65% ± 0,04%	11,07% ± 0,22%	11,66% ± 0,06%
Val-288	{00000}	91,97% ± 3,70%	98,01% ± 0,19%	98,25% ± 1,90%	98,51% ± 0,47%
	{YYYYY}1	7,45% ± 3,54%	1,80% ± 0,21%	1,59% ± 1,84%	1,23% ± 0,59%
	{YYYYY}2	0,29% ± 0,48%	0,18% ± 0,17%	0,03% ± 0,03%	0,22% ± 0,19%
	{YYYYY}3	0,17% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,10% ± 0,11%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,12% ± 0,08%	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,03% ± 0,05%
Leu-274	{X00000}	99,94% ± 0,09%	99,86% ± 0,03%	99,97% ± 0,04%	100,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}1	0,05% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,01% ± 0,02%	0,14% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	93,80% ± 0,40%	94,69% ± 0,15%	93,09% ± 0,90%	93,48% ± 0,22%
	{YYYYY}1	0,38% ± 0,33%	0,00% ± 0,00%	0,25% ± 0,27%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYY}2	4,75% ± 0,06%	4,66% ± 0,32%	5,45% ± 1,16%	5,40% ± 0,14%
	{YYYYY}3	0,49% ± 0,42%	0,14% ± 0,19%	0,36% ± 0,24%	0,41% ± 0,05%
	{YYYYY}4	0,50% ± 0,15%	0,39% ± 0,12%	0,57% ± 0,06%	0,50% ± 0,07%
	{11111}	0,08% ± 0,08%	0,13% ± 0,05%	0,27% ± 0,10%	0,20% ± 0,00%
Pro-286	{00000}	97,30% ± 1,46%	99,61% ± 0,34%	98,32% ± 1,05%	98,69% ± 1,06%
	{YYYYY}1	0,28% ± 0,48%	0,16% ± 0,25%	0,62% ± 0,87%	0,92% ± 0,84%
	{YYYYY}2	2,42% ± 1,94%	0,23% ± 0,40%	1,06% ± 0,18%	0,39% ± 0,68%
	{YYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	97,61% ± 0,32%	98,25% ± 0,37%	96,60% ± 0,32%	96,64% ± 0,88%
	{YYYY}1	0,01% ± 0,01%	0,27% ± 0,45%	0,45% ± 0,47%	0,18% ± 0,16%
	{YYYY}2	1,07% ± 0,35%	0,79% ± 0,35%	1,71% ± 0,15%	1,47% ± 0,10%
	{YYYY}3	1,23% ± 0,44%	0,55% ± 0,06%	1,10% ± 0,13%	1,59% ± 1,08%
	{1111}	0,07% ± 0,12%	0,14% ± 0,04%	0,15% ± 0,13%	0,12% ± 0,10%
Thr-404	{0000}	99,56% ± 0,50%	99,13% ± 1,52%	99,55% ± 0,40%	98,71% ± 0,82%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,47% ± 0,82%	0,19% ± 0,33%	0,72% ± 0,96%
	{YYYY}2	0,44% ± 0,50%	0,40% ± 0,70%	0,26% ± 0,45%	0,54% ± 0,93%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten <i>EIEC</i> 4608-58 (Versuch 1)					
		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ile-200	{X00000}	98,21% ± 0,75%	99,60% ± 0,11%	99,73% ± 0,09%	99,85% ± 0,08%
	{YYYYYYY}1	0,26% ± 0,22%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,02% ± 0,02%	0,05% ± 0,05%	0,09% ± 0,06%	0,07% ± 0,07%
	{YYYYYYY}3	0,30% ± 0,04%	0,05% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,02% ± 0,04%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	1,18% ± 0,56%	0,26% ± 0,05%	0,15% ± 0,12%	0,06% ± 0,02%
Lys-488	{000000}			93,37%	99,63%
	{YYYYYYY}1			0,00%	0,00%
	{YYYYYYY}2			0,00%	0,02%
	{YYYYYYY}3			2,15%	0,00%
	{YYYYYYY}4			3,42%	0,00%
	{YYYYYYY}5			1,06%	0,02%
His-440	{111111}			0,00%	0,32%
	{000000}				
	{YYYYYYY}1				
	{YYYYYYY}2				
	{YYYYYYY}3				
	{YYYYYYY}4				
Phe-336	{000000000}	98,55% ± 2,00%	99,73% ± 0,20%	99,89% ± 0,11%	99,92%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,27% ± 0,46%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,05%	0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,23% ± 0,34%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,53% ± 0,92%	0,11% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,02%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,12% ± 0,17%	0,08% ± 0,09%	0,01% ± 0,01%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{111111111}	0,23% ± 0,19%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00%
Tyr-466	{000000000}		97,83% ± 0,33%	99,90% ± 0,05%	99,72%
	{YYYYYYYYYYY}1		0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2		0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,24%
	{YYYYYYYYYYY}3		0,60% ± 0,85%	0,07% ± 0,09%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4		0,71% ± 0,62%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5		0,12% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6		0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7		0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8		0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,04%
{111111111}		0,72% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,11%	1,39%	2,56%	2,09%
Gly-246	1,71%	1,10%	1,57%	1,19%
Ala-260	11,23%	8,94%	12,61%	12,80%
Val-288	1,83%	0,45%	0,41%	0,37%
Leu-274	0,02%	0,14%	0,01%	0,00%
Glu-432	2,75%	2,38%	3,18%	3,00%
Pro-286	1,02%	0,12%	0,55%	0,34%
Asp-418	1,54%	1,01%	1,94%	2,09%
Thr-404	0,22%	0,32%	0,18%	0,47%
Ile-200	1,44%	0,33%	0,21%	0,10%
Lys-488	0,00%	0,00%	4,23%	0,35%
His-440	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Phe-336	0,79%	0,18%	0,03%	0,03%
Tyr-466	0,00%	1,32%	0,03%	0,09%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten *EIEC* 4608-58 (Versuch 2)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	96,56% ± 0,40%	98,24% ± 0,43%	94,79% ± 0,36%	95,48% ± 0,09%
	{YYY}1	0,42% ± 0,15%	0,34% ± 0,32%	1,73% ± 0,43%	2,37% ± 0,12%
	{YYY}2	1,85% ± 0,59%	0,59% ± 0,11%	2,40% ± 0,31%	1,09% ± 0,04%
	{111}	1,17% ± 0,18%	0,83% ± 0,03%	1,08% ± 0,24%	1,07% ± 0,02%
Gly-246	{00}	98,35% ± 0,41%	99,19% ± 0,04%	97,29% ± 0,06%	98,46% ± 0,02%
	{YY}1	0,59% ± 0,31%	0,03% ± 0,04%	0,96% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%
	{11}	1,06% ± 0,12%	0,78% ± 0,06%	1,76% ± 0,05%	1,54% ± 0,02%
Ala-260	{000}	90,16% ± 1,08%	94,76% ± 0,03%	86,08% ± 1,05%	89,28% ± 0,02%
	{YYY}1	1,95% ± 0,77%	0,00% ± 0,00%	2,96% ± 1,23%	0,00% ± 0,00%
	{YYY}2	0,57% ± 0,17%	0,26% ± 0,00%	0,69% ± 0,11%	0,48% ± 0,02%
	{111}	7,32% ± 1,08%	4,98% ± 0,03%	10,27% ± 0,42%	10,24% ± 0,01%
Val-288	{00000}	97,11% ± 0,53%	98,45% ± 2,63%	96,67% ± 1,13%	100,00% ± 0,00%
	{YYYYY}1	1,39% ± 0,72%	0,00% ± 0,00%	3,14% ± 1,14%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	0,19% ± 0,25%	1,53% ± 2,65%	0,13% ± 0,12%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,33% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,03% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,94% ± 0,08%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,98% ± 0,02%	99,96% ± 0,02%	99,95% ± 0,07%	100,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%	0,05% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	97,08% ± 1,93%	98,53% ± 0,23%	93,40% ± 0,22%	95,91% ± 0,02%
	{YYYYY}1	0,35% ± 0,29%	0,00% ± 0,00%	0,87% ± 0,50%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	1,36% ± 1,28%	0,78% ± 0,26%	3,92% ± 0,51%	2,44% ± 0,01%
	{YYYYY}3	0,53% ± 0,21%	0,30% ± 0,03%	0,90% ± 0,04%	0,78% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,37% ± 0,17%	0,26% ± 0,01%	0,56% ± 0,08%	0,64% ± 0,01%
	{11111}	0,31% ± 0,16%	0,12% ± 0,05%	0,35% ± 0,03%	0,24% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	98,89% ± 0,33%	98,40% ± 0,29%	98,22% ± 0,50%	97,74% ± 0,08%
	{YYYYY}1	0,17% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%	0,82% ± 0,49%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYY}2	0,93% ± 0,44%	1,25% ± 0,07%	0,96% ± 0,24%	1,96% ± 0,03%
	{YYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,23% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,26% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
Asp-418	{0000}	96,04% ± 1,12%	98,38% ± 0,12%	96,52% ± 0,31%	97,54% ± 0,04%
	{YYYY}1	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,28% ± 0,49%	0,02% ± 0,04%
	{YYYY}2	1,69% ± 0,35%	0,90% ± 0,10%	2,04% ± 0,10%	1,38% ± 0,08%
	{YYYY}3	2,08% ± 0,86%	0,61% ± 0,02%	0,84% ± 0,42%	0,86% ± 0,01%
	{1111}	0,18% ± 0,03%	0,11% ± 0,00%	0,31% ± 0,17%	0,20% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	97,90% ± 1,23%	97,86% ± 3,13%	99,54% ± 0,41%	99,72% ± 0,10%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	2,09% ± 3,14%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	1,42% ± 1,16%	0,00% ± 0,01%	0,09% ± 0,15%	0,28% ± 0,10%
	{YYYY}3	0,69% ± 0,24%	0,00% ± 0,00%	0,18% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,01%	0,19% ± 0,34%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten <i>EIEC</i> 4608-58 (Versuch 2)						
		bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,01% ± 0,08%	99,77% ± 0,08%	98,81% ± 0,28%	99,91% ± 0,01%	
	{YYYYYYY}1	0,33% ± 0,26%	0,00% ± 0,00%	0,25% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}2	0,44% ± 0,14%	0,08% ± 0,02%	0,50% ± 0,08%	0,06% ± 0,01%	
	{YYYYYYY}3	0,03% ± 0,01%	0,04% ± 0,00%	0,09% ± 0,05%	0,01% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}4	0,04% ± 0,04%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	
	{X11111}	0,14% ± 0,04%	0,08% ± 0,07%	0,33% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	
Lys-488	{000000}	80,36% ± 16,53%	99,63% ± 0,27%	51,67% ± 6,42%	99,79% ± 0,16%	
	{YYYYYYY}1	4,85% ± 8,13%	0,02% ± 0,04%	3,28% ± 4,31%	0,15% ± 0,20%	
	{YYYYYYY}2	5,49% ± 8,28%	0,13% ± 0,11%	7,75% ± 10,97%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	15,34% ± 21,70%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}4	0,67% ± 0,82%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	
	{YYYYYYY}5	5,14% ± 8,91%	0,01% ± 0,02%	18,32% ± 7,69%	0,04% ± 0,03%	
{111111}	3,49% ± 2,97%	0,21% ± 0,35%	3,64% ± 5,15%	0,01% ± 0,02%		
His-440	{000000}	94,85% ± 3,20%	99,71% ± 0,06%	95,49% ± 1,41%	99,99% ± 0,02%	
	{YYYYYYY}1	2,32% ± 2,22%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,25% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}3	1,01% ± 1,01%	0,03% ± 0,03%	1,22% ± 1,72%	0,01% ± 0,02%	
	{YYYYYYY}4	0,54% ± 0,47%	0,00% ± 0,00%	0,89% ± 1,26%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYY}5	0,28% ± 0,49%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	
{111111}	0,99% ± 1,36%	0,00% ± 0,00%	2,40% ± 1,87%	0,00% ± 0,00%		
Phe-336	{000000000}	99,57% ± 0,10%	99,79% ± 0,11%	99,71% ± 0,47%	99,85% ± 0,03%	
	{YYYYYYYYYYY}1	0,02% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,22% ± 0,39%	0,01% ± 0,01%	
	{YYYYYYYYYYY}3	0,14% ± 0,15%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	
	{YYYYYYYYYYY}4	0,05% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}5	0,07% ± 0,07%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,01%	
	{YYYYYYYYYYY}6	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,02%	
	{YYYYYYYYYYY}7	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,04% ± 0,01%	
	{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%	
{111111111}	0,12% ± 0,09%	0,10% ± 0,03%	0,02% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%		
Tyr-466	{000000000}		99,42% ± 0,38%		99,90% ± 0,04%	
	{YYYYYYYYYYY}1		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}2		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}3		0,03% ± 0,02%		0,02% ± 0,02%	
	{YYYYYYYYYYY}4		0,10% ± 0,16%		0,02% ± 0,02%	
	{YYYYYYYYYYY}5		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}6		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}7		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
	{YYYYYYYYYYY}8		0,00% ± 0,00%		0,00% ± 0,00%	
{111111111}		0,44% ± 0,30%		0,07% ± 0,03%		

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	2,54%	1,34%	3,26%	2,58%
Gly-246	1,35%	0,80%	2,23%	1,54%
Ala-260	8,35%	5,15%	11,72%	10,56%
Val-288	1,52%	0,63%	0,73%	0,00%
Leu-274	0,02%	0,03%	0,05%	0,00%
Glu-432	1,54%	0,83%	3,08%	2,19%
Pro-286	0,41%	0,73%	0,55%	0,96%
Asp-418	2,59%	1,02%	2,04%	1,54%
Thr-404	1,22%	0,57%	0,37%	0,14%
Ile-200	0,44%	0,16%	0,65%	0,04%
Lys-488	10,85%	0,26%	29,71%	0,07%
His-440	2,48%	0,10%	3,60%	0,01%
Phe-336	0,25%	0,17%	0,09%	0,10%
Tyr-466	0,00%	0,50%	0,00%	0,08%

Anhang 18: Tabellen ¹³C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten *EIEC* HN280“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 27-30). Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10 % FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10 % FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 6 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

bakterielle AS

		Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	90,47% ± 0,58%	90,24% ± 0,38%	97,93% ± 0,88%	97,44% ± 0,92%
	{YYY}1	3,84% ± 0,38%	3,84% ± 0,29%	1,37% ± 0,85%	1,65% ± 0,89%
	{YYY}2	1,85% ± 0,21%	1,72% ± 0,06%	0,46% ± 0,09%	0,64% ± 0,10%
	{111}	3,84% ± 0,02%	4,19% ± 0,06%	0,25% ± 0,06%	0,28% ± 0,05%
Gly-246	{00}	95,44% ± 0,09%	95,46% ± 0,19%	99,52% ± 0,02%	99,03% ± 0,07%
	{YY}1	0,66% ± 0,08%	0,48% ± 0,16%	0,07% ± 0,01%	0,18% ± 0,06%
	{11}	3,89% ± 0,01%	4,06% ± 0,05%	0,41% ± 0,01%	0,79% ± 0,02%
Ala-260	{000}	64,65% ± 0,21%	66,78% ± 0,13%	94,78% ± 0,13%	90,57% ± 0,11%
	{YYY}1	0,76% ± 0,01%	0,69% ± 0,07%	0,24% ± 0,06%	0,22% ± 0,07%
	{YYY}2	1,61% ± 0,02%	1,51% ± 0,02%	0,23% ± 0,03%	0,41% ± 0,06%
	{111}	32,97% ± 0,21%	31,02% ± 0,16%	4,75% ± 0,07%	8,80% ± 0,06%
Val-288	{00000}	78,02% ± 0,28%	79,26% ± 0,13%	98,18% ± 0,11%	99,73% ± 0,05%
	{YYYYY}1	0,31% ± 0,10%	0,38% ± 0,18%	0,43% ± 0,17%	0,25% ± 0,04%
	{YYYYY}2	3,61% ± 0,04%	3,53% ± 0,09%	0,32% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	3,71% ± 0,15%	3,59% ± 0,01%	0,39% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYY}4	1,02% ± 0,03%	0,97% ± 0,07%	0,02% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	13,33% ± 0,15%	12,27% ± 0,10%	0,67% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%
Leu-274	{X00000}	99,51% ± 0,08%	99,63% ± 0,18%	99,70% ± 0,09%	99,76% ± 0,20%
	{XYYYYY}1	0,31% ± 0,08%	0,23% ± 0,17%	0,28% ± 0,07%	0,21% ± 0,21%
	{XYYYYY}2	0,07% ± 0,00%	0,05% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%
	{XYYYYY}3	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{XYYYYY}4	0,03% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%
	{X11111}	0,07% ± 0,02%	0,04% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	85,40% ± 0,05%	86,69% ± 0,10%	97,01% ± 0,24%	88,87% ± 0,18%
	{YYYYY}1	1,33% ± 0,11%	0,98% ± 0,09%	0,68% ± 0,15%	1,56% ± 0,29%
	{YYYYY}2	7,10% ± 0,05%	6,92% ± 0,06%	1,65% ± 0,12%	6,64% ± 0,11%
	{YYYYY}3	1,54% ± 0,09%	1,48% ± 0,04%	0,32% ± 0,04%	1,35% ± 0,05%
	{YYYYY}4	3,52% ± 0,06%	2,96% ± 0,03%	0,25% ± 0,02%	1,20% ± 0,03%
	{11111}	1,10% ± 0,01%	0,98% ± 0,01%	0,09% ± 0,01%	0,38% ± 0,02%
Pro-286	{00000}	94,90% ± 0,60%	94,90% ± 0,37%	98,61% ± 0,51%	98,63% ± 0,38%
	{YYYYY}1	0,80% ± 0,16%	0,54% ± 0,07%	0,30% ± 0,26%	0,21% ± 0,36%
	{YYYYY}2	2,72% ± 0,50%	2,67% ± 0,31%	0,63% ± 0,35%	0,99% ± 0,35%
	{YYYYY}3	0,47% ± 0,11%	0,51% ± 0,10%	0,06% ± 0,05%	0,09% ± 0,16%
	{YYYYY}4	0,88% ± 0,01%	1,18% ± 0,08%	0,41% ± 0,40%	0,08% ± 0,07%
	{11111}	0,23% ± 0,20%	0,20% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	78,58% ± 0,26%	80,62% ± 0,45%	97,46% ± 0,05%	97,19% ± 0,11%
	{YYYY}1	1,14% ± 0,31%	1,22% ± 0,30%	0,06% ± 0,08%	0,04% ± 0,06%
	{YYYY}2	4,77% ± 0,08%	4,86% ± 0,08%	1,15% ± 0,04%	1,80% ± 0,08%
	{YYYY}3	14,46% ± 0,06%	12,22% ± 0,16%	1,27% ± 0,07%	0,87% ± 0,07%
	{1111}	1,06% ± 0,03%	1,08% ± 0,05%	0,06% ± 0,02%	0,11% ± 0,02%
Thr-404	{0000}	96,44% ± 0,38%	96,88% ± 0,36%	99,23% ± 0,29%	98,93% ± 0,20%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	1,40% ± 0,31%	1,75% ± 0,45%	0,77% ± 0,29%	1,07% ± 0,20%
	{YYYY}3	1,70% ± 0,29%	1,12% ± 0,20%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,45% ± 0,40%	0,26% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

bakterielle AS

	Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	96,90% ± 0,10%	98,29% ± 0,67%	98,33% ± 0,13%	98,79% ± 0,72%
	{YYYYYYY}1	0,24% ± 0,03%	0,15% ± 0,03%	0,13% ± 0,05%	0,11% ± 0,05%
	{YYYYYYY}2	0,16% ± 0,06%	0,07% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,17% ± 0,04%	0,12% ± 0,02%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,15% ± 0,00%	0,12% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	2,38% ± 0,09%	1,23% ± 0,66%	1,54% ± 0,11%	1,10% ± 0,75%
Lys-488	{000000}	89,69% ± 0,91%	89,97% ± 0,19%	99,49% ± 0,01%	99,67% ± 0,34%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,05% ± 0,09%	0,12% ± 0,20%
	{YYYYYYY}2	1,96% ± 0,79%	2,66% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	3,41% ± 0,18%	3,08% ± 0,30%	0,40% ± 0,03%	0,19% ± 0,12%
	{YYYYYYY}4	0,90% ± 0,20%	0,88% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	3,39% ± 0,10%	2,75% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,65% ± 0,53%	0,65% ± 0,07%	0,07% ± 0,06%	0,02% ± 0,04%
His-440	{000000}	97,27% ± 0,54%	96,67% ± 0,57%	98,99% ± 0,51%	99,42% ± 0,18%
	{YYYYYYY}1	0,03% ± 0,05%	0,32% ± 0,52%	0,60% ± 0,50%	0,49% ± 0,08%
	{YYYYYYY}2	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,08% ± 0,13%	0,07% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYY}4	0,13% ± 0,23%	0,09% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYY}5	2,21% ± 0,37%	2,49% ± 0,13%	0,37% ± 0,15%	0,01% ± 0,01%
	{111111}	0,25% ± 0,44%	0,37% ± 0,06%	0,02% ± 0,03%	0,05% ± 0,06%
Phe-336	{000000000}	97,81% ± 0,38%	98,08% ± 0,11%	99,77% ± 0,26%	99,25% ± 0,54%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,11%	0,00% ± 0,00%	0,25% ± 0,27%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,11% ± 0,13%	0,06% ± 0,10%	0,11% ± 0,18%	0,04% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,24% ± 0,19%	0,05% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,22% ± 0,24%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,08% ± 0,07%	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,21% ± 0,17%	0,25% ± 0,09%	0,01% ± 0,01%	0,06% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,17% ± 0,03%	0,11% ± 0,03%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,07% ± 0,06%	0,10% ± 0,05%	0,05% ± 0,06%	0,10% ± 0,17%
	{111111111}	1,33% ± 0,09%	1,25% ± 0,03%	0,05% ± 0,05%	0,03% ± 0,04%
Tyr-466	{000000000}	95,08% ± 0,24%	95,42% ± 0,12%	100,00% ± 0,00%	78,40% ± 10,61%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	4,78% ± 4,25%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	4,54% ± 7,64%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,10% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	4,70% ± 2,52%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,09% ± 0,15%	0,09% ± 0,12%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,32% ± 0,23%	0,26% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,69% ± 0,11%	0,45% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	2,70% ± 4,68%
	{111111111}	3,69% ± 0,20%	3,73% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%	4,88% ± 5,32%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	6,36%	6,62%	1,01%	1,25%
Gly-246	4,23%	4,30%	0,45%	0,88%
Ala-260	34,30%	32,26%	4,99%	9,15%
Val-288	17,88%	16,69%	1,13%	0,07%
Leu-274	0,19%	0,14%	0,07%	0,06%
Glu-432	7,95%	7,20%	1,28%	5,12%
Pro-286	2,46%	2,63%	0,67%	0,55%
Asp-418	14,57%	12,98%	1,61%	1,66%
Thr-404	2,43%	1,97%	0,39%	0,54%
Ile-200	2,71%	1,47%	1,56%	1,12%
Lys-488	6,43%	5,96%	0,27%	0,14%
His-440	2,23%	2,59%	0,43%	0,15%
Phe-336	1,83%	1,65%	0,13%	0,33%
Tyr-466	4,68%	4,40%	0,00%	13,51%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

	Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ser-390	{000}	97,56% ± 0,55%	97,64% ± 0,84%	97,65% ± 0,90%	97,77% ± 1,55%
	{YYY}1	1,64% ± 0,51%	1,43% ± 0,76%	1,46% ± 0,80%	1,46% ± 1,26%
	{YYY}2	0,58% ± 0,08%	0,63% ± 0,14%	0,59% ± 0,17%	0,45% ± 0,39%
	{111}	0,21% ± 0,03%	0,30% ± 0,06%	0,29% ± 0,06%	0,33% ± 0,10%
Gly-246	{00}	99,40% ± 0,10%	99,20% ± 0,09%	99,25% ± 0,01%	99,37% ± 0,12%
	{YY}1	0,10% ± 0,08%	0,13% ± 0,09%	0,13% ± 0,01%	0,19% ± 0,11%
	{11}	0,49% ± 0,03%	0,67% ± 0,00%	0,63% ± 0,02%	0,44% ± 0,01%
Ala-260	{000}	93,81% ± 0,04%	92,79% ± 0,08%	92,37% ± 0,09%	92,21% ± 0,17%
	{YYY}1	0,26% ± 0,03%	0,36% ± 0,02%	0,33% ± 0,10%	0,24% ± 0,07%
	{YYY}2	0,30% ± 0,01%	0,38% ± 0,03%	0,35% ± 0,03%	0,40% ± 0,04%
	{111}	5,63% ± 0,04%	6,47% ± 0,08%	6,95% ± 0,10%	7,15% ± 0,12%
Val-288	{00000}	99,71% ± 0,15%	99,65% ± 0,08%	99,58% ± 0,08%	97,40% ± 0,12%
	{YYYYY}1	0,24% ± 0,17%	0,26% ± 0,07%	0,41% ± 0,07%	0,37% ± 0,11%
	{YYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,64% ± 0,05%
	{YYYYY}3	0,01% ± 0,02%	0,03% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,75% ± 0,08%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%
	{11111}	0,03% ± 0,00%	0,07% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,81% ± 0,03%
Leu-274	{X00000}	99,60% ± 0,08%	99,53% ± 0,07%	99,53% ± 0,27%	99,61% ± 0,04%
	{XYYYYY}1	0,35% ± 0,05%	0,43% ± 0,07%	0,42% ± 0,24%	0,32% ± 0,04%
	{XYYYYY}2	0,03% ± 0,04%	0,03% ± 0,05%	0,04% ± 0,03%	0,03% ± 0,03%
	{XYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	92,23% ± 0,27%	89,79% ± 0,16%	89,83% ± 0,11%	96,80% ± 0,00%
	{YYYYY}1	1,12% ± 0,30%	1,71% ± 0,16%	1,55% ± 0,21%	0,71% ± 0,20%
	{YYYYY}2	4,69% ± 0,07%	5,88% ± 0,08%	6,08% ± 0,11%	1,71% ± 0,20%
	{YYYYY}3	0,96% ± 0,05%	1,26% ± 0,04%	1,28% ± 0,04%	0,34% ± 0,10%
	{YYYYY}4	0,78% ± 0,01%	1,05% ± 0,01%	0,99% ± 0,03%	0,34% ± 0,03%
	{11111}	0,21% ± 0,01%	0,30% ± 0,00%	0,28% ± 0,00%	0,11% ± 0,04%
Pro-286	{00000}	98,32% ± 0,26%	98,70% ± 0,52%	97,95% ± 0,51%	99,23% ± 0,59%
	{YYYYY}1	0,39% ± 0,07%	0,15% ± 0,18%	0,30% ± 0,32%	0,06% ± 0,10%
	{YYYYY}2	0,95% ± 0,28%	0,96% ± 0,35%	1,06% ± 0,43%	0,68% ± 0,55%
	{YYYYY}3	0,12% ± 0,04%	0,10% ± 0,08%	0,12% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,20% ± 0,01%	0,09% ± 0,10%	0,56% ± 0,21%	0,02% ± 0,02%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	97,83% ± 0,11%	97,08% ± 0,32%	97,21% ± 0,07%	96,25% ± 0,19%
	{YYYY}1	0,06% ± 0,11%	0,33% ± 0,42%	0,14% ± 0,13%	0,20% ± 0,18%
	{YYYY}2	1,42% ± 0,08%	1,72% ± 0,10%	1,77% ± 0,05%	1,61% ± 0,07%
	{YYYY}3	0,62% ± 0,07%	0,77% ± 0,09%	0,80% ± 0,06%	1,78% ± 0,22%
	{1111}	0,07% ± 0,01%	0,09% ± 0,03%	0,08% ± 0,02%	0,16% ± 0,05%
Thr-404	{0000}	99,06% ± 0,38%	98,95% ± 0,18%	99,04% ± 0,63%	99,13% ± 0,52%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	0,94% ± 0,38%	1,05% ± 0,18%	0,95% ± 0,64%	0,85% ± 0,55%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

	Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	99,37% ± 0,40%	99,40% ± 0,07%	99,41% ± 0,10%	97,54% ± 2,09%
	{YYYYYYY}1	0,13% ± 0,03%	0,11% ± 0,06%	0,14% ± 0,04%	0,13% ± 0,03%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,03%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,49% ± 0,43%	0,48% ± 0,10%	0,46% ± 0,06%	2,29% ± 2,09%
Lys-488	{000000}	99,81% ± 0,04%	99,73% ± 0,08%	99,76% ± 0,07%	99,40% ± 0,30%
	{YYYYYYY}1	0,03% ± 0,05%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,12% ± 0,20%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,16% ± 0,09%	0,23% ± 0,04%	0,23% ± 0,06%	0,38% ± 0,24%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
{111111}	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%	0,08% ± 0,05%	
His-440	{000000}	99,36% ± 0,24%	99,50% ± 0,45%	99,55% ± 0,28%	99,95%
	{YYYYYYY}1	0,53% ± 0,17%	0,22% ± 0,24%	0,40% ± 0,29%	0,00%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,05%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,16%	0,01% ± 0,02%	0,00%
	{YYYYYYY}4	0,03% ± 0,05%	0,17% ± 0,26%	0,00% ± 0,00%	0,00%
	{YYYYYYY}5	0,05% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,02%	0,00%
{111111}	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00%	
Phe-336	{000000000}	99,78% ± 0,13%	99,48% ± 0,33%	99,45% ± 0,51%	98,77% ± 0,57%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,36% ± 0,62%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,15% ± 0,13%	0,14% ± 0,13%	0,10% ± 0,09%	0,23% ± 0,17%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,02%	0,07% ± 0,12%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,02% ± 0,04%	0,26% ± 0,16%	0,03% ± 0,05%	0,38% ± 0,30%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,01%	0,08% ± 0,06%	0,03% ± 0,03%	0,10% ± 0,09%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,14% ± 0,15%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,28% ± 0,24%	
Tyr-466	{000000000}	97,29% ± 2,09%	97,29% ± 2,96%	97,33% ± 2,35%	93,96% ± 11,30%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,32% ± 0,55%	1,04% ± 1,14%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,10% ± 0,19%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	2,15% ± 3,98%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,95% ± 1,65%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,67% ± 1,35%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,39% ± 0,68%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,72% ± 1,26%	0,00% ± 0,00%	2,28% ± 2,22%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,09% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	2,03% ± 4,06%
{111111111}	0,63% ± 1,09%	1,67% ± 2,89%	0,00% ± 0,00%	1,08% ± 1,99%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	1,15%	1,20%	1,17%	1,11%
Gly-246	0,54%	0,74%	0,69%	0,53%
Ala-260	5,92%	6,85%	7,29%	7,49%
Val-288	0,09%	0,14%	0,09%	1,61%
Leu-274	0,09%	0,11%	0,11%	0,10%
Glu-432	3,51%	4,59%	4,58%	1,41%
Pro-286	0,70%	0,54%	1,01%	0,31%
Asp-418	1,25%	1,62%	1,60%	2,35%
Thr-404	0,47%	0,52%	0,48%	0,44%
Ile-200	0,52%	0,51%	0,49%	2,34%
Lys-488	0,09%	0,13%	0,13%	0,31%
His-440	0,18%	0,20%	0,11%	0,02%
Phe-336	0,08%	0,23%	0,12%	0,71%
Tyr-466	1,73%	1,79%	2,03%	4,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)
bakterielle AS

		Wildtyp	$\Delta manXYZ$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ser-390	{000}	90,03% ± 0,34%	91,05% ± 0,47%	91,26% ± 0,41%	95,52% ± 0,32%
	{YYY}1	3,87% ± 0,32%	3,57% ± 0,45%	3,41% ± 0,38%	2,12% ± 0,31%
	{YYY}2	1,74% ± 0,02%	1,58% ± 0,02%	1,53% ± 0,04%	0,84% ± 0,04%
	{111}	4,36% ± 0,02%	3,80% ± 0,04%	3,80% ± 0,02%	1,52% ± 0,02%
Gly-246	{00}	95,13% ± 0,05%	95,64% ± 0,15%	95,80% ± 0,06%	98,33% ± 0,11%
	{YY}1	0,52% ± 0,05%	0,52% ± 0,13%	0,55% ± 0,05%	0,20% ± 0,07%
	{11}	4,35% ± 0,01%	3,84% ± 0,02%	3,65% ± 0,01%	1,47% ± 0,04%
Ala-260	{000}	70,49% ± 0,06%	73,00% ± 0,05%	70,61% ± 0,19%	84,64% ± 0,12%
	{YYY}1	0,62% ± 0,05%	0,62% ± 0,10%	0,79% ± 0,07%	0,47% ± 0,11%
	{YYY}2	0,91% ± 0,03%	0,85% ± 0,01%	1,04% ± 0,03%	0,54% ± 0,02%
	{111}	27,98% ± 0,09%	25,53% ± 0,09%	27,56% ± 0,11%	14,36% ± 0,05%
Val-288	{00000}	85,57% ± 0,06%	87,50% ± 0,96%	87,59% ± 1,80%	95,36% ± 0,23%
	{YYYYY}1	0,06% ± 0,08%	0,10% ± 0,11%	0,16% ± 0,15%	0,09% ± 0,14%
	{YYYYY}2	2,55% ± 0,04%	2,26% ± 0,11%	3,15% ± 0,23%	1,17% ± 0,02%
	{YYYYY}3	2,40% ± 0,05%	2,15% ± 0,07%	3,01% ± 0,28%	1,05% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	9,40% ± 0,08%	7,99% ± 0,70%	6,05% ± 1,12%	2,32% ± 0,06%
Leu-274	{X00000}	99,77% ± 0,10%	99,76% ± 0,14%	99,80% ± 0,11%	99,70% ± 0,10%
	{XYYYYY}1	0,21% ± 0,10%	0,22% ± 0,14%	0,18% ± 0,11%	0,16% ± 0,08%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,13% ± 0,02%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{X11111}	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	85,26% ± 0,22%	86,68% ± 0,05%	87,25% ± 0,14%	94,01% ± 0,20%
	{YYYYY}1	0,95% ± 0,04%	0,95% ± 0,08%	1,11% ± 0,05%	0,53% ± 0,17%
	{YYYYY}2	7,18% ± 0,35%	6,60% ± 0,07%	7,01% ± 0,07%	3,55% ± 0,03%
	{YYYYY}3	1,68% ± 0,05%	1,46% ± 0,01%	1,56% ± 0,08%	0,74% ± 0,02%
	{YYYYY}4	3,62% ± 0,06%	3,19% ± 0,01%	2,28% ± 0,03%	0,87% ± 0,03%
	{11111}	1,30% ± 0,01%	1,12% ± 0,01%	0,79% ± 0,00%	0,30% ± 0,00%
Pro-286	{00000}	95,07% ± 0,70%	96,01% ± 0,16%	95,75% ± 0,38%	97,71% ± 0,03%
	{YYYYY}1	0,16% ± 0,14%	0,12% ± 0,03%	0,18% ± 0,11%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYY}2	3,62% ± 0,09%	3,15% ± 0,14%	3,41% ± 0,07%	2,01% ± 0,06%
	{YYYYY}3	0,60% ± 0,06%	0,53% ± 0,04%	0,48% ± 0,09%	0,21% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,23% ± 0,40%	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,31% ± 0,09%	0,18% ± 0,02%	0,08% ± 0,11%	0,03% ± 0,02%
Asp-418	{0000}	80,70% ± 0,26%	82,39% ± 0,02%	83,07% ± 0,12%	92,49% ± 0,21%
	{YYYY}1	0,97% ± 0,28%	0,86% ± 0,10%	1,30% ± 0,13%	0,52% ± 0,23%
	{YYYY}2	4,77% ± 0,03%	4,48% ± 0,05%	5,31% ± 0,01%	3,03% ± 0,19%
	{YYYY}3	11,88% ± 0,05%	10,80% ± 0,04%	9,18% ± 0,01%	3,51% ± 0,03%
	{1111}	1,67% ± 0,05%	1,46% ± 0,01%	1,14% ± 0,01%	0,44% ± 0,03%
Thr-404	{0000}	95,77% ± 3,66%	95,29% ± 4,15%	94,69% ± 2,35%	97,84% ± 2,88%
	{YYYY}1	2,54% ± 2,32%	2,94% ± 2,61%	3,15% ± 1,81%	1,64% ± 2,09%
	{YYYY}2	1,04% ± 0,85%	1,09% ± 0,94%	1,50% ± 0,33%	0,48% ± 0,82%
	{YYYY}3	0,46% ± 0,42%	0,49% ± 0,44%	0,44% ± 0,25%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,18% ± 0,11%	0,19% ± 0,16%	0,23% ± 0,03%	0,04% ± 0,06%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)
bakterielle AS

		Wildtyp	$\Delta manXYZ$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ile-200	{X00000}	99,63% ± 0,07%	99,76% ± 0,11%	99,85% ± 0,11%	99,82% ± 0,07%
	{YYYYYYY}1	0,15% ± 0,04%	0,13% ± 0,11%	0,07% ± 0,06%	0,08% ± 0,07%
	{YYYYYYY}2	0,14% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,03% ± 0,01%	0,05% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,03% ± 0,02%
	{YYYYYYY}4	0,04% ± 0,01%	0,03% ± 0,00%	0,03% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%
	{X11111}	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,04% ± 0,01%
Lys-488	{000000}	92,70% ± 0,36%	93,80% ± 0,40%	92,69% ± 0,22%	98,01% ± 0,26%
	{YYYYYYY}1	0,73% ± 0,29%	0,62% ± 0,21%	1,13% ± 0,23%	1,00% ± 0,06%
	{YYYYYYY}2	1,43% ± 0,05%	1,30% ± 0,12%	1,58% ± 0,13%	0,21% ± 0,22%
	{YYYYYYY}3	1,62% ± 0,05%	1,44% ± 0,07%	2,01% ± 0,06%	0,30% ± 0,03%
	{YYYYYYY}4	0,53% ± 0,04%	0,43% ± 0,05%	0,57% ± 0,02%	0,08% ± 0,11%
	{YYYYYYY}5	2,37% ± 0,02%	1,96% ± 0,08%	1,65% ± 0,10%	0,27% ± 0,14%
{111111}	0,62% ± 0,06%	0,44% ± 0,04%	0,36% ± 0,12%	0,13% ± 0,16%	
His-440	{000000}	96,83% ± 0,24%	97,11% ± 0,06%	96,42% ± 0,01%	96,74% ± 0,56%
	{YYYYYYY}1	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,31% ± 0,30%	0,04% ± 0,07%
	{YYYYYYY}2	0,15% ± 0,14%	0,24% ± 0,03%	0,25% ± 0,23%	0,20% ± 0,29%
	{YYYYYYY}3	0,14% ± 0,13%	0,16% ± 0,14%	0,14% ± 0,04%	0,07% ± 0,06%
	{YYYYYYY}4	0,12% ± 0,05%	0,03% ± 0,03%	0,33% ± 0,36%	0,15% ± 0,15%
	{YYYYYYY}5	2,34% ± 0,08%	2,15% ± 0,04%	2,39% ± 0,11%	2,73% ± 0,30%
{111111}	0,39% ± 0,07%	0,30% ± 0,10%	0,17% ± 0,16%	0,06% ± 0,07%	
Phe-336	{000000000}	99,67% ± 0,21%	99,72% ± 0,18%	99,67% ± 0,15%	99,95% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,04% ± 0,05%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,04% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,07% ± 0,03%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,24% ± 0,13%	0,21% ± 0,11%	0,15% ± 0,08%	0,01% ± 0,01%	
Tyr-466	{000000000}	97,85% ± 0,23%	96,74% ± 2,22%	97,89% ± 0,49%	99,37% ± 0,33%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,07% ± 0,12%	0,05% ± 0,08%	0,07% ± 0,10%	0,09% ± 0,16%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,05% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,12% ± 0,06%	0,11% ± 0,05%	0,07% ± 0,06%	0,07% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,04%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,10% ± 0,03%	0,09% ± 0,02%	0,16% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,12% ± 0,04%	0,13% ± 0,06%	0,14% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,24% ± 0,10%	0,45% ± 0,44%	0,27% ± 0,12%	0,17% ± 0,10%
{111111111}	1,45% ± 0,16%	2,38% ± 1,93%	1,29% ± 0,18%	0,27% ± 0,08%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	6,81%	6,05%	5,96%	2,79%
Gly-246	4,61%	4,10%	3,92%	1,57%
Ala-260	28,79%	26,30%	28,51%	14,87%
Val-288	11,89%	10,20%	9,18%	3,44%
Leu-274	0,06%	0,06%	0,05%	0,09%
Glu-432	8,27%	7,38%	6,58%	2,96%
Pro-286	2,34%	1,78%	1,86%	0,96%
Asp-418	13,21%	12,02%	11,01%	4,72%
Thr-404	1,69%	1,84%	2,09%	0,69%
Ile-200	0,15%	0,10%	0,07%	0,09%
Lys-488	4,35%	3,62%	3,84%	0,80%
His-440	2,54%	2,28%	2,58%	2,55%
Phe-336	0,30%	0,25%	0,27%	0,04%
Tyr-466	1,89%	3,01%	1,82%	0,47%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

		Wildtyp	$\Delta manXYZ$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, manXYZ$
Ser-390	{000}	96,45% ± 0,33%	96,92% ± 0,27%	96,90% ± 0,50%	96,53% ± 0,30%
	{YYY}1	2,01% ± 0,27%	1,66% ± 0,28%	1,66% ± 0,40%	1,94% ± 0,26%
	{YYY}2	0,68% ± 0,09%	0,56% ± 0,03%	0,62% ± 0,14%	0,69% ± 0,07%
	{111}	0,86% ± 0,02%	0,86% ± 0,04%	0,83% ± 0,04%	0,84% ± 0,03%
Gly-246	{00}	98,47% ± 0,16%	98,60% ± 0,10%	98,52% ± 0,12%	98,39% ± 0,13%
	{YY}1	0,16% ± 0,13%	0,10% ± 0,09%	0,24% ± 0,09%	0,23% ± 0,11%
	{11}	1,37% ± 0,03%	1,30% ± 0,02%	1,24% ± 0,04%	1,38% ± 0,02%
Ala-260	{000}	89,26% ± 0,08%	89,51% ± 0,02%	89,73% ± 0,05%	88,99% ± 0,13%
	{YYY}1	0,38% ± 0,07%	0,37% ± 0,02%	0,44% ± 0,03%	0,46% ± 0,14%
	{YYY}2	0,34% ± 0,03%	0,34% ± 0,02%	0,33% ± 0,00%	0,33% ± 0,03%
	{111}	10,02% ± 0,02%	9,78% ± 0,02%	9,50% ± 0,03%	10,23% ± 0,05%
Val-288	{00000}	99,81% ± 0,18%	99,72% ± 0,07%	99,40% ± 0,56%	99,75% ± 0,08%
	{YYYYY}1	0,07% ± 0,06%	0,11% ± 0,05%	0,29% ± 0,27%	0,10% ± 0,09%
	{YYYYY}2	0,12% ± 0,13%	0,17% ± 0,03%	0,12% ± 0,10%	0,15% ± 0,01%
	{YYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,17% ± 0,30%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,74% ± 0,05%	99,76% ± 0,02%	99,76% ± 0,15%	99,73% ± 0,12%
	{XYYYYY}1	0,26% ± 0,05%	0,24% ± 0,02%	0,24% ± 0,15%	0,27% ± 0,12%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	89,66% ± 0,09%	89,95% ± 0,12%	91,22% ± 0,12%	90,04% ± 0,40%
	{YYYYY}1	1,10% ± 0,03%	0,92% ± 0,13%	1,15% ± 0,12%	1,16% ± 0,14%
	{YYYYY}2	5,77% ± 0,05%	5,84% ± 0,10%	5,05% ± 0,04%	5,58% ± 0,39%
	{YYYYY}3	1,41% ± 0,01%	1,34% ± 0,03%	1,10% ± 0,01%	1,33% ± 0,04%
	{YYYYY}4	1,49% ± 0,02%	1,44% ± 0,00%	1,10% ± 0,03%	1,37% ± 0,01%
	{11111}	0,57% ± 0,01%	0,51% ± 0,00%	0,38% ± 0,01%	0,53% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	97,88% ± 0,20%	98,01% ± 0,05%	97,97% ± 0,05%	97,84% ± 0,31%
	{YYYYY}1	0,07% ± 0,07%	0,03% ± 0,05%	0,04% ± 0,05%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYY}2	1,82% ± 0,18%	1,78% ± 0,05%	1,77% ± 0,04%	1,86% ± 0,26%
	{YYYYY}3	0,20% ± 0,01%	0,18% ± 0,08%	0,21% ± 0,02%	0,25% ± 0,03%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
Asp-418	{0000}	96,70% ± 0,20%	96,92% ± 0,16%	97,02% ± 0,10%	96,70% ± 0,07%
	{YYYY}1	0,28% ± 0,24%	0,22% ± 0,15%	0,26% ± 0,13%	0,31% ± 0,11%
	{YYYY}2	1,91% ± 0,13%	1,78% ± 0,01%	1,71% ± 0,09%	1,86% ± 0,06%
	{YYYY}3	0,91% ± 0,01%	0,89% ± 0,01%	0,85% ± 0,04%	0,93% ± 0,01%
	{1111}	0,19% ± 0,01%	0,19% ± 0,01%	0,17% ± 0,01%	0,20% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	96,71% ± 3,15%	97,40% ± 2,59%	95,92% ± 3,44%	96,08% ± 2,73%
	{YYYY}1	2,48% ± 2,43%	1,80% ± 1,94%	3,07% ± 2,58%	2,96% ± 1,90%
	{YYYY}2	0,79% ± 0,71%	0,78% ± 0,68%	0,98% ± 0,85%	0,92% ± 0,81%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,04%	0,03% ± 0,05%	0,04% ± 0,03%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

	Wildtyp	$\Delta manXYZ$	$\Delta ptsG$	$\Delta ptsG, manXYZ$	
Ile-200	{X00000}	99,79% ± 0,10%	99,86% ± 0,09%	99,86% ± 0,23%	99,72% ± 0,11%
	{YYYYYYY}1	0,18% ± 0,08%	0,10% ± 0,09%	0,13% ± 0,22%	0,21% ± 0,13%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYY}3	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%
	{X11111}	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,00%
Lys-488	{000000}	99,73% ± 0,20%	99,67% ± 0,29%	99,64% ± 0,21%	99,47% ± 0,16%
	{YYYYYYY}1	0,27% ± 0,20%	0,33% ± 0,29%	0,33% ± 0,20%	0,53% ± 0,16%
	{YYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
His-440	{000000}	99,19% ± 0,13%	98,91% ± 0,22%	99,08% ± 0,14%	99,26% ± 0,23%
	{YYYYYYY}1	0,04% ± 0,08%	0,09% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	0,23% ± 0,10%	0,21% ± 0,05%	0,21% ± 0,06%	0,10% ± 0,12%
	{YYYYYYY}3	0,04% ± 0,04%	0,06% ± 0,05%	0,07% ± 0,08%	0,07% ± 0,04%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,03%
	{YYYYYYY}5	0,48% ± 0,04%	0,67% ± 0,12%	0,58% ± 0,08%	0,49% ± 0,09%
	{111111}	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,06%	0,05% ± 0,05%	0,04% ± 0,04%
Phe-336	{000000000}	99,98% ± 0,03%	100,00% ± 0,01%	99,93% ± 0,10%	99,98% ± 0,04%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
Tyr-466	{000000000}	98,81% ± 0,52%	99,15% ± 0,51%	98,11% ± 2,81%	99,53% ± 0,41%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,17% ± 0,29%	0,13% ± 0,23%	0,20% ± 0,34%	0,03% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,02% ± 0,02%	0,23% ± 0,07%	0,07% ± 0,06%	0,07% ± 0,06%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,13% ± 0,14%	0,02% ± 0,04%	0,34% ± 0,43%	0,14% ± 0,13%
	{111111111}	0,84% ± 0,20%	0,39% ± 0,24%	1,23% ± 1,99%	0,20% ± 0,18%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	1,98%	1,78%	1,79%	1,95%
Gly-246	1,45%	1,35%	1,36%	1,49%
Ala-260	10,37%	10,13%	9,86%	10,60%
Val-288	0,06%	0,09%	0,26%	0,08%
Leu-274	0,05%	0,05%	0,05%	0,06%
Glu-432	5,14%	4,99%	4,17%	4,89%
Pro-286	0,90%	0,83%	0,84%	0,92%
Asp-418	1,90%	1,80%	1,73%	1,91%
Thr-404	1,03%	0,86%	1,29%	1,24%
Ile-200	0,06%	0,05%	0,04%	0,09%
Lys-488	0,05%	0,05%	0,08%	0,09%
His-440	0,52%	0,72%	0,64%	0,54%
Phe-336	0,01%	0,00%	0,03%	0,01%
Tyr-466	1,00%	0,54%	1,60%	0,37%

Anhang 19: Tabellen ¹³C-Versuch „Infektion schnell proliferierender Caco-2-Zellen mit FCS behandelten *EIEC* HN280“

In der folgenden Tabelle sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 27 und 31). Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10 % FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 6 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280					
		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	81,44% ± 0,68%	94,32% ± 0,17%	97,91% ± 0,07%	98,07% ± 0,02%
	{YYY}1	4,06% ± 0,34%	1,19% ± 0,20%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYY}2	2,78% ± 0,32%	1,38% ± 0,14%	0,46% ± 0,08%	0,62% ± 0,01%
	{111}	11,72% ± 0,31%	3,11% ± 0,06%	1,64% ± 0,01%	1,31% ± 0,02%
Gly-246	{00}	89,58% ± 0,22%	97,65% ± 0,06%	98,28% ± 0,04%	98,46% ± 0,06%
	{YY}1	0,98% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11}	9,43% ± 0,11%	2,35% ± 0,06%	1,72% ± 0,04%	1,54% ± 0,06%
Ala-260	{000}	56,81% ± 0,05%	74,72% ± 0,19%	89,04% ± 0,04%	88,08% ± 0,10%
	{YYY}1	0,72% ± 0,04%	0,34% ± 0,01%	0,08% ± 0,02%	0,10% ± 0,05%
	{YYY}2	1,99% ± 0,03%	1,20% ± 0,01%	0,52% ± 0,02%	0,54% ± 0,01%
	{111}	40,48% ± 0,03%	23,74% ± 0,19%	10,36% ± 0,04%	11,28% ± 0,03%
Val-288	{00000}	69,24% ± 0,25%	87,52% ± 0,14%	99,81% ± 0,04%	99,99% ± 0,00%
	{YYYYY}1	0,16% ± 0,10%	0,04% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	4,57% ± 0,04%	3,33% ± 0,06%	0,07% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	4,51% ± 0,12%	3,01% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	1,54% ± 0,15%	0,59% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	19,99% ± 0,17%	5,50% ± 0,03%	0,12% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,71% ± 0,03%	99,93% ± 0,02%	99,98% ± 0,00%	99,91% ± 0,13%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,12%
	{XYYYYY}3	0,03% ± 0,03%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,05% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{X11111}	0,21% ± 0,03%	0,04% ± 0,02%	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	80,76% ± 0,28%	91,06% ± 0,24%	90,96% ± 0,21%	91,91% ± 0,19%
	{YYYYY}1	0,75% ± 0,22%	0,23% ± 0,14%	0,82% ± 0,17%	0,70% ± 0,08%
	{YYYYY}2	8,91% ± 0,11%	5,25% ± 0,18%	4,97% ± 0,05%	4,68% ± 0,12%
	{YYYYY}3	2,10% ± 0,08%	1,30% ± 0,05%	1,36% ± 0,02%	1,17% ± 0,00%
	{YYYYY}4	5,76% ± 0,02%	1,60% ± 0,01%	1,38% ± 0,01%	1,14% ± 0,02%
	{11111}	1,71% ± 0,04%	0,56% ± 0,01%	0,51% ± 0,01%	0,40% ± 0,01%
Pro-286	{00000}	93,12% ± 1,25%	94,54% ± 0,23%	96,66% ± 0,06%	95,88% ± 0,26%
	{YYYYY}1	0,20% ± 0,17%	0,29% ± 0,09%	0,04% ± 0,07%	0,16% ± 0,11%
	{YYYYY}2	3,80% ± 0,45%	2,78% ± 0,06%	1,68% ± 0,10%	1,97% ± 0,07%
	{YYYYY}3	0,82% ± 0,18%	0,59% ± 0,06%	0,42% ± 0,03%	0,42% ± 0,03%
	{YYYYY}4	1,50% ± 0,85%	1,63% ± 0,23%	1,13% ± 0,10%	1,54% ± 0,12%
	{11111}	0,57% ± 0,42%	0,17% ± 0,05%	0,06% ± 0,06%	0,02% ± 0,04%
Asp-418	{0000}	70,00% ± 0,28%	85,04% ± 0,23%	96,22% ± 0,10%	96,36% ± 0,07%
	{YYYY}1	0,97% ± 0,18%	1,15% ± 0,27%	0,21% ± 0,04%	0,25% ± 0,09%
	{YYYY}2	6,09% ± 0,07%	5,54% ± 0,16%	2,34% ± 0,12%	2,27% ± 0,07%
	{YYYY}3	20,63% ± 0,23%	7,45% ± 0,10%	1,03% ± 0,03%	0,94% ± 0,07%
	{1111}	2,31% ± 0,11%	0,81% ± 0,07%	0,20% ± 0,01%	0,18% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	92,54% ± 1,30%	97,64% ± 0,43%	98,34% ± 0,13%	98,64% ± 0,52%
	{YYYY}1	1,66% ± 1,30%	1,80% ± 0,21%	1,60% ± 0,12%	1,36% ± 0,52%
	{YYYY}2	0,18% ± 0,19%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}3	4,63% ± 0,30%	0,33% ± 0,18%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	1,00% ± 0,26%	0,23% ± 0,32%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	97,08% ± 0,07%	99,37% ± 0,02%	99,86% ± 0,03%	99,90% ± 0,01%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	1,43% ± 0,06%	0,38% ± 0,01%	0,03% ± 0,00%	0,04% ± 0,01%
	{XYYYYY}3	0,38% ± 0,01%	0,09% ± 0,02%	0,04% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,62% ± 0,06%	0,03% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,50% ± 0,05%	0,13% ± 0,02%	0,06% ± 0,04%	0,03% ± 0,01%
Lys-488	{000000}	85,58% ± 0,88%	94,06% ± 0,34%	99,44% ± 0,23%	99,72% ± 0,02%
	{YYYYYY}1	0,25% ± 0,31%	0,65% ± 0,49%	0,22% ± 0,29%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}2	3,50% ± 0,33%	1,69% ± 0,22%	0,21% ± 0,16%	0,28% ± 0,02%
	{YYYYYY}3	3,49% ± 0,52%	1,75% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}4	1,29% ± 0,28%	0,54% ± 0,18%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	5,03% ± 0,15%	1,14% ± 0,18%	0,05% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
{111111}	0,86% ± 0,31%	0,17% ± 0,11%	0,07% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	
His-440	{000000}	94,96% ± 1,53%	98,03% ± 0,11%	99,62% ± 0,08%	99,57% ± 0,07%
	{YYYYYY}1	0,09% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}2	0,49% ± 0,35%	0,63% ± 0,01%	0,23% ± 0,10%	0,28% ± 0,12%
	{YYYYYY}3	0,19% ± 0,22%	0,12% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}4	0,20% ± 0,35%	0,14% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	3,29% ± 1,14%	1,01% ± 0,10%	0,14% ± 0,07%	0,14% ± 0,05%
{111111}	0,77% ± 0,66%	0,07% ± 0,07%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	
Phe-336	{00000000}	94,84% ± 0,79%	97,54% ± 0,74%	98,76% ± 0,28%	98,44% ± 0,31%
	{YYYYYYYY}1	0,77% ± 1,33%	1,44% ± 0,51%	1,14% ± 0,28%	1,49% ± 0,33%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}3	0,09% ± 0,16%	0,21% ± 0,12%	0,05% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYYY}4	0,29% ± 0,33%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}5	0,18% ± 0,07%	0,24% ± 0,10%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}6	0,14% ± 0,14%	0,15% ± 0,03%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}7	0,51% ± 0,35%	0,10% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}8	0,32% ± 0,13%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111111}	2,87% ± 0,05%	0,27% ± 0,15%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%
Tyr-466	{00000000}	91,75% ± 0,68%	98,61% ± 0,12%	0,02% ± 0,01%	32,58% ± 56,43%
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,08%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}3	0,04% ± 0,07%	0,15% ± 0,10%	0,08% ± 0,04%	0,45% ± 0,41%
	{YYYYYYYY}4	0,13% ± 0,22%	0,22% ± 0,13%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}5	0,08% ± 0,14%	0,24% ± 0,06%	0,06% ± 0,02%	0,43% ± 0,52%
	{YYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,45% ± 0,40%	0,08% ± 0,03%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYYYYY}7	0,31% ± 0,54%	0,00% ± 0,00%	0,28% ± 0,09%	0,15% ± 0,13%
	{YYYYYYYY}8	0,82% ± 0,30%	0,11% ± 0,10%	8,99% ± 1,04%	2,85% ± 2,47%
	{11111111}	6,86% ± 0,19%	0,17% ± 0,27%	90,48% ± 0,90%	63,44% ± 54,80%

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	14,93%	4,43%	1,94%	1,72%
Gly-246	9,93%	2,35%	1,72%	1,54%
Ala-260	42,05%	24,65%	10,73%	11,67%
Val-288	25,79%	9,13%	0,15%	0,01%
Leu-274	0,27%	0,06%	0,02%	0,04%
Glu-432	11,30%	4,77%	4,58%	4,03%
Pro-286	3,82%	3,00%	1,90%	2,34%
Asp-418	21,07%	9,46%	2,20%	2,08%
Thr-404	4,97%	0,93%	0,45%	0,34%
Ile-200	1,79%	0,36%	0,10%	0,06%
Lys-488	8,87%	3,02%	0,23%	0,10%
His-440	3,92%	1,28%	0,21%	0,22%
Phe-336	3,98%	0,84%	0,18%	0,21%
Tyr-466	7,95%	0,86%	98,80%	66,51%

Anhang 20: Tabellen ¹³C-Versuche „Infektion von Caco-2-Zellen mit nicht FCS behandelten *EIEC* HN280“

In den folgenden Tabellen sind die ¹³C-Isotopologienverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden. Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 ohne FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10% FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10% FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 6 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 1)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	79,19% ± 0,37%	96,18% ± 0,72%	96,69% ± 2,89%	96,49% ± 0,38%
	{YYY}1	5,17% ± 0,44%	1,63% ± 0,34%	1,25% ± 1,09%	1,42% ± 0,09%
	{YYY}2	2,78% ± 0,19%	0,60% ± 0,52%	0,38% ± 0,40%	0,55% ± 0,48%
	{111}	12,85% ± 0,61%	1,58% ± 0,14%	1,68% ± 1,45%	1,54% ± 0,11%
Gly-246	{00}	88,04% ± 0,18%	98,13% ± 0,12%	97,86% ± 0,10%	98,68% ± 0,41%
	{YY}1	1,43% ± 0,25%	0,39% ± 0,15%	0,21% ± 0,12%	0,41% ± 0,38%
	{11}	10,53% ± 0,07%	1,48% ± 0,06%	1,92% ± 0,13%	0,91% ± 0,79%
Ala-260	{000}	62,57% ± 0,42%	85,14% ± 0,82%	84,75% ± 2,23%	84,74% ± 0,35%
	{YYY}1	2,13% ± 0,24%	1,91% ± 0,87%	2,51% ± 2,31%	2,60% ± 0,42%
	{YYY}2	2,51% ± 0,57%	0,81% ± 0,17%	0,56% ± 0,13%	0,53% ± 0,09%
	{111}	32,79% ± 0,35%	12,13% ± 0,22%	12,18% ± 0,22%	12,13% ± 0,10%
Val-288	{00000}	77,53% ± 0,62%	96,96% ± 0,11%	97,96% ± 0,99%	98,83% ± 0,09%
	{YYYYY}1	1,43% ± 0,55%	0,51% ± 0,23%	0,62% ± 0,54%	0,83% ± 0,16%
	{YYYYY}2	2,59% ± 0,08%	0,69% ± 0,24%	0,23% ± 0,28%	0,18% ± 0,19%
	{YYYYY}3	2,99% ± 0,14%	0,51% ± 0,09%	0,16% ± 0,13%	0,06% ± 0,05%
	{YYYYY}4	1,04% ± 0,12%	0,06% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	14,43% ± 0,14%	1,28% ± 0,01%	1,01% ± 0,18%	0,09% ± 0,03%
Leu-274	{X00000}	99,84% ± 0,06%	99,92% ± 0,04%	100,00% ± 0,00%	100,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,16% ± 0,06%	0,08% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	80,74% ± 0,32%	92,17% ± 0,39%	91,53% ± 0,23%	92,76% ± 0,07%
	{YYYYY}1	0,85% ± 1,21%	0,30% ± 0,43%	0,28% ± 0,22%	0,19% ± 0,16%
	{YYYYY}2	10,19% ± 0,36%	5,90% ± 0,19%	6,19% ± 0,15%	5,64% ± 0,20%
	{YYYYY}3	1,86% ± 0,16%	0,56% ± 0,10%	0,67% ± 0,05%	0,51% ± 0,06%
	{YYYYY}4	4,74% ± 0,26%	0,77% ± 0,02%	0,94% ± 0,07%	0,65% ± 0,07%
	{11111}	1,61% ± 0,11%	0,30% ± 0,03%	0,39% ± 0,02%	0,26% ± 0,03%
Pro-286	{00000}	93,42% ± 0,44%	97,42% ± 0,61%	98,02% ± 0,50%	97,76% ± 0,25%
	{YYYYY}1	2,43% ± 0,09%	0,81% ± 0,73%	0,49% ± 0,31%	0,80% ± 0,24%
	{YYYYY}2	3,58% ± 0,14%	1,77% ± 1,01%	1,49% ± 0,56%	1,44% ± 0,15%
	{YYYYY}3	0,58% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Asp-418	{0000}	73,39% ± 0,24%	94,60% ± 0,27%	94,98% ± 0,40%	96,48% ± 0,50%
	{YYYY}1	1,29% ± 0,38%	0,62% ± 0,17%	0,53% ± 0,42%	0,43% ± 0,46%
	{YYYY}2	5,52% ± 0,39%	2,02% ± 0,09%	1,82% ± 0,13%	1,72% ± 0,16%
	{YYYY}3	17,27% ± 0,19%	2,36% ± 0,10%	2,20% ± 0,19%	1,10% ± 0,14%
	{1111}	2,53% ± 0,03%	0,40% ± 0,11%	0,46% ± 0,04%	0,27% ± 0,03%
Thr-404	{0000}	96,15% ± 0,70%	99,81% ± 0,22%	98,37% ± 0,92%	97,43% ± 3,56%
	{YYYY}1	0,16% ± 0,23%	0,12% ± 0,20%	1,04% ± 1,37%	0,29% ± 0,50%
	{YYYY}2	0,09% ± 0,13%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	1,00% ± 1,73%
	{YYYY}3	2,62% ± 0,69%	0,05% ± 0,09%	0,07% ± 0,11%	0,06% ± 0,10%
	{1111}	0,97% ± 0,37%	0,00% ± 0,00%	0,51% ± 0,86%	1,22% ± 2,11%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280 (Versuch 1)					
		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ile-200	{X00000}	98,15% ± 0,20%	99,73% ± 0,08%	99,69% ± 0,09%	99,77% ± 0,05%
	{YYYYYYY}1	0,09% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,13% ± 0,13%	0,09% ± 0,06%
	{YYYYYYY}2	0,93% ± 0,04%	0,08% ± 0,04%	0,07% ± 0,07%	0,07% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,16% ± 0,06%	0,04% ± 0,01%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYY}4	0,28% ± 0,05%	0,02% ± 0,00%	0,03% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,39% ± 0,19%	0,12% ± 0,07%	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,01%
Lys-488	{000000}		99,20%	97,61% ± 1,73%	99,50% ± 0,28%
	{YYYYYYY}1		0,00%	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2		0,00%	1,08% ± 0,73%	0,07% ± 0,12%
	{YYYYYYY}3		0,57%	0,26% ± 0,19%	0,21% ± 0,36%
	{YYYYYYY}4		0,00%	0,26% ± 0,45%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5		0,02%	0,41% ± 0,20%	0,09% ± 0,09%
His-440	{111111}		0,21%	0,37% ± 0,50%	0,13% ± 0,13%
	{000000}				
	{YYYYYYY}1				
	{YYYYYYY}2				
	{YYYYYYY}3				
	{YYYYYYY}4				
Phe-336	{000000000}	97,04% ± 0,40%	99,75% ± 0,09%	99,59% ± 0,11%	99,87% ± 0,17%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,05% ± 0,08%	0,03% ± 0,04%	0,11% ± 0,15%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,01% ± 0,02%	0,06% ± 0,10%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,05% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,09% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,14% ± 0,19%	0,03% ± 0,03%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,22% ± 0,07%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,16% ± 0,19%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{111111111}	2,29% ± 0,10%	0,07% ± 0,04%	0,27% ± 0,23%	0,00% ± 0,00%
Tyr-466	{000000000}		97,92% ± 0,59%	99,60%	99,98% ± 0,02%
	{YYYYYYYYYYY}1		0,24% ± 0,42%	0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2		0,60% ± 0,67%	0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3		0,41% ± 0,61%	0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4		0,13% ± 0,11%	0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5		0,00% ± 0,00%	0,03%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}6		0,30% ± 0,29%	0,02%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}7		0,00% ± 0,00%	0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8		0,40% ± 0,15%	0,01%	0,00% ± 0,00%
{111111111}		0,00% ± 0,00%	0,34%	0,02% ± 0,02%	

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	16,43%	2,53%	2,35%	2,38%
Gly-246	11,25%	1,68%	2,03%	1,12%
Ala-260	35,17%	13,31%	13,39%	13,35%
Val-288	18,37%	2,01%	1,34%	0,37%
Leu-274	0,16%	0,08%	0,00%	0,00%
Glu-432	10,77%	3,67%	4,07%	3,38%
Pro-286	2,26%	0,87%	0,70%	0,73%
Asp-418	18,57%	3,34%	3,16%	2,07%
Thr-404	3,03%	0,08%	0,83%	1,83%
Ile-200	1,10%	0,20%	0,15%	0,11%
Lys-488	0,00%	0,51%	1,38%	0,34%
His-440	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Phe-336	2,78%	0,16%	0,32%	0,04%
Tyr-466	0,00%	0,91%	0,38%	0,02%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten *EIEC* HN280 (Versuch 2)

		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	79,18% ± 0,19%	96,81% ± 0,14%	95,85% ± 0,43%	95,35% ± 0,06%
	{YYY}1	4,94% ± 0,13%	1,27% ± 0,21%	1,55% ± 0,44%	2,22% ± 0,01%
	{YYY}2	3,26% ± 0,09%	0,79% ± 0,08%	0,87% ± 0,02%	1,12% ± 0,07%
	{111}	12,61% ± 0,01%	1,13% ± 0,01%	1,72% ± 0,01%	1,30% ± 0,02%
Gly-246	{00}	86,42% ± 0,05%	98,89% ± 0,06%	97,37% ± 0,05%	97,74% ± 0,02%
	{YY}1	1,19% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%
	{11}	12,39% ± 0,05%	1,09% ± 0,03%	2,63% ± 0,05%	2,25% ± 0,02%
Ala-260	{000}	56,43% ± 0,06%	89,28% ± 0,06%	84,85% ± 0,07%	83,18% ± 0,05%
	{YYY}1	0,64% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%	0,10% ± 0,03%	0,06% ± 0,01%
	{YYY}2	1,95% ± 0,03%	0,42% ± 0,02%	0,68% ± 0,01%	0,69% ± 0,02%
	{111}	40,97% ± 0,01%	10,29% ± 0,03%	14,36% ± 0,05%	16,07% ± 0,03%
Val-288	{00000}	71,87% ± 0,19%	98,78% ± 0,07%	99,81% ± 0,01%	99,99% ± 0,01%
	{YYYYY}1	0,17% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	3,88% ± 0,02%	0,32% ± 0,04%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	4,10% ± 0,01%	0,26% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}4	1,45% ± 0,01%	0,03% ± 0,02%	0,02% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	18,53% ± 0,10%	0,61% ± 0,03%	0,15% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
Leu-274	{X00000}	99,65% ± 0,01%	99,96% ± 0,00%	99,96% ± 0,01%	99,97% ± 0,00%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}3	0,05% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,04% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,00%
	{X11111}	0,25% ± 0,02%	0,03% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
Glu-432	{00000}	81,31% ± 0,21%	97,03% ± 0,26%	87,73% ± 0,16%	89,52% ± 0,10%
	{YYYYY}1	0,32% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,19% ± 0,12%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}2	8,62% ± 0,07%	1,76% ± 0,27%	7,26% ± 0,10%	6,52% ± 0,11%
	{YYYYY}3	2,16% ± 0,04%	0,52% ± 0,04%	1,93% ± 0,04%	1,65% ± 0,02%
	{YYYYY}4	5,73% ± 0,08%	0,51% ± 0,02%	2,07% ± 0,01%	1,63% ± 0,00%
	{11111}	1,86% ± 0,01%	0,18% ± 0,01%	0,81% ± 0,01%	0,68% ± 0,00%
Pro-286	{00000}	90,74% ± 0,96%	97,67% ± 0,06%	96,06% ± 0,18%	95,31% ± 0,15%
	{YYYYY}1	0,41% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%	0,08% ± 0,09%	0,05% ± 0,02%
	{YYYYY}2	4,92% ± 0,04%	1,98% ± 0,12%	3,08% ± 0,10%	3,36% ± 0,12%
	{YYYYY}3	1,22% ± 0,11%	0,26% ± 0,03%	0,63% ± 0,02%	0,57% ± 0,01%
	{YYYYY}4	1,98% ± 0,91%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,52% ± 0,04%
	{11111}	0,73% ± 0,02%	0,07% ± 0,02%	0,15% ± 0,03%	0,20% ± 0,01%
Asp-418	{0000}	74,49% ± 0,07%	96,77% ± 0,07%	95,94% ± 0,10%	96,67% ± 0,13%
	{YYYY}1	0,87% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,11%	0,08% ± 0,12%
	{YYYY}2	5,22% ± 0,03%	1,53% ± 0,08%	2,25% ± 0,01%	1,81% ± 0,00%
	{YYYY}3	17,37% ± 0,11%	1,48% ± 0,02%	1,40% ± 0,03%	1,17% ± 0,01%
	{1111}	2,06% ± 0,05%	0,23% ± 0,01%	0,33% ± 0,01%	0,26% ± 0,00%
Thr-404	{0000}	93,66% ± 0,10%	99,85% ± 0,02%	99,76% ± 0,08%	99,87% ± 0,04%
	{YYYY}1	0,64% ± 0,31%	0,03% ± 0,02%	0,17% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%
	{YYYY}2	0,47% ± 0,36%	0,01% ± 0,01%	0,05% ± 0,09%	0,13% ± 0,04%
	{YYYY}3	4,57% ± 0,10%	0,08% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,65% ± 0,24%	0,03% ± 0,03%	0,02% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit nicht FCS-behandelten <i>EIEC</i> HN280 (Versuch 2)					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	96,90% ± 0,06%	99,64% ± 0,10%	99,67% ± 0,02%	99,85% ± 0,02%
	{XYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XYYYYY}2	1,39% ± 0,02%	0,13% ± 0,02%	0,10% ± 0,01%	0,05% ± 0,02%
	{XYYYYY}3	0,37% ± 0,01%	0,15% ± 0,01%	0,08% ± 0,00%	0,03% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,61% ± 0,02%	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
	{X11111}	0,73% ± 0,05%	0,07% ± 0,08%	0,14% ± 0,01%	0,05% ± 0,01%
Lys-488	{000000}	83,12% ± 0,27%	96,98% ± 0,40%	99,85% ± 0,09%	99,82% ± 0,15%
	{YYYYYY}1	0,88% ± 0,22%	2,56% ± 0,55%	0,08% ± 0,13%	0,15% ± 0,15%
	{YYYYYY}2	3,14% ± 0,14%	0,36% ± 0,33%	0,05% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}3	3,72% ± 0,13%	0,05% ± 0,08%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}4	1,61% ± 0,09%	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%	0,03% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	6,06% ± 0,31%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
{111111}	1,48% ± 0,23%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	
His-440	{000000}	94,05% ± 0,18%	99,63% ± 0,17%	97,92% ± 0,20%	98,27% ± 0,17%
	{YYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,19% ± 0,09%	1,23% ± 0,11%	1,27% ± 0,24%
	{YYYYYY}3	0,14% ± 0,24%	0,05% ± 0,05%	0,29% ± 0,39%	0,39% ± 0,04%
	{YYYYYY}4	0,20% ± 0,31%	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,18%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}5	3,70% ± 0,11%	0,14% ± 0,13%	0,17% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%
{111111}	1,92% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,19% ± 0,21%	0,07% ± 0,05%	
Phe-336	{00000000}	95,05% ± 0,18%	99,70% ± 0,05%		
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%		
	{YYYYYYYY}3	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}4	0,03% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}5	0,43% ± 0,27%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}6	0,38% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}7	0,20% ± 0,16%	0,06% ± 0,06%		
	{YYYYYYYY}8	0,45% ± 0,22%	0,12% ± 0,10%		
{11111111}	3,43% ± 0,16%	0,11% ± 0,08%			
Tyr-466	{00000000}	92,33% ± 0,19%	99,82% ± 0,04%		
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}2	0,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}3	0,07% ± 0,07%	0,06% ± 0,06%		
	{YYYYYYYY}4	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,03%		
	{YYYYYYYY}5	0,20% ± 0,09%	0,01% ± 0,02%		
	{YYYYYYYY}6	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}7	0,06% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYY}8	0,74% ± 0,29%	0,00% ± 0,00%		
{11111111}	6,55% ± 0,06%	0,08% ± 0,03%			

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	16,44%	2,08%	2,82%	2,79%
Gly-246	12,98%	1,10%	2,63%	2,25%
Ala-260	42,49%	10,57%	14,85%	16,55%
Val-288	23,73%	0,92%	0,18%	0,01%
Leu-274	0,32%	0,03%	0,03%	0,03%
Glu-432	11,25%	1,60%	6,57%	5,58%
Pro-286	5,10%	1,02%	1,78%	2,30%
Asp-418	17,91%	2,10%	2,52%	2,07%
Thr-404	4,48%	0,10%	0,09%	0,07%
Ile-200	2,00%	0,22%	0,24%	0,10%
Lys-488	10,65%	0,61%	0,04%	0,04%
His-440	5,20%	0,20%	1,02%	0,69%
Phe-336	4,50%	0,27%	0,00%	0,00%
Tyr-466	7,40%	0,12%	0,00%	0,00%

Anhang 21: Tabellen ¹³C-Versuch „Infektion von Caco-2-Zellen mit FCS behandelten *S. Typhimurium* 14028s“

In der folgenden Tabelle sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 27-30). Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10 % FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10 % FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 8 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s

bakterielle AS

		Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	91,14% ± 0,65%	91,21% ± 0,59%	95,58% ± 0,59%	95,78% ± 0,59%
	{YYY}1	2,29% ± 0,47%	2,12% ± 0,34%	1,84% ± 0,34%	1,75% ± 0,45%
	{YYY}2	1,53% ± 0,15%	1,38% ± 0,20%	1,10% ± 0,20%	1,05% ± 0,19%
	{111}	5,04% ± 0,04%	5,29% ± 0,14%	1,48% ± 0,14%	1,43% ± 0,04%
Gly-246	{00}	93,64% ± 0,07%	93,55% ± 0,10%	98,01% ± 0,10%	97,95% ± 0,10%
	{YY}1	0,89% ± 0,07%	0,96% ± 0,09%	0,40% ± 0,09%	0,44% ± 0,07%
	{11}	5,47% ± 0,01%	5,50% ± 0,01%	1,59% ± 0,01%	1,61% ± 0,03%
Ala-260	{000}	77,62% ± 0,11%	77,58% ± 0,24%	87,22% ± 0,24%	87,32% ± 0,13%
	{YYY}1	0,55% ± 0,10%	0,48% ± 0,03%	0,70% ± 0,03%	0,71% ± 0,04%
	{YYY}2	1,07% ± 0,04%	1,02% ± 0,03%	0,88% ± 0,03%	0,94% ± 0,03%
	{111}	20,77% ± 0,04%	20,92% ± 0,19%	11,20% ± 0,19%	11,03% ± 0,10%
Val-288	{00000}	87,69% ± 0,02%	87,46% ± 0,25%	95,37% ± 0,25%	95,91% ± 0,10%
	{YYYYY}1	0,40% ± 0,18%	0,33% ± 0,13%	0,54% ± 0,13%	0,60% ± 0,10%
	{YYYYY}2	1,31% ± 0,12%	1,18% ± 0,05%	0,85% ± 0,05%	0,83% ± 0,08%
	{YYYYY}3	1,54% ± 0,01%	1,48% ± 0,04%	1,03% ± 0,04%	0,92% ± 0,08%
	{YYYYY}4	0,63% ± 0,03%	0,67% ± 0,04%	0,34% ± 0,04%	0,31% ± 0,02%
	{11111}	8,44% ± 0,06%	8,90% ± 0,13%	1,86% ± 0,13%	1,42% ± 0,05%
Leu-274	{X00000}	99,32% ± 0,05%	99,31% ± 0,05%	99,77% ± 0,05%	99,80% ± 0,04%
	{XYYYYY}1	0,18% ± 0,04%	0,18% ± 0,02%	0,18% ± 0,02%	0,13% ± 0,01%
	{XYYYYY}2	0,04% ± 0,07%	0,04% ± 0,04%	0,00% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%
	{XYYYYY}3	0,09% ± 0,01%	0,09% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
	{XYYYYY}4	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%
	{X11111}	0,31% ± 0,01%	0,32% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	88,24% ± 0,25%	87,97% ± 0,17%	92,32% ± 0,17%	92,56% ± 0,01%
	{YYYYY}1	1,07% ± 0,31%	0,91% ± 0,27%	1,41% ± 0,27%	1,12% ± 0,01%
	{YYYYY}2	4,64% ± 0,03%	4,83% ± 0,03%	3,48% ± 0,03%	3,45% ± 0,09%
	{YYYYY}3	1,25% ± 0,04%	1,21% ± 0,11%	1,12% ± 0,11%	1,15% ± 0,05%
	{YYYYY}4	2,94% ± 0,02%	3,03% ± 0,02%	1,12% ± 0,02%	1,16% ± 0,01%
	{11111}	1,86% ± 0,02%	2,04% ± 0,03%	0,54% ± 0,03%	0,56% ± 0,02%
Pro-286	{00000}	94,70% ± 0,07%	94,33% ± 0,97%	95,77% ± 0,97%	95,56% ± 1,12%
	{YYYYY}1	0,73% ± 0,06%	0,48% ± 0,46%	0,59% ± 0,46%	0,53% ± 0,46%
	{YYYYY}2	2,26% ± 0,09%	2,26% ± 0,18%	1,85% ± 0,18%	2,03% ± 0,33%
	{YYYYY}3	0,46% ± 0,02%	0,44% ± 0,05%	0,44% ± 0,05%	0,38% ± 0,14%
	{YYYYY}4	1,17% ± 0,18%	1,76% ± 0,49%	1,15% ± 0,49%	1,35% ± 0,44%
	{11111}	0,67% ± 0,04%	0,73% ± 0,06%	0,20% ± 0,06%	0,15% ± 0,09%
Asp-418	{0000}	89,14% ± 0,35%	88,53% ± 0,32%	93,34% ± 0,32%	93,53% ± 0,36%
	{YYYY}1	0,16% ± 0,28%	0,37% ± 0,32%	0,92% ± 0,32%	0,55% ± 0,31%
	{YYYY}2	2,92% ± 0,07%	2,70% ± 0,10%	2,57% ± 0,10%	2,76% ± 0,09%
	{YYYY}3	6,54% ± 0,11%	7,10% ± 0,05%	2,67% ± 0,05%	2,59% ± 0,18%
	{1111}	1,23% ± 0,06%	1,30% ± 0,03%	0,49% ± 0,03%	0,57% ± 0,02%
Thr-404	{0000}	95,72% ± 0,14%	95,74% ± 0,40%	98,60% ± 0,40%	98,57% ± 0,30%
	{YYYY}1	0,09% ± 0,16%	0,00% ± 0,00%	0,32% ± 0,00%	0,18% ± 0,31%
	{YYYY}2	1,42% ± 0,20%	1,47% ± 0,58%	0,94% ± 0,58%	0,96% ± 0,48%
	{YYYY}3	2,18% ± 0,28%	2,26% ± 0,32%	0,00% ± 0,32%	0,15% ± 0,26%
	{1111}	0,59% ± 0,07%	0,53% ± 0,07%	0,14% ± 0,07%	0,14% ± 0,07%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s
bakterielle AS

	Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	97,84% ± 0,14%	97,83% ± 0,12%	98,18% ± 0,12%	98,35% ± 0,29%
	{YYYYYYY}1	1,49% ± 0,21%	1,54% ± 0,20%	1,77% ± 0,20%	1,58% ± 0,30%
	{YYYYYYY}2	0,26% ± 0,13%	0,20% ± 0,17%	0,00% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,06% ± 0,02%	0,06% ± 0,05%	0,02% ± 0,05%	0,03% ± 0,03%
	{YYYYYYY}4	0,22% ± 0,02%	0,24% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%
	{X11111}	0,12% ± 0,02%	0,13% ± 0,02%	0,00% ± 0,02%	0,01% ± 0,00%
Lys-488	{000000}	90,93% ± 3,54%	93,71% ± 0,34%	98,01% ± 0,34%	97,92% ± 0,23%
	{YYYYYYY}1	1,19% ± 1,17%	0,12% ± 0,20%	0,00% ± 0,20%	0,15% ± 0,25%
	{YYYYYYY}2	1,46% ± 0,54%	0,98% ± 0,17%	0,38% ± 0,17%	0,21% ± 0,17%
	{YYYYYYY}3	1,89% ± 0,54%	1,71% ± 0,30%	0,95% ± 0,30%	1,04% ± 0,12%
	{YYYYYYY}4	0,74% ± 0,42%	0,46% ± 0,29%	0,10% ± 0,29%	0,15% ± 0,13%
	{YYYYYYY}5	2,49% ± 0,52%	2,16% ± 0,11%	0,35% ± 0,11%	0,32% ± 0,03%
{111111}	1,31% ± 0,58%	0,87% ± 0,07%	0,21% ± 0,07%	0,21% ± 0,04%	
His-440	{000000}	97,04% ± 0,44%	96,50% ± 0,30%	98,96% ± 0,30%	98,48% ± 0,22%
	{YYYYYYY}1	0,43% ± 0,48%	0,17% ± 0,03%	0,25% ± 0,03%	0,58% ± 0,52%
	{YYYYYYY}2	0,08% ± 0,13%	0,08% ± 0,09%	0,00% ± 0,09%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,07%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,12% ± 0,11%	0,19% ± 0,19%	0,02% ± 0,19%	0,10% ± 0,18%
	{YYYYYYY}5	1,25% ± 0,55%	1,76% ± 0,18%	0,50% ± 0,18%	0,76% ± 0,26%
{111111}	1,08% ± 0,14%	1,22% ± 0,20%	0,22% ± 0,20%	0,05% ± 0,07%	
Phe-336	{000000000}	97,79% ± 0,06%	97,37% ± 0,23%	99,08% ± 0,23%	98,93% ± 0,32%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,16%	0,20% ± 0,16%	0,07% ± 0,12%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,11% ± 0,10%	0,04% ± 0,07%	0,00% ± 0,07%	0,15% ± 0,11%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,09% ± 0,13%	0,03% ± 0,06%	0,04% ± 0,06%	0,02% ± 0,03%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,07% ± 0,13%	0,20% ± 0,21%	0,04% ± 0,21%	0,27% ± 0,17%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,04% ± 0,07%	0,05% ± 0,04%	0,07% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,15% ± 0,05%	0,21% ± 0,14%	0,13% ± 0,14%	0,12% ± 0,09%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,14% ± 0,04%	0,06% ± 0,05%	0,09% ± 0,05%	0,09% ± 0,07%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,25% ± 0,04%	0,35% ± 0,07%	0,09% ± 0,07%	0,16% ± 0,18%
{111111111}	1,36% ± 0,14%	1,60% ± 0,15%	0,27% ± 0,15%	0,18% ± 0,06%	
Tyr-466	{000000000}	99,73% ± 0,09%	98,58% ± 1,26%	99,82% ± 1,26%	99,88% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,20% ± 0,35%	0,00% ± 0,35%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,01% ± 0,01%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,10%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,12% ± 0,14%	0,20% ± 0,19%	0,12% ± 0,19%	0,11% ± 0,05%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,13% ± 0,06%	0,22% ± 0,21%	0,05% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,01% ± 0,03%	0,09% ± 0,15%	0,00% ± 0,15%	0,00% ± 0,00%
{111111111}	0,00% ± 0,00%	0,66% ± 1,14%	0,00% ± 1,14%	0,00% ± 0,00%	

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	6,83%	6,92%	2,82%	2,71%
Gly-246	5,91%	5,98%	1,79%	1,83%
Ala-260	21,66%	21,76%	12,02%	11,90%
Val-288	10,47%	10,85%	3,21%	2,68%
Leu-274	0,47%	0,48%	0,08%	0,07%
Glu-432	7,03%	7,31%	3,78%	3,78%
Pro-286	2,94%	3,40%	2,24%	2,38%
Asp-418	7,64%	8,07%	4,02%	4,03%
Thr-404	2,96%	2,96%	0,69%	0,78%
Ile-200	0,74%	0,74%	0,39%	0,37%
Lys-488	5,50%	4,17%	1,17%	1,19%
His-440	2,30%	2,91%	0,72%	0,86%
Phe-336	1,90%	2,24%	0,60%	0,65%
Tyr-466	0,20%	1,08%	0,12%	0,08%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s

AS aus den Wirtszellen infiziert mit

		Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	97,20% ± 0,78%	97,30% ± 0,78%	97,01% ± 0,57%	96,89% ± 0,89%
	{YYY}1	1,65% ± 0,67%	1,62% ± 0,68%	1,79% ± 0,58%	1,85% ± 0,74%
	{YYY}2	0,59% ± 0,20%	0,51% ± 0,15%	0,69% ± 0,04%	0,72% ± 0,22%
	{111}	0,56% ± 0,04%	0,57% ± 0,06%	0,51% ± 0,05%	0,54% ± 0,07%
Gly-246	{00}	98,94% ± 0,07%	98,80% ± 0,13%	98,82% ± 0,08%	98,75% ± 0,03%
	{YY}1	0,14% ± 0,05%	0,20% ± 0,10%	0,20% ± 0,07%	0,21% ± 0,02%
	{11}	0,92% ± 0,02%	1,00% ± 0,04%	0,99% ± 0,02%	1,05% ± 0,02%
Ala-260	{000}	89,45% ± 0,07%	89,18% ± 0,01%	89,54% ± 0,01%	88,86% ± 0,11%
	{YYY}1	0,45% ± 0,02%	0,35% ± 0,02%	0,49% ± 0,06%	0,44% ± 0,03%
	{YYY}2	0,55% ± 0,01%	0,57% ± 0,04%	0,52% ± 0,02%	0,58% ± 0,03%
	{111}	9,55% ± 0,07%	9,90% ± 0,02%	9,45% ± 0,06%	10,13% ± 0,07%
Val-288	{00000}	99,58% ± 0,06%	99,66% ± 0,09%	99,59% ± 0,21%	99,62% ± 0,07%
	{YYYYY}1	0,37% ± 0,07%	0,27% ± 0,06%	0,39% ± 0,21%	0,37% ± 0,07%
	{YYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYY}3	0,02% ± 0,02%	0,02% ± 0,03%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{11111}	0,03% ± 0,00%	0,05% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Leu-274	{X00000}	99,79% ± 0,06%	99,86% ± 0,04%	99,79% ± 0,07%	99,81% ± 0,05%
	{XXXXXX}1	0,20% ± 0,06%	0,13% ± 0,04%	0,21% ± 0,07%	0,18% ± 0,05%
	{XXXXXX}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XXXXXX}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{XXXXXX}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Glu-432	{00000}	88,45% ± 0,42%	87,77% ± 0,16%	88,05% ± 0,29%	87,35% ± 0,22%
	{YYYYY}1	1,49% ± 0,29%	1,62% ± 0,16%	1,69% ± 0,37%	1,85% ± 0,09%
	{YYYYY}2	6,42% ± 0,20%	6,78% ± 0,11%	6,64% ± 0,06%	6,97% ± 0,18%
	{YYYYY}3	1,68% ± 0,07%	1,82% ± 0,07%	1,73% ± 0,04%	1,82% ± 0,04%
	{YYYYY}4	1,45% ± 0,03%	1,52% ± 0,04%	1,39% ± 0,02%	1,49% ± 0,02%
	{11111}	0,51% ± 0,02%	0,50% ± 0,02%	0,50% ± 0,01%	0,52% ± 0,00%
Pro-286	{00000}	96,24% ± 0,47%	96,03% ± 0,94%	96,41% ± 0,61%	95,67% ± 0,53%
	{YYYYY}1	0,52% ± 0,05%	0,64% ± 0,27%	0,55% ± 0,06%	0,56% ± 0,14%
	{YYYYY}2	2,08% ± 0,23%	1,98% ± 0,25%	1,89% ± 0,28%	2,10% ± 0,17%
	{YYYYY}3	0,35% ± 0,02%	0,17% ± 0,08%	0,24% ± 0,04%	0,35% ± 0,02%
	{YYYYY}4	0,75% ± 0,29%	1,14% ± 0,46%	0,92% ± 0,24%	1,25% ± 0,47%
	{11111}	0,06% ± 0,03%	0,05% ± 0,09%	0,00% ± 0,00%	0,08% ± 0,02%
Asp-418	{0000}	96,28% ± 0,07%	96,11% ± 0,23%	96,48% ± 0,10%	95,93% ± 0,19%
	{YYYY}1	0,30% ± 0,15%	0,21% ± 0,20%	0,15% ± 0,13%	0,46% ± 0,22%
	{YYYY}2	2,15% ± 0,06%	2,33% ± 0,04%	2,08% ± 0,05%	2,28% ± 0,04%
	{YYYY}3	1,11% ± 0,08%	1,17% ± 0,04%	1,13% ± 0,06%	1,16% ± 0,05%
	{1111}	0,17% ± 0,01%	0,17% ± 0,03%	0,16% ± 0,01%	0,18% ± 0,01%
Thr-404	{0000}	99,39% ± 0,04%	99,41% ± 0,13%	99,29% ± 0,08%	99,21% ± 0,05%
	{YYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,16%
	{YYYY}2	0,61% ± 0,04%	0,59% ± 0,13%	0,71% ± 0,08%	0,70% ± 0,11%
	{YYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{1111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten *S. Typhimurium* 14028s
AS aus den Wirtszellen infiziert mit

	Wildtyp	$\Delta uhpT$	$\Delta ptsG, manXYZ$	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	98,12% ± 0,13%	98,33% ± 0,13%	98,14% ± 0,07%	98,09% ± 0,08%
	{XYYYYY}1	1,83% ± 0,18%	1,64% ± 0,12%	1,75% ± 0,12%	1,88% ± 0,06%
	{XYYYYY}2	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,07%	0,02% ± 0,03%
	{XYYYYY}3	0,01% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%
	{XYYYYY}4	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%
	{X11111}	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Lys-488	{000000}	99,67% ± 0,10%	99,70% ± 0,12%	99,69% ± 0,07%	99,71% ± 0,09%
	{YYYYYY}1	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,14% ± 0,21%	0,04% ± 0,07%
	{YYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}3	0,26% ± 0,03%	0,24% ± 0,05%	0,13% ± 0,14%	0,25% ± 0,03%
	{YYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,01% ± 0,02%	0,07% ± 0,08%	0,04% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%
His-440	{000000}	99,47% ± 0,26%	99,72% ± 0,13%	99,29% ± 0,16%	99,23% ± 0,42%
	{YYYYYY}1	0,47% ± 0,27%	0,00% ± 0,00%	0,54% ± 0,18%	0,76% ± 0,43%
	{YYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,06%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{111111}	0,05% ± 0,02%	0,18% ± 0,10%	0,17% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%
Phe-336	{00000000}	99,88% ± 0,04%	99,74% ± 0,07%	99,80% ± 0,15%	99,76% ± 0,06%
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,12%
	{YYYYYYYY}2	0,05% ± 0,04%	0,07% ± 0,09%	0,09% ± 0,13%	0,14% ± 0,15%
	{YYYYYYYY}3	0,00% ± 0,01%	0,02% ± 0,02%	0,03% ± 0,05%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}4	0,01% ± 0,01%	0,07% ± 0,06%	0,02% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}6	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,04%	0,03% ± 0,03%	0,00% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}7	0,01% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%	0,01% ± 0,01%
	{YYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%
	{11111111}	0,02% ± 0,03%	0,03% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
Tyr-466	{00000000}	99,07% ± 0,97%	90,95% ± 5,93%	88,17% ± 10,99%	63,50% ± 55,13%
	{YYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,02%	5,58% ± 2,97%	0,13% ± 0,22%
	{YYYYYYYY}2	0,00% ± 0,00%	3,67% ± 6,35%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	2,83% ± 4,00%	1,08% ± 1,53%
	{YYYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	1,52% ± 2,15%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYY}5	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	1,33% ± 1,88%	0,07% ± 0,12%
	{YYYYYYYY}6	0,03% ± 0,05%	3,18% ± 3,65%	0,28% ± 0,40%	2,11% ± 3,29%
	{YYYYYYYY}7	0,90% ± 0,97%	2,19% ± 3,79%	0,29% ± 0,41%	0,09% ± 0,15%
	{YYYYYYYY}8	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	4,27% ± 7,39%
	{11111111}	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	28,73% ± 49,77%

Berechnung des mittleren ¹³C-Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	1,50%	1,45%	1,57%	1,64%
Gly-246	0,99%	1,10%	1,08%	1,15%
Ala-260	10,07%	10,40%	9,96%	10,66%
Val-288	0,12%	0,12%	0,09%	0,08%
Leu-274	0,05%	0,04%	0,04%	0,04%
Glu-432	5,55%	5,84%	5,64%	5,96%
Pro-286	1,80%	1,98%	1,74%	2,24%
Asp-418	2,14%	2,27%	2,09%	2,30%
Thr-404	0,31%	0,30%	0,36%	0,37%
Ile-200	0,39%	0,35%	0,40%	0,39%
Lys-488	0,15%	0,18%	0,13%	0,13%
His-440	0,13%	0,22%	0,23%	0,14%
Phe-336	0,06%	0,10%	0,08%	0,07%
Tyr-466	0,72%	4,64%	3,39%	34,42%

Anhang 22: Tabellen ¹³C-Versuch „Infektion schnell proliferierender Caco-2-Zellen mit FCS behandelten *S. Typhimurium* 14028s“

In der folgenden Tabelle sind die ¹³C-Isotopologenverteilung (in mol%) und der mittlere ¹³C-Überschuß pro C-Atom (%) von Aminosäuren (AS) aufgelistet, die nach der Infektion von Caco-2-Zellen *de novo* synthetisiert wurden (s. auch Abb. 27 und 32). Zu Beginn des Versuches wurden die Bakterien in RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert, die Zellen 1 h damit infiziert und im Anschluß das Medium durch 20 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS und 100 µg Gentamicin/ml ersetzt. 30 min später wurde das Medium gegen 20 ml RPMI mit 10 % FCS, 100 µg Gentamicin/ml und 10 mM [U-¹³C₆]-Glukose ersetzt. Nach 30 min wurde die Gentamicinkonzentration auf 20 µg/ml gesenkt. 8 h nach Beginn der ¹³C-Markierung wurden die intrazellulären Bakterien und Zellen geerntet (s. Methoden 3.4.10). Die Form der Darstellung ist auf S. 184 erläutert.

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s					
		bakterielle AS		AS aus den Wirtszellen infiziert mit	
		Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$
Ser-390	{000}	72,87% ± 1,57%	96,06% ± 0,95%	94,49% ± 1,24%	94,22% ± 1,85%
	{YYY}1	8,35% ± 4,29%	0,84% ± 1,09%	2,50% ± 0,66%	3,09% ± 1,64%
	{YYY}2	0,51% ± 0,88%	0,23% ± 0,20%	1,26% ± 0,52%	0,64% ± 0,45%
	{111}	18,27% ± 4,06%	2,86% ± 0,70%	1,75% ± 0,39%	2,05% ± 0,34%
Gly-246	{00}	84,00% ± 0,22%	98,93% ± 0,54%	97,38% ± 0,11%	97,38% ± 0,26%
	{YY}1	1,87% ± 0,39%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,11%	0,42% ± 0,12%
	{11}	14,14% ± 0,35%	1,07% ± 0,54%	2,55% ± 0,00%	2,20% ± 0,38%
Ala-260	{000}	55,04% ± 0,23%	86,75% ± 0,73%	83,52% ± 0,46%	84,74% ± 0,07%
	{YYY}1	0,32% ± 0,34%	0,33% ± 0,27%	0,32% ± 0,13%	0,26% ± 0,14%
	{YYY}2	2,08% ± 0,17%	0,80% ± 0,17%	0,84% ± 0,30%	0,74% ± 0,15%
	{111}	42,57% ± 0,65%	12,12% ± 0,36%	15,31% ± 0,31%	14,26% ± 0,16%
Val-288	{00000}	67,45% ± 1,05%	96,66% ± 1,77%	98,85% ± 0,65%	99,05% ± 0,94%
	{YYYYY}1	0,95% ± 0,24%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,21% ± 0,34%
	{YYYYY}2	3,01% ± 1,03%	0,51% ± 0,72%	0,40% ± 0,33%	0,18% ± 0,31%
	{YYYYY}3	2,64% ± 0,95%	1,27% ± 1,21%	0,13% ± 0,22%	0,15% ± 0,18%
	{YYYYY}4	2,25% ± 0,87%	0,38% ± 0,65%	0,25% ± 0,19%	0,29% ± 0,50%
	{11111}	23,70% ± 0,28%	1,18% ± 0,55%	0,38% ± 0,11%	0,12% ± 0,18%
Leu-274	{X00000}	98,36% ± 0,31%	99,68% ± 0,21%	99,80% ± 0,04%	99,85% ± 0,10%
	{YYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYY}2	0,24% ± 0,15%	0,11% ± 0,20%	0,09% ± 0,04%	0,05% ± 0,06%
	{YYYYYY}3	0,13% ± 0,12%	0,05% ± 0,06%	0,03% ± 0,06%	0,04% ± 0,04%
	{YYYYYY}4	0,21% ± 0,13%	0,10% ± 0,18%	0,03% ± 0,04%	0,00% ± 0,00%
	{X11111}	1,06% ± 0,15%	0,05% ± 0,09%	0,04% ± 0,03%	0,05% ± 0,08%
Glu-432	{00000}	76,23% ± 0,40%	92,90% ± 0,53%	89,84% ± 0,09%	89,30% ± 0,23%
	{YYYYY}1	0,35% ± 0,33%	0,13% ± 0,23%	0,32% ± 0,08%	0,35% ± 0,28%
	{YYYYY}2	8,46% ± 0,33%	3,70% ± 0,06%	5,83% ± 0,11%	6,22% ± 0,22%
	{YYYYY}3	2,68% ± 0,51%	1,32% ± 0,13%	1,67% ± 0,10%	1,80% ± 0,15%
	{YYYYY}4	7,17% ± 0,69%	1,06% ± 0,31%	1,71% ± 0,03%	1,63% ± 0,03%
	{11111}	5,11% ± 0,51%	0,89% ± 0,36%	0,63% ± 0,05%	0,70% ± 0,04%
Pro-286	{00000}	89,83% ± 2,19%	93,73% ± 2,57%	95,01% ± 0,66%	93,23% ± 0,53%
	{YYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,64% ± 1,11%	0,41% ± 0,27%	0,60% ± 0,29%
	{YYYYY}2	4,31% ± 0,41%	1,44% ± 0,76%	2,67% ± 0,36%	2,56% ± 0,87%
	{YYYYY}3	1,48% ± 0,38%	1,44% ± 1,32%	0,89% ± 0,15%	0,85% ± 0,91%
	{YYYYY}4	2,32% ± 2,40%	1,30% ± 0,58%	1,02% ± 0,46%	2,13% ± 1,17%
	{11111}	2,05% ± 0,80%	1,45% ± 1,31%	0,01% ± 0,01%	0,62% ± 0,84%
Asp-418	{0000}	75,99% ± 2,08%	93,46% ± 0,88%	95,10% ± 0,19%	95,66% ± 0,29%
	{YYYY}1	0,47% ± 0,82%	0,62% ± 0,42%	0,31% ± 0,22%	0,52% ± 0,38%
	{YYYY}2	5,34% ± 0,44%	2,51% ± 0,81%	2,71% ± 0,18%	1,97% ± 0,25%
	{YYYY}3	15,42% ± 1,08%	2,84% ± 0,24%	1,68% ± 0,22%	1,57% ± 0,32%
	{1111}	2,78% ± 0,48%	0,57% ± 0,02%	0,20% ± 0,31%	0,27% ± 0,23%
Thr-404	{0000}		95,86% ± 3,30%	98,20% ± 1,68%	91,54% ± 9,22%
	{YYYY}1		0,47% ± 0,47%	0,00% ± 0,00%	2,72% ± 2,17%
	{YYYY}2		3,29% ± 2,87%	0,28% ± 0,48%	0,38% ± 0,65%
	{YYYY}3		0,00% ± 0,00%	0,68% ± 1,18%	3,60% ± 6,24%
	{1111}		0,38% ± 0,34%	0,83% ± 1,44%	1,77% ± 2,47%

Infektion der Caco-2-Zellen mit FCS-behandelten <i>S. Typhimurium</i> 14028s					
bakterielle AS			AS aus den Wirtszellen infiziert mit		
	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	Wildtyp	$\Delta ptsG, manXYZ, uhpT$	
Ile-200	{X00000}	98,16% ± 0,86%	98,96% ± 0,47%	99,71% ± 0,15%	99,57% ± 0,38%
	{YYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	0,41% ± 0,48%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}2	1,00% ± 0,51%	0,28% ± 0,48%	0,13% ± 0,11%	0,21% ± 0,23%
	{YYYYYYY}3	0,10% ± 0,17%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,15%	0,04% ± 0,07%
	{YYYYYYY}4	0,34% ± 0,31%	0,24% ± 0,25%	0,06% ± 0,11%	0,10% ± 0,10%
	{X11111}	0,40% ± 0,68%	0,12% ± 0,21%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,09%
Lys-488	{000000}	83,11% ± 1,93%	96,07% ± 3,42%	95,41% ± 2,16%	99,16% ± 1,46%
	{YYYYYYY}1	1,42% ± 1,57%	0,00% ± 0,00%	1,10% ± 1,90%	0,02% ± 0,04%
	{YYYYYYY}2	1,73% ± 3,00%	0,31% ± 0,54%	0,74% ± 0,65%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}3	0,85% ± 1,47%	0,73% ± 0,88%	0,53% ± 0,92%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}4	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYY}5	2,39% ± 4,00%	1,80% ± 1,73%	0,85% ± 1,48%	0,82% ± 1,42%
{111111}	10,50% ± 6,11%	1,09% ± 1,69%	1,37% ± 1,28%	0,00% ± 0,00%	
His-440	{000000}	88,00% ± 4,60%		98,07% ± 1,84%	92,81% ± 2,00%
	{YYYYYYY}1	0,80% ± 1,39%		0,31% ± 0,54%	0,13% ± 0,23%
	{YYYYYYY}2	0,66% ± 1,14%		0,11% ± 0,19%	0,89% ± 1,54%
	{YYYYYYY}3	0,76% ± 1,32%		0,52% ± 0,48%	0,11% ± 0,19%
	{YYYYYYY}4	1,95% ± 1,70%		0,00% ± 0,00%	3,79% ± 1,33%
	{YYYYYYY}5	5,64% ± 3,58%		0,58% ± 0,93%	0,96% ± 0,80%
{111111}	2,19% ± 2,91%		0,41% ± 0,63%	1,32% ± 1,75%	
Phe-336	{000000000}	89,98% ± 3,85%	90,09% ± 6,70%	94,97% ± 0,85%	95,03% ± 1,62%
	{YYYYYYYYYYY}1	0,43% ± 0,74%	1,23% ± 2,14%	0,40% ± 0,52%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}2	0,48% ± 0,82%	1,85% ± 3,10%	0,19% ± 0,33%	1,55% ± 1,50%
	{YYYYYYYYYYY}3	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,28% ± 0,49%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}4	1,55% ± 2,68%	2,29% ± 3,96%	0,35% ± 0,60%	0,72% ± 0,76%
	{YYYYYYYYYYY}5	0,33% ± 0,57%	1,56% ± 2,70%	0,87% ± 1,08%	0,59% ± 0,75%
	{YYYYYYYYYYY}6	0,66% ± 1,14%	0,00% ± 0,00%	0,78% ± 1,35%	0,76% ± 0,70%
	{YYYYYYYYYYY}7	0,24% ± 0,42%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%
	{YYYYYYYYYYY}8	0,92% ± 1,22%	2,07% ± 1,81%	0,51% ± 0,78%	0,15% ± 0,13%
{111111111}	5,42% ± 1,76%	0,91% ± 1,52%	1,59% ± 0,89%	1,20% ± 1,50%	
Tyr-466	{000000000}	82,96% ± 6,24%	93,30% ± 7,92%		
	{YYYYYYYYYYY}1	0,00% ± 0,00%	2,40% ± 4,16%		
	{YYYYYYYYYYY}2	3,02% ± 5,23%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}3	0,52% ± 0,90%	0,00% ± 0,00%		
	{YYYYYYYYYYY}4	0,83% ± 1,35%	1,06% ± 1,50%		
	{YYYYYYYYYYY}5	2,50% ± 1,87%	0,14% ± 0,24%		
	{YYYYYYYYYYY}6	2,84% ± 2,77%	1,75% ± 3,00%		
	{YYYYYYYYYYY}7	0,87% ± 1,50%	0,86% ± 1,49%		
	{YYYYYYYYYYY}8	3,29% ± 2,26%	0,50% ± 0,87%		
{111111111}	3,19% ± 1,16%	0,00% ± 0,00%			

Berechnung des mittleren ^{13}C -Überschusses pro C-Atom:

Ser-390	21,40%	3,30%	3,42%	3,51%
Gly-246	15,07%	1,07%	2,59%	2,41%
Ala-260	44,06%	12,76%	15,98%	14,84%
Val-288	28,48%	2,45%	0,81%	0,56%
Leu-274	1,40%	0,21%	0,12%	0,10%
Glu-432	15,91%	4,03%	5,39%	5,64%
Pro-286	6,52%	4,06%	2,50%	3,98%
Asp-418	17,13%	4,11%	2,89%	2,57%
Thr-404	0,00%	2,14%	1,49%	5,33%
Ile-200	1,13%	0,50%	0,16%	0,27%
Lys-488	13,73%	3,05%	2,78%	0,69%
His-440	8,92%	0,00%	1,24%	5,01%
Phe-336	7,89%	5,18%	3,43%	2,83%
Tyr-466	11,27%	3,09%	0,00%	0,00%

Anhang 23: Verfolgung des ^{13}C -Kohlenstoffs durch zwei Runden des Citronensäurezyklus

Bei der in Abb. 38 dargestellten Umsetzung von $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA mit unmarkiertem Oxalacetat entsteht zunächst $^{13}\text{C}_2$ -markiertes α -Ketoglutarat (Glutamat) oder $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Oxalacetat (Aspartat). Da Succinat jedoch völlig symmetrisch ist, können aus $^{12}\text{C}_2$, $^{13}\text{C}_2$ -Fumarat zwei an unterschiedlichen Positionen markierte $^{13}\text{C}_2$ -Malat-Isotopologe mit einer Wahrscheinlichkeit von je 50% entstehen.

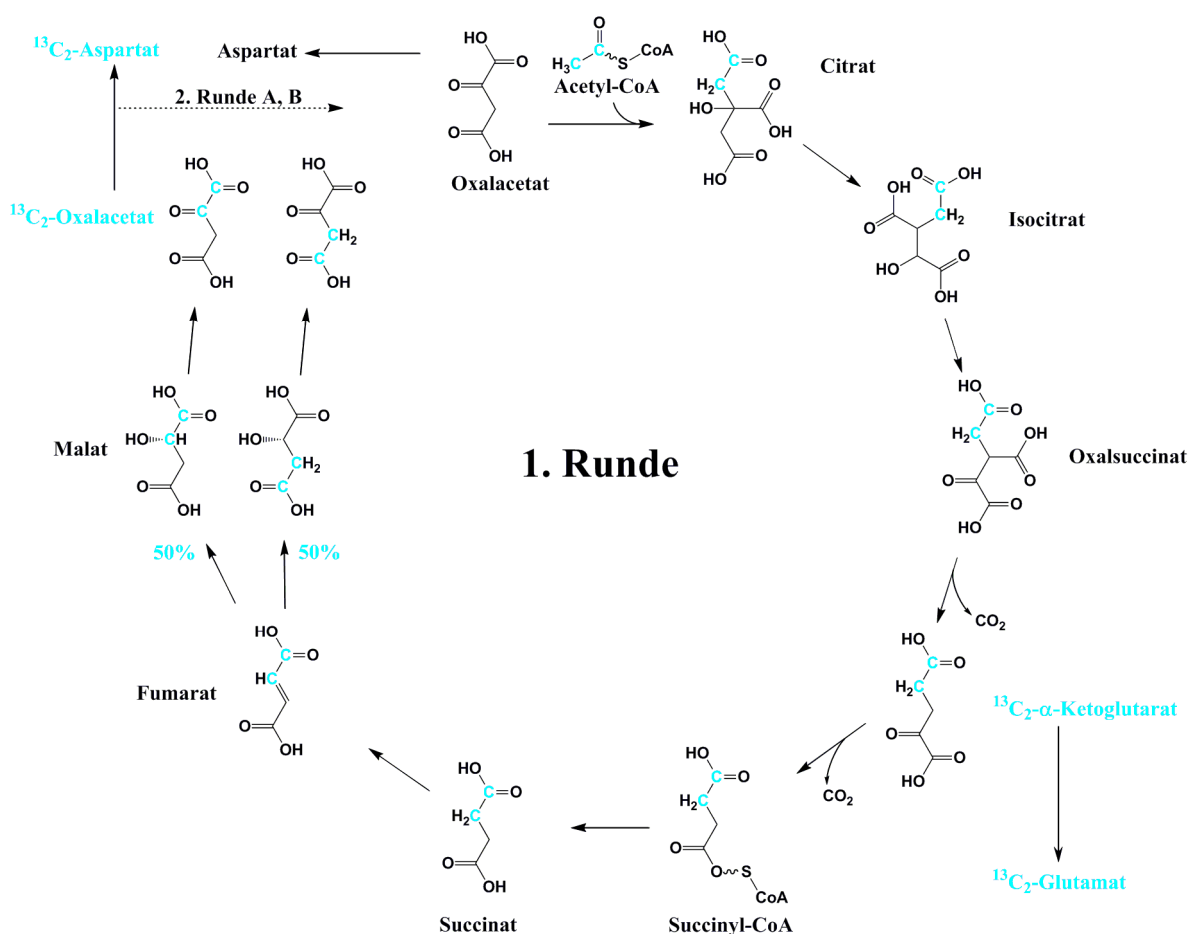


Abb. 38: Erster Durchlauf des Citratzyklus mit $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA und unmarkiertem Oxalacetat. Dabei entsteht ausschließlich $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Glu oder zwei unterschiedlich markierte $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat- bzw. $^{13}\text{C}_2$ -Aspartat-Isotopologe. Zur Vereinfachung sind keine ^{12}C -, sondern nur ^{13}C -Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat (blau).

Bei einem zweiten Durchlauf der daraus zu gleichen Teilen gebildeten, unterschiedlich markierten $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat-Isotopologe zusammen mit $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA durch den Citratzyklus entstehen $^{13}\text{C}_3$ -markierte (Abb. 39A) oder $^{13}\text{C}_4$ -markierte (Abb. 39B) Glu-Isotopologe in gleichen Mengen. Bei Asp wird jedoch stets das $^{13}\text{C}_3$ -Isotopolog gebildet, das in ähnlicher Menge entstehen sollte, wie das im ersten Durchgang gebildete $^{13}\text{C}_2$ -Isotopolog.

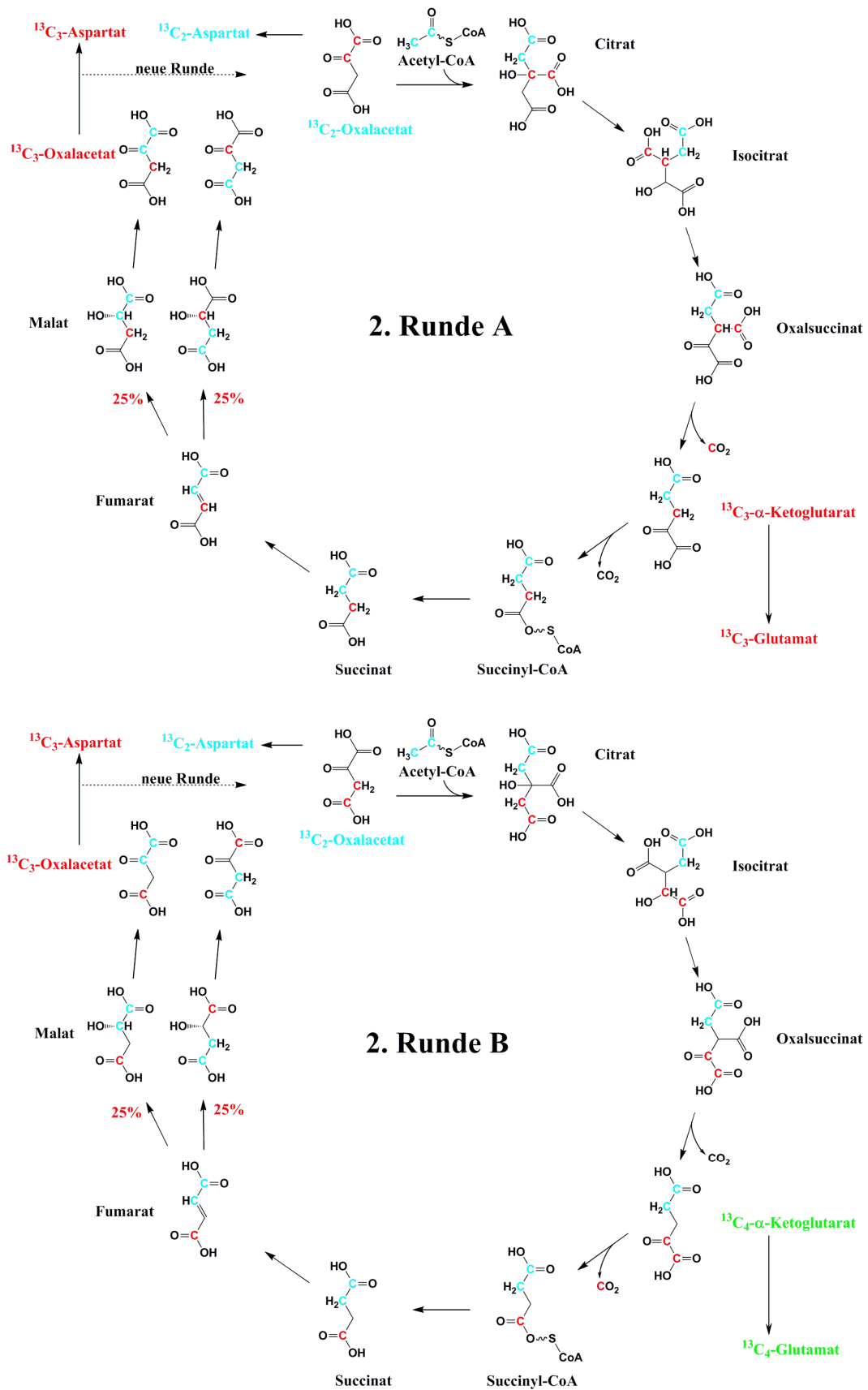


Abb. 39: Zweiter Durchlauf des Citratzyklus mit $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA und $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Oxalacetat. Abhängig vom verwendeten $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat-Isotopolog zu Beginn der zweiten Runde entstehen das $^{13}\text{C}_3$ -Glu und das $^{13}\text{C}_4$ -Glu Isotopolog in gleichen Mengen, aber nur das $^{13}\text{C}_3$ -Asp Isotopolog. Zur Vereinfachung sind keine ^{12}C -, sondern nur ^{13}C -Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat (blau) oder von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Oxalacetat aus der ersten Runde (rot).

Diese Reaktionsfolge scheint sowohl bei den Wildstämmen als auch bei den $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten abzulaufen, da bei allen Bakterien $^{13}C_3$ -Glu Isotopologe gefunden wurden. Jedoch überwog bei den Wildstämmen das $^{13}C_4$ -Glu Isotopolog verglichen mit $^{13}C_3$ -Glu und das $^{13}C_3$ -Asp Isotopolog verglichen mit $^{13}C_2$ -Asp, während bei den Mutanten beide Glu-Isotopologe in ähnlichen Mengen und das $^{13}C_2$ -Asp Isotopolog in größerer Menge als $^{13}C_3$ -Asp auftrat.

Anhang 24: Anaplerotische Reaktion: Synthese von Oxalacetat aus PEP und CO₂ durch die PEP-Carboxylase und nachfolgende Umsetzung im Citronensäurezyklus

Werden Intermediate (α -Ketoglutarat oder Oxalacetat) aus dem Citratzyklus zur Synthese von Aminosäuren entnommen, so muß dieser zur Bereitstellung des Akzeptormoleküls Oxalacetat wieder aufgefüllt werden. Bei der nachfolgend dargestellten anaplerotischen Reaktion katalysiert durch die PEP-Carboxylase entsteht aus ¹³C₃-markiertem PEP und unmarkiertem CO₂ ¹³C₃-markiertes Oxalacetat (Abb. 40).

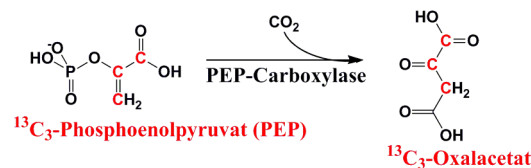


Abb. 40: Anaplerotische Reaktion der PEP-Carboxylase. Katalysiert durch die PEP-Carboxylase entsteht aus ¹³C₃-markiertem PEP, das in der Glykolyse aus [U-¹³C₆]-Glukose gebildet werden kann, durch Addition von unmarkiertem CO₂ ¹³C₃-Oxalacetat. Zur Vereinfachung sind keine ¹²C-, sondern nur ¹³C-Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von ¹³C₃-markiertem PEP (rot).

¹³C₃-Oxalacetat kann direkt zu ¹³C₃-markiertem Asp transaminiert werden (Abb. 41, rot dargestellt) oder im Citratzyklus zusammen mit ¹³C₂-markiertem Acetyl-CoA zu ¹³C₅-markiertem Citrat umgesetzt werden. Durch Decarboxylierung des ¹³C-markierten, ehemaligen C₁-Atoms von Oxalacetat vom ¹³C₅-markierten Oxalsuccinat entsteht ¹³C₄-markiertes α -Ketoglutarat und daraus wiederum ¹³C₄-Glutamat (grün dargestellt), jedoch kein ¹³C₃-Glu Isotopolog. Diese Reaktionsfolge scheint also bei den Wildstämmen zur Wiederauffüllung des Citratzyklus nach der Entnahme von ¹³C₂-markiertem Glu oder Asp in der ersten Runde (Anhang 23) zu überwiegen. Nach einem vollständigen Durchlauf von ¹³C₄- α -Ketoglutarat durch den Citratzyklus kann ebenfalls ¹³C₄-markiertes Asp gebildet werden, aber kein ¹³C₂-Asp Isotopolog.

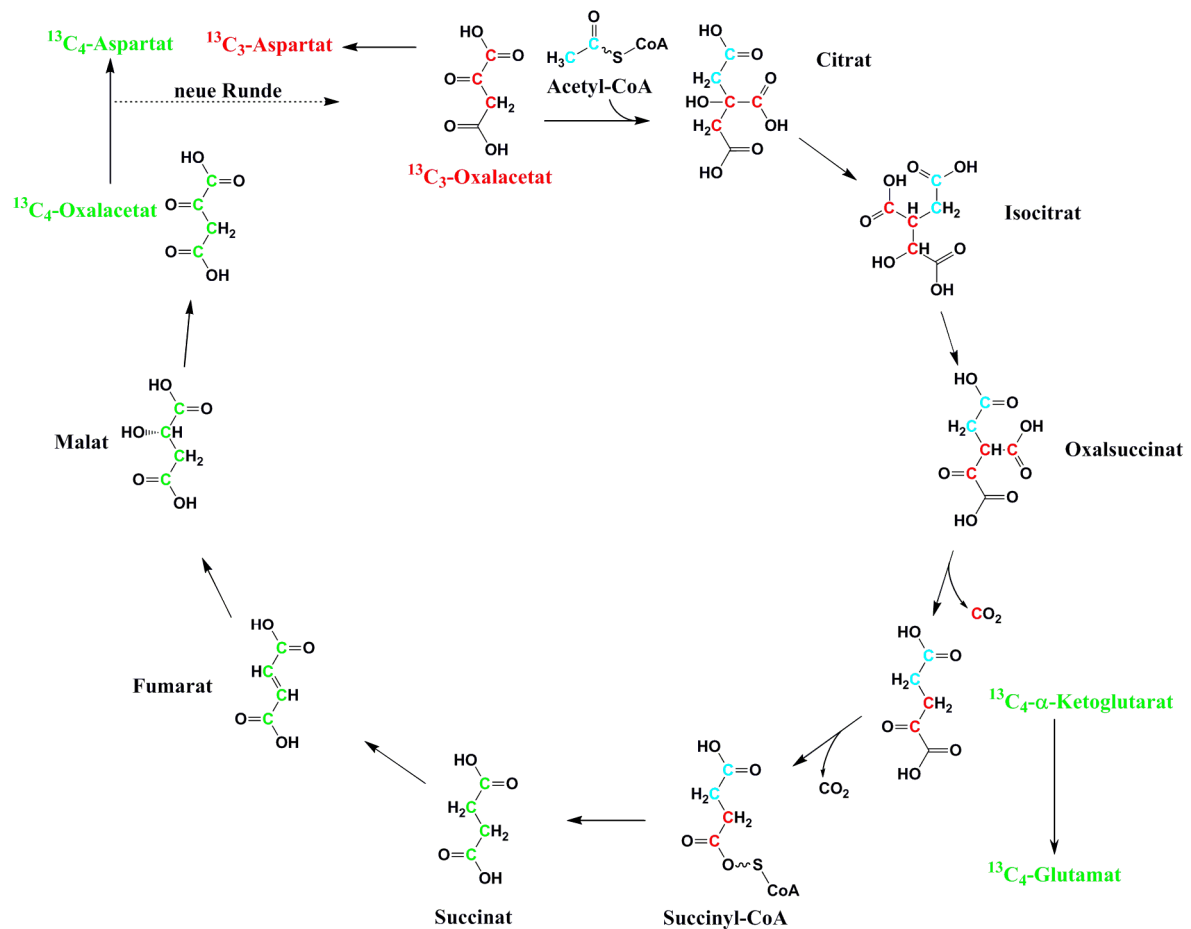


Abb. 41: Durchlauf des Citratzyklus mit $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetyl-CoA nach der Wiederauffüllung mit $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Oxalacetat aus der PEP-Carboxylase-Reaktion. Dabei entstehen zunächst überwiegend $^{13}\text{C}_3$ -markiertes Asp und $^{13}\text{C}_4$ -markiertes Glu, jedoch kein $^{13}\text{C}_3$ -Glu Isotopolog. $^{13}\text{C}_4$ -Asp kann ebenfalls gebildet werden, wenn $^{13}\text{C}_4$ - α -Ketoglutarat nicht zur Synthese des $^{13}\text{C}_4$ -Glu Isotopologs verwendet wird. Zur Vereinfachung sind keine ^{12}C -, sondern nur ^{13}C -Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat (blau) oder von $^{13}\text{C}_3$ -markiertem Oxalacetat aus der PEP-Carboxylase-Reaktion (rot). Da $^{13}\text{C}_4$ -Succinat völlig symmetrisch ist, kann die Herkunft der ^{13}C -Atome nicht mehr bestimmt werden (grün).

Anhang 25: Anaplerotische Reaktion: Wiederauffüllung des Citratzyklus über den Glyoxylatweg und die Synthese von PEP aus Oxalacetat durch die PEP-Carboxykinase

Bei der in Abb. 42 dargestellten Umsetzung von $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA mit unmarkiertem Oxalacetat entstehen durch die Aktivität der Isocitratlyase zunächst zwei an unterschiedlichen Positionen $^{13}\text{C}_2$ -markierte Malat- und daraus wiederum Oxalacetat-Isotopologe in gleichen Mengen. Durch die Reaktion des ebenfalls gebildeten unmarkierten Glyoxylats mit markiertem $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA entsteht jedoch nur ein Malat-/Oxalacetat-Isotopolog. In der Summe sind 25% des gebildeten Oxalacetat an Position 1 und 2 mit ^{13}C markiert und 75% an Position 3 und 4.

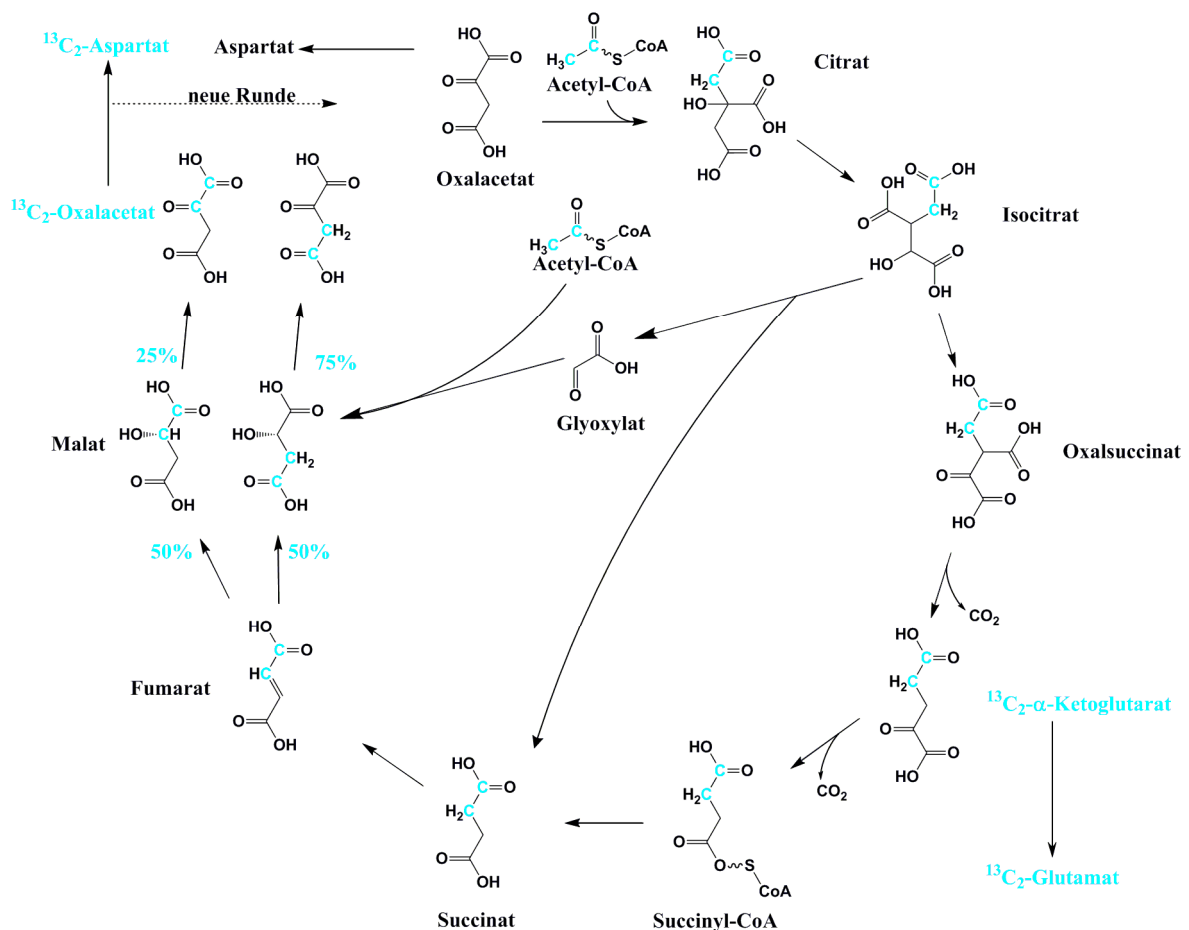


Abb. 42: Glyoxylatzyklus. Der hier abgebildete Glyoxylatzyklus stellt eine mögliche Variante zur Wiederauffüllung des Citratzyklus bei den $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten dar. Zur Vereinfachung sind keine ^{12}C -, sondern nur ^{13}C -Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von $^{13}\text{C}_2$ -markiertem Acetat (blau).

Durch die PEP-Carboxykinasereaktion entstehen aus den an unterschiedlichen Positionen markierten $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat Isotopologen zu 25 % $^{13}\text{C}_2$ -markiertes PEP und zu 75 % $^{13}\text{C}_1$ -markiertes PEP (Abb. 43). Während der Glukoneogenese können daraus die

entsprechend markierten 3-Phosphoglycerat-Isotopologe gebildet werden. Diese Reaktionsfolge könnte in den $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten intrazellulär überwiegend ablaufen, da die Mengen der $^{13}C_1$ - und $^{13}C_2$ -Ser Isotopologe im Vergleich zum $^{13}C_3$ -Ser Isotopolog deutlich zunehmen.

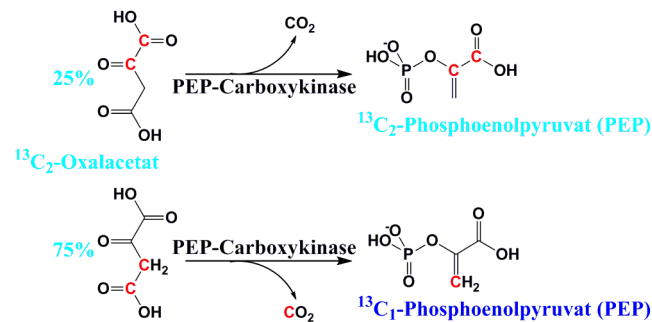


Abb. 43: PEP-Carboxykinase-Reaktion zur Erzeugung von PEP aus Oxalacetat. Zur Vereinfachung sind keine ^{12}C -, sondern nur ^{13}C -Kohlenstoffatome dargestellt. Die Farben geben die Abstammung wieder: von $^{13}C_2$ -markiertem Oxalacetat (rot).

Bei extrazellulärem Wachstum der $\Delta ptsG$, $manXYZ$, $uhpT$ -Mutanten in RPMI 1640 mit 10% FCS und 10 mM [U- $^{13}C_6$]-Glukose könnte das so gebildete ^{13}C -markierte PEP durch die Pyruvatkinase in $^{13}C_1$ - und $^{13}C_2$ -markiertes Pyruvat umgewandelt werden. Daraus kann durch Transaminierung $^{13}C_1$ - und $^{13}C_2$ -markiertes Ala synthetisiert werden. Es ist aber auch möglich, daß durch Decarboxylierung der beiden ^{13}C -markierten Pyruvat Isotopologe $^{13}C_1$ -Acetyl-CoA gebildet wird, das erneut zusammen mit unmarkiertem Oxalacetat in den Citrat- oder Glyoxylatzyklus eingeschleust wird. Unmarkiertes Oxalacetat könnte durch die Aufnahme und den Abbau von Glutamin aus dem Kulturmedium generiert werden.

Veröffentlichungen

Götz, A. and Goebel, W. 2010. Glucose and glucose 6-phosphate as carbon sources in extra- and intracellular growth of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Microbiology*, 156(Pt 4), pp. 1176-87.

Götz, A., Eylert, E., Eisenreich, W. and Goebel, W. 2010. Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PLoS One*, 5(5), pp. e10586.

Stritzker, J., Weibel, S., Seubert, C., Götz, A., Tresch, A., van Rooijen, N., Oelschlaeger, T. A., Hill, P. J., Gentschev, I. and Szalay, A. A. 2010. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *Int J Med Microbiol*, 300(7), pp. 449-56.