

Charakterisierung der CsrA-vermittelten Modulation des bakteriellen Stoffwechsels und seiner Wirkung auf die Pathogenität

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (**Dr. rer. nat.**)

genehmigte Dissertation von

Volker Berndt, M.Sc.

Erscheinungsjahr 2019

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Mark Brönstrup
Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Petra Dersch
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brüser
Tag der Promotion: 21.02.2019

I. Abstract

Most Pathogenic bacteria are able to face different environmental conditions and survive in their corresponding host cells using different strategies to fight or evade the host's immune response to the infection. This ability requires a fast adaptation of gene expression, translation and metabolism on a molecular level. The *csr*-system (carbon storage regulator) is a global regulatory system which is conserved among different genera of bacteria, regulating virulence, metabolic pathways, motility and pathogenicity. The system consists of the dimeric mRNA binding protein CsrA and small regulatory RNAs which suppress CsrA activity. The regulatory function of CsrA is based on the binding of the protein to GGA motifs of the mRNA which are often located near the ribosomal binding site. Due to the binding of CsrA, the ribosomes cannot attach to the mRNA, thereby preventing protein translation and also causing a faster degradation of the target mRNA.

In this study we analyzed the global influence of CsrA on the bacterial metabolism using high performance liquid chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry for further metabolite identification. Combining different chromatography techniques maximized the coverage of the metabolome and lipidome giving insights in the regulatory function of CsrA, by identifying in total 159 metabolites. Further combination with RNA sequencing resulted in a multi omics approach expanding the knowledge of the regulatory function of the *csr*-system. Using optimized growth media to induce virulence factor expression in the model organism EPEC E2348/69 we observed dramatic changes in the transcriptome and metabolome landscape of the $\Delta csrA$ mutant. Additionally, using electron microscopy, dramatic morphological changes in form of vesicle-like structures on the cell surface could be observed. We hypothesized that this could be a consequence of the strong upregulation of the colonic acid synthesis operon which was also clearly visible in the transcriptome data and also supported by the quantification of the colonic acid and exopolysaccharid production in the mutant strain. Also, other pathways like enterobactin biosynthesis, virulence gene expression, carbohydrate metabolism, aromatic amino acid synthesis, nucleoside salvage pathways and lipid metabolism were strongly influenced by the disruption of *csrA* and not or only partially described in the literature before.

II. Zusammenfassung:

Pathogene Bakterien sind in der Lage sich verschiedenen Umweltbedingungen anzupassen und die Immunantwort des Wirts zu umgehen. Diese Fähigkeit erfordert eine schnelle Anpassung der Genexpression, Translation und des Stoffwechsels auf molekularer Ebene. Das *csr*-System (carbon storage regulator) ist ein globales Regulationssystem, das zwischen verschiedenen Bakteriengattungen konserviert ist. Das System besteht aus dem dimeren mRNA-bindenden Protein CsrA und kleinen regulatorischen RNAs, die die CsrA-Aktivität unterdrücken. Die regulatorische Funktion von CsrA beruht auf der Bindung des Proteins an GGA-Motive der mRNA, die oft nahe der ribosomalen Bindungsstelle lokalisiert sind. Aufgrund der Bindung von CsrA wird die Ribosomenbindestelle blockiert, sodass eine Translation verhindert wird.

In dieser Studie haben wir den globalen Einfluss von CsrA auf den bakteriellen Stoffwechsel unter Verwendung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie, zur weiteren Identifizierung von Metaboliten analysiert. Durch die Kombination verschiedener Chromatographietechniken wurde die Abdeckung des Metaboloms und des Lipidoms maximiert, was Einblick in die regulatorische Funktion von CsrA ermöglichte, indem insgesamt 159 Metaboliten identifiziert wurden. Eine weitere Kombination mit RNA-Sequenzierung führte zu einem Multi-Omics-Ansatz, der das Wissen über die regulatorischen Funktionen des *csr*-Systems erweiterte. Mit optimierten Wachstumsmedien zur Induktion der Virulenzfaktor-Expression im Modellorganismus EPEC E2348 / 69 beobachteten wir dramatische Veränderungen in der Transkriptom- und Metabolom-Landschaft der $\Delta csrA$ Mutante. Mittels Elektronenmikroskopie konnten außerdem dramatische, morphologische Veränderungen in Form von vesikelartigen Strukturen auf der Zelloberfläche beobachtet werden. Dies führte zu der Hypothese, dass dies eine Folge der starken Hochregulierung des Kolonsäuresynthesoperons ist, die auch in den Transkriptomdaten deutlich sichtbar war und durch die Quantifizierung der Kolonsäure- und Exopolysaccharidproduktion im Mutantenstamm unterstützt wurde. Auch andere Stoffwechselwege wie Enterobactin-Biosynthese, Virulenzgenexpression, Kohlenhydratmetabolismus, Synthese aromatischer Aminosäuren, Nucleosid-Salvage-Wege und Lipidmetabolismus wurden ebenfalls stark durch die Deletion von *csrA* beeinflusst und wurden in der Literatur nicht oder nur teilweise beschrieben.

Keywords: metabolomics, transcriptomics, *csr*-system, virulence, metabolic pathways

Schlagworte: Metabolomik, Transkriptomik, Csr-System, Virulenz, Regulation des Zentralstoffwechsel

III.	Inhaltsverzeichnis	
I.	Abstract	i
II.	Zusammenfassung:	ii
III.	Inhaltsverzeichnis	iv
IV.	Abbildungsverzeichnis	ix
V.	Tabellenverzeichnis	x
VI.	Abkürzungsverzeichnis	xi
1	Einleitung	1
1.1	Modellorganismus Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	1
1.2	Carbon storage system (Csr)	5
1.2.1	Funktion und Regulation des CsrA-Systems	5
1.2.2	Bekannte Effekte des Csr-Systems in <i>Escherichia</i>	10
1.3	Ansätze der Systembiologie	14
1.4	Metabolomanalyse	16
1.4.1	Einführung in Metabolomics	16
1.4.2	Probenvorbereitung – Quenching und Metaboliten-Extraktion	17
1.4.3	Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie	18
1.4.4	Massenspektrometrie und Ionisierung	19
1.4.5	Gaschromatographie – Massenspektrometrie	21
1.4.6	Metabolom-Datenauswertung LC-MS	24
1.5	Transkriptomanalyse	26
1.6	Screening nach CsrA Inhibitoren	28
1.7	Zielsetzung der Dissertation	31
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Chemikalien	32
2.1.2	Enzyme, Kits und Antikörper	32
2.1.3	Wachstumsmedien und Zusätze	33
2.1.4	Oligonukleotide	35
2.1.5	Stämme und Plasmide	37
2.2	Mikrobiologische Methoden	39
2.2.1	Sterilisierung	39
2.2.2	Kultivierung und Stammhaltung	39
2.2.3	Probennahme für die Transkriptomanalyse	39
2.2.4	Bestimmung der Zelldichte	39
2.2.5	Herstellung von elektrokompetenten Zellen	40
2.2.6	Elektrotransformation	40

2.2.7	Transformation via Konjugation	40
2.2.8	Bestimmung der Wachstumsrate	41
2.2.9	Trockengewichtsbestimmung	41
2.2.10	Wachstums-Inhibitions Assay	42
2.2.11	Jod Stärke Test	43
2.2.12	Screening nach CsrA Inhibitoren	44
2.3	Molekularbiologische Methoden: Ribonukleinsäuren	46
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	46
2.3.2	Chloroform Phenol Aufreinigung von RNA	46
2.3.3	DNase Verdau	47
2.3.4	„In vitro“ Transkription	47
2.3.5	Biotinylierung von RNA	48
2.3.6	Dephosphorylierung der RNA	48
2.3.7	Radioaktive Markierung von RNAs	49
2.4	Molekularbiologische Methoden: Desoxyribonukleinsäuren	50
2.4.1	Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	50
2.4.2	Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen	50
2.4.3	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA Fragmenten	51
2.4.4	Plasmidisolierung	52
2.4.5	DNA Aufreinigung	52
2.4.6	DNA Sequenzierung	52
2.5	Generation von Deletionsmutanten und Klonierung	53
2.5.1	DNA Restriktion	53
2.5.2	Dephosphorylierung von Vektoren	53
2.5.3	DNA Ligation	53
2.5.4	Generation von Deletionsmutanten mit dem Lambda Red System	54
2.6	Plasmid Konstruktion	56
2.6.1	Klonierung der pFU53 Screening Vektoren	56
2.6.2	Klonierung von <i>csrA</i> Überexpressionsvektoren	56
2.7	Metabolomanalyse und -analytik	57
2.7.1	Kultivierungsbedingung für GC- und LC – MS Experimente	57
2.7.2	Metaboliten Extraktion LC-MS	57
2.7.3	Metaboliten Extraktion GC-MS	58
2.7.4	Lipid Extraktion LC-MS	58
2.7.5	Lipid Extraktion GC-MS	59
2.7.6	Derivatisierung der polaren Phase für GC-MS	60
2.7.7	FAME Derivatisierung	60
2.7.8	HPLC-MS Analyse der polaren Extraktionsproben	61
2.7.9	HPLC-MS Analyse der unpolaren Extraktionsproben	63
2.7.10	GC-MS Analyse der polaren Extraktionsproben	63

2.7.11	GC-MS Analyse der unpolaren Extraktionsproben	65
2.8	Biochemische Methoden	65
2.8.1	CsrA Expression Protein-Aufreinigung	65
2.8.2	Bradford Assay	66
2.8.3	SDS Page	66
2.8.4	Western-Blot	67
2.8.5	Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE	68
2.8.6	RNA EMSA	68
2.8.7	TBE – Gel (RNA EMSA)	69
2.8.8	Detektion Biotin-markierter RNAs	70
2.8.9	Urea-TBE-Gel zur Trennung von RNA Fragmenten	70
2.8.10	Isolation von Kolansäure	71
2.8.11	Quantitative Bestimmung der Kolansäure	71
2.8.12	Quantitative Bestimmung der mikrobiellen Exopolysaccharide (EPS)	72
2.9	Elektronenmikroskopie	73
2.9.1	Rasterelektronenmikroskopie	73
2.9.2	Negativ Färbung	74
2.10	Statistische Methoden und Auswertung	74
2.10.1	Metabolom Datenprozessierung LC-MS mit XCMSOnline	74
2.10.2	Annotation der LC-Daten	75
2.10.3	Datenanalyse mit XCMS package (R-basiert)	76
2.10.4	Datenanalyse der GC-Proben mit „Metabolite Detektor“	77
2.10.5	Statistische Datenanalyse der Metabolomdaten	78
2.10.6	Readmapping, Bioinformatik und Statistik von Transkriptomdaten	79
3	Ergebnisse	81
3.1	CsrA beeinflusst den Wachstumsphänotyp von E2348/69	81
3.2	Virulenzgenexpression ist abhängig von den Wachstumsbedingungen	83
3.3	„Untargeted“ Metabolom und Transkriptom Ansatz	85
3.4	Globale Effekte von CsrA auf das Metabolom und den Stoffwechsel	92
3.4.1	Einfluss auf die Glykolyse und angrenzenden Stoffwechselwege	93
3.4.2	Nucleotid-Salvage-Stoffwechsel und Redoxäquivalente	96
3.4.3	Aromatische Aminosäure Synthese	97
3.4.4	Einfluss auf die Enterobactin Biosynthese	100
3.4.5	Einfluss auf verschiedene Aminosäurespiegel	101
3.4.6	Zellhülle und Lipidstoffwechsel	101
3.4.7	Fettsäureprofil des $\Delta csrA$ Stammes sowie der <i>csrA</i> Überexpressionsmutante	103
3.5	Globale Effekte von CsrA auf das Transkriptom und Strukturkomponenten	105
3.5.1	Effekte auf die Kolansäure-Biosynthese und Export	105
3.5.2	Hochregulation von Virulenzgenen	107

3.5.3	Effekte auf die Eisenaufnahmesysteme	110
3.5.4	Stress-Antwort	112
3.6	Einfluss auf den Phänotyp	113
3.6.1	Mikroskopie	113
3.6.2	Einfluss auf die Biofilmbildung	114
3.6.3	Keine direkte Regulation des Kolansäureoperons	116
3.6.4	EMSAs der <i>cfa</i> und <i>entC</i> mRNA	117
3.6.5	Nachweis der Glykogenüberproduktion der Δ <i>csrA</i> Mutante	119
3.7	CsrA als putatives Ziel für Antibiotika	120
3.7.1	Etablierung eines Screenings nach CsrA Inhibitoren	120
3.7.2	Synergismus mit anderen Antibiotika	122
4	Diskussion	124
4.1	Einfluss auf den Wachstumsphänotyp	125
4.1.1	Abhängigkeit der Virulenzgenexpression von der Medienzusammensetzung	126
4.2	Einfluss von CsrA auf den Zentralstoffwechsel	128
4.2.1	Glykolyse und Citratzyklus	128
4.2.2	Nucleotid-Salvage-Stoffwechselwege	131
4.2.3	Aminosäuren und Shikimat-Stoffwechselweg	132
4.2.4	Lipidstoffwechsel und FAME Profil	134
4.3	Globale Effekte auf das Transkriptom und Strukturkomponenten	135
4.3.1	Kolansäure-Biosynthese und Export	135
4.3.2	Type III Sekretionssystem und Virulenz	137
4.3.3	Eisenaufnahmesysteme und Enterobactin Biosynthese	140
4.3.4	Generelle Stressantwort	142
4.4	Phänotyp und Mikroskopie	143
4.4.1	Elektronenmikroskopie und Biofilmbildung	143
4.5	CsrA als Ziel für Antibiotika	144
5	Ausblick	147
6	Quellenverzeichnis	149
	Vorveröffentlichung der Dissertation	166
	Anhang	167
I.	Transkriptom KO/WT Cut Off log+/-2	168
II.	Transkriptom OE/WT Cutoff log2 +/-2	174
III.	159 Metabolite (GC-MS/LC-MS)	179
IV.	HPLC Polar Negative Mode	186
V.	HPLC Polar Positive Mode	190
VI.	GC Polar	195
VII.	FAME GC	200
VIII.	HPLC Lipidome negative	201

Inhaltsverzeichnis

IX.	HPLC Lipidome Positive	203
X.	Sequenzierung Read Mapping Statistik	205
XI.	Chromatogramme	206
XII.	Spektren: Identified features	211
XIII.	GC PCA Plot Polare Samples	252
XIV.	PCA Polare Extraktion Positive und Negative Modus	253
XV.	Transkriptome PCA Plot (Michael Beckstette)	254
XVI.	PCA Unpolare Extraktion Positive und Negative Modus	255
XVII.	Zellgröße des Wildtyps und der CsrA Mutante	256
XVIII.	Wachstumskurven in MOPS und M9 Medium	258
XIX.	Acquisition Parameter Report MS	259
	Danksagung	260
	Lebenslauf	261

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Typ III Sekretionssystems von A/E Pathogenen.	3
Abbildung 2: Struktur des CsrA-RNA Komplexes.....	7
Abbildung 3: Beispielmechanismus des Csr-Systems.....	9
Abbildung 4: Die “Omics” Kaskade der Systembiologie.....	14
Abbildung 5: A: Schematischer Aufbau einer Elektrospray Ionisierungsquelle. t.....	20
Abbildung 6: Funktionsweise eines ESI-QqTof in MS (oben) bzw. MS/MS (unten) Modus.	21
Abbildung 7: Derivatisierungsreaktionen, die in dieser Arbeit angewandt wurden.....	23
Abbildung 8: A: Arbeitsablauf der Transkriptom RNA-Seq und Erstellung der cDNA.....	28
Abbildung 9: Schematische Darstellung des CsrA Screening Assays.	30
Abbildung 10: Beispielschema MIC Assay.	43
Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung der Reportergenfusion.....	44
Abbildung 12: Readout System. Die Zielsequenz mit den putativen CsrA Bindestellen	44
Abbildung 13: Fusions-PCR und Generation der $\Delta csrA$ Deletionsmutante.....	55
Abbildung 14: Trockenmasse - optische Dichte-Korrelation.	82
Abbildung 15: Verschiedene Testbedingungen zur Virulenzgenexpression.....	84
Abbildung 16: CsrA und Tir-Bla Expression in verschiedenen Wachstumsmedien.....	85
Abbildung 17: Probengenerierungsschema.	86
Abbildung 18: Volcano Plot der gefilterten Features zwischen $\Delta csrA$ und Wildtyp.....	87
Abbildung 19: Feature Annotation anhand von Nortriptyline und Glutathion.....	88
Abbildung 20: Feature Annotation anhand von Uridinmonophosphat und Tyrosin.	89
Abbildung 21: A-C Volcano Plots der detektierten Transkripte gefiltert nach Signifikanz.	91
Abbildung 22: Einfluss von CsrA auf den Zentralstoffwechsel.....	95
Abbildung 23: Einfluss der CsrA Perturbation auf die Glykogensynthese.	95
Abbildung 24: Biosynthese der aromatischen Aminosäuren	99
Abbildung 25: Enterochelin/Enterobactin Biosynthese.	100
Abbildung 26: A Säulendiagramm der Lysolipidlevels von EPEC aus der polaren Extraktion.	102
Abbildung 27: Verteilung der FAMES.....	103
Abbildung 28: LEE Pathogenitätsinsel.	109
Abbildung 29: Einfluss der <i>csrA</i> Perturbation auf den Phänotyp.....	113
Abbildung 30: “Elektro Mobility Shift Assay” (EMSA) der 5'-UTR von <i>wza</i>	117
Abbildung 31: EMSAs der <i>cfa</i> 5'UTRs.....	118
Abbildung 32: EMSAs der <i>entC</i> 5'UTRs.	119
Abbildung 33: Jod Stärke Test der $\Delta csrA$ Mutante.....	120
Abbildung 34: Screening System mit <i>sepL</i> als Zielsequenz.	121
Abbildung 35: Screening System mit <i>hilD</i> als Zielsequenz.....	122
Abbildung 36: Regulation der LEE-Pathogenitätsinsel und des Virulenz-Plasmids pEAF in EPEC.	140

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Ziel-mRNAs: CsrA Screen	29
Tabelle 2: Enzyme	32
Tabelle 3: Kits.....	33
Tabelle 4: Antikörper	33
Tabelle 5: Wachstumsmedien	33
Tabelle 6: Minimalmedien.....	34
Tabelle 7: 10 x Stocks für Minimalmedien, Spurenelemente	34
Tabelle 8: Antibiotikazusätze	35
Tabelle 9: Oligonukleotide	35
Tabelle 10: Stämme	37
Tabelle 11: Plasmide.....	38
Tabelle 12: Interne Standards LC-MS (polare Extraktion).....	58
Tabelle 13: Interne Standards für Lipid-Metabolom Analyse (LC-MS).....	59
Tabelle 14: Interne Standards für Lipid-Metabolom Analyse (GC-MS)	60
Tabelle 15: Qualitätskontrollprobe	62
Tabelle 16: Alkan Zeitstandard (Retentionsindex Kalibrationsmix).	64
Tabelle 17: SDS Polyacrylamidelektrophorese	67
Tabelle 18: Tris-Tricine SDS Polyacrylamidelektrophorese	67
Tabelle 19: XCMS-online Parameter.....	75
Tabelle 20: XCMS Packet Parameter:	76
Tabelle 21: Wachstum in verschiedenen Wachstumsmedien.	82
Tabelle 22: Zusammensetzung des modifizierten M9 Mediums	85
Tabelle 23: Identifizierte Metaboliten GC-MS und LC-MS.....	92
Tabelle 24: Identifizierte Intermediate der Glykogensynthese	96
Tabelle 25: Ergebnisse der FAME Analyse.....	104
Tabelle 26: Regulation der Kolansäuresynthese- und Exportgene.	106
Tabelle 27: Regulation der LEE Pathogenitätsinseln.....	109
Tabelle 28: Regulation verschiedener Eisenaufnahmesysteme.....	111
Tabelle 29: CsrA hat Einfluss auf die Produktion der Exopolysaccharidmatrix.....	115

VI. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC Transporter	ATP-Bindekassetten Transporter
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BFP	“bundle forming pilus”
BPC	“Base Peak Chromatogram”
C	Cytosin
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
Cb	Carbenicillin
CDS	Codierende Sequenz “engl. Coding Sequence”
Cm	Chloramphenicol
CLIP	“Cross-linked Immunoprecipitation”
CoA	Coenzym A
Csr	“Carbon Storage Regulator”
DAP	meso-Diaminopimelinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
DYT	“Double Yeast Extract”
EAF	„EPEC adherence factor”
ED	Entner Douderoff Weg (Pathway)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	“Electro Mobility Shift Assay”
EPS	Exopolysaccharid
ESI	Elektrospray Ionisation
<i>et al.</i>	Latein: <i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
F6P	Fructose-6-Phosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FAME	Fettsäuremethylester “engl. fatty acid methylester”
FC	“Fold Change”
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase “engl. Horse Radish Peroxidase”
IM	Innere Membran
LB	“Lysogeny broth”
LC	Flüssigchromatographie “engl. Liquid Chromatography”
LEE	“Locus of enterocyte effacement”
LEE-PAI	LEE-Pathogenitätsinsel
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPG	Lysophosphatidylglycerol
Kan	Kanamycin
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamid

MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
m/z	“Mass to charge ratio”
MH	Müller Hinton („broth“)
MIC	Minimale Hemm-Konzentration
Min	Minute
M Zellen	„Microfold“ Zellen
NAD/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP/NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
OM	Äußere Membran “engl. outer membrane”
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	“Phosphate buffered saline”
Pfka	Phosphofruktokinase A
ORF	“Open Reading Frame”
Pmf	Protonenmotorische Kraft (engl. proton motif force)
Psp	“Phage Shock” Operon
PPP	Pentose Phosphat Zyklus (Pathway)
PVDF	“Polyvinylidene Fluorid”
RBS	Ribosomenbindestelle
RI	Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Shine Dalgano Sequenz
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
REM	Rasterelektronenmikroskop
T	Thymin
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
T3SS	Typ III Sekretionssystem
T6SS	Typ VI Sekretionssystem
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TMS	Trimethylsilyl
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TIC	“Total Ion Chromatogram”
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Uridin
UMP	Uridinmonophosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Modellorganismus Enteropathogene *Escherichia coli*

Die Gattung *Escherichia* zählt zu den γ -Proteobakterien, die erstmals durch den deutschen Kinderarzt Theodor Escherich beschrieben und benannt wurde. Die Gram-negativen, fakultativ-anaeroben, nicht sporulierenden Bakterien besiedeln den Dün- und Dickdarm von warmblütigen Tieren und Reptilien. Die 1 - 2 μm langen Stäbchen besitzen peritriche Flagellen und können sich aktiv fortbewegen (Berg, 1996; Gordon and Cowling, 2003; Tenailon *et al.*, 2010). *E. coli* Bakterien sind chemoorganotroph und können neben der aeroben Atmung mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zusätzlich NO_3^- , Fumarat und DMSO (Jones *et al.*, 2011; Unden and Bongaerts, 1997) nutzen und zusätzlich Glucose als einzige C-Quelle (Kohlenstoffquelle) und Energiequelle fermentativ in der gemischten Säuregärung umsetzen (Clark, 1989). *E. coli* ist ein beliebter Modellorganismus der Molekularbiologie, der Stoffwechselbiologie und der Genetik. Die Gattung *Escherichia* umfasst zudem eine Reihe relevanter humanpathogener Stämme, die aufgrund ihrer wachsenden Resistenz gegen Antibiotika (Carbapenem-Resistenz, ESBL-Produzent) und steigender Infektionsraten immer mehr an Bedeutung im Bereich der Infektionsforschung gewonnen haben (Liang *et al.*, 2018; Picozzi *et al.*, 2014).

Zwischen virulenten *E. coli* Stämmen wird generell in intestinale pathogene *E. coli* (InPEC) und extraintestinale pathogene *E. coli* (ExPEC) unterschieden. Dabei bildet die Gruppe der InPEC mit den neun verschiedenen Pathotypen die größere Gruppe. Dazu zählen: enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Shiga-Toxin-produzierende *E. coli* (STEC), Zell-adhärenzte *E. coli* (engl. celldetaching; CDEC), adhärenz invasive *E. coli* (AIEC) und diffus adhärenzte *E. coli* (DAEC) (Fratamico *et al.*, 2016). Bei den ExPEC werden nur drei Pathotypen unterschieden: uropathogene *E. coli* (UPEC), Neonatal-Meningitis *E. coli* (NMEC) und necrotoxische *E. coli* (NTEC). Diese können Gewebe außerhalb des Intestinaltraktes infizieren (Jang *et al.*, 2017; Vila *et al.*, 2016). Als typischer Erreger, der durch kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Trinkwasser übertragen wird, sind Infektionen mit pathogenen *E. coli*, neben *Campylobacter* und

Einleitung

Salmonellen Infektionen für einen Großteil der weltweiten Durchfallerkrankungen verantwortlich (Rangel *et al.*, 2005). Infektionen mit EPEC sind vor allem für eine hohe Morbidität und Mortalität in Kindern unter zwei Jahren in Entwicklungsländern verantwortlich. Der phylogenetisch sehr nah verwandte Pathotyp EHEC stellt auch in Industrienationen aufgrund seiner schweren Verlaufsformen ein wachsendes Problem dar. Zusätzlich wird die Behandlung erschwert, da eine Antibiotika Behandlung von EHEC Infektionen zur zusätzlichen Stimulierung der Toxinbildung führen kann (Chong *et al.*, 2018; Defraigne *et al.*, 2018; Rojas-Lopez *et al.*, 2018).

Infektionen mit EPEC zeichnen sich durch charakteristische histopathologische Befunde aus, die im Allgemeinen als „Attaching and Effacing“ (A/E) bezeichnet werden. Dabei heftet („attaching“) sich EPEC direkt an die Darmepithelzellen an und verursacht starke morphologische Veränderungen des Cytoskeletts wie die Akkumulation von polymerisiertem Aktin bei gleichzeitiger Reduktion der Mikrovilli („effacing“) und der Ausbildung von „pedestal-like“ Strukturen, die als Sockel für die angehefteten Zellen dienen (Kaper, 2005; Rothbaum *et al.*, 1982; Rothbaum *et al.*, 1983). Die entsprechenden Gene, die für diese charakteristischen, morphologischen Veränderungen verantwortlich sind, sind auf der sogenannten LEE-Pathogenitätsinsel (LEE- Locus of enterocyte effacement, **Pathogenitätsinsel PAI**) codiert. Die LEE-PAI ist homolog zu anderen „attaching and effacing“ enteropathogenen Bakterien wie EHEC (Jerse *et al.*, 1990; Kaper, 2005). Die LEE-PAI besteht aus fünf polycistronischen Operons (LEE1-5), dem bicistronischen Operon *grlRA* und mehreren monocistronischen Genen (*escD*, *map*, *espG*, *cesF*, *rorf3*). LEE codiert für das Typ 3 Sekretionssystem (T3SS) (**Abbildung 1**), sowie die assoziierten Chaperone und Effektorproteine (Deng *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 2000).

Darunter sind die wichtigen Virulenzfaktoren und der für die Anheftung an die Epithelzellen benötigte translozierte Intiminrezeptor (Tir), welcher sich in die Wirtszellmembran integriert und als Andockstelle für das ebenfalls LEE-codierte „intimin-outer-membrane“ Protein dient (Jerse *et al.*, 1990). Zusätzlich verfügen typische EPEC Stämme über ein 70-100kb großes Virulenzplasmid (EAF-„EPEC adherence factor plasmid“), welches die Gene für einen Typ IV Pilus codiert (Mellies *et al.*, 1999). Dieser Typ IV Pilus, der auch als „bundle forming pilus“ (BFP) bezeichnet wird, vermittelt die initiale Anheftung an die Wirtszellen. Ebenfalls auf dem EAF-Plasmid codiert ist der Regulator des *bfp* Operons *per* („plasmid-encoded regulator“),

der zusätzlich den LEE-codierten Masterregulator der LEE-PAI *ler* reguliert (Bustamante *et al.*, 2011).

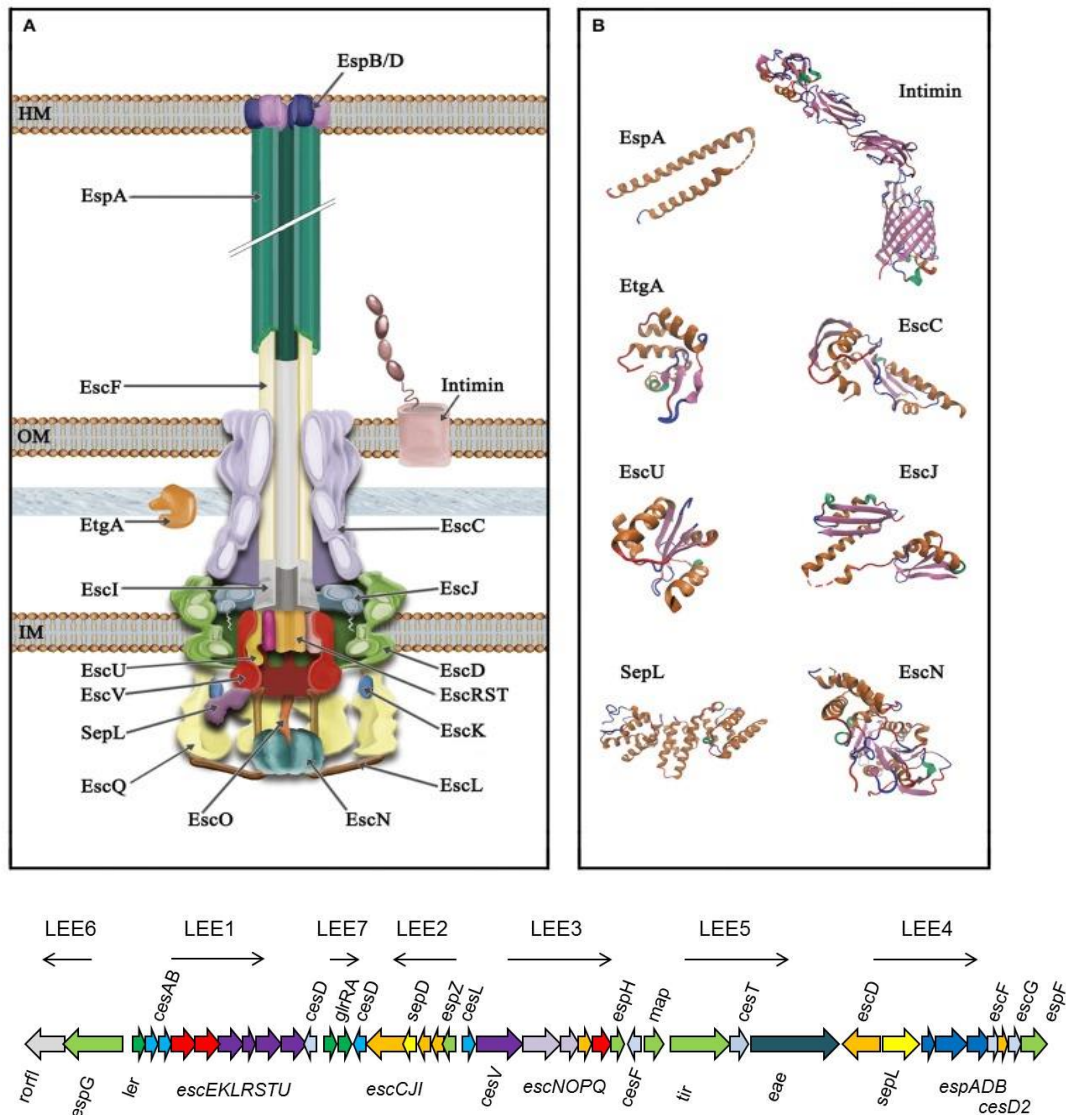


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Typ III Sekretionssystems von A/E Pathogenen. (A): Das T3SS fungiert als molekulare Nadel zum Injizieren von Effektor-molekülen in die Zielzelle und ist der Hauptpathogenitätsfaktor in enteropathogenen *E. coli* Stämmen. Das T3SS wird generell in drei Hauptbestandteile unterteilt (von unten nach oben): (i) extrazelluläre Anhänge (Translokationspore), Filament und Nadelkomplex, (ii) Basalkörper (3 Membranringe), (iii) zytoplasmatische Komponenten: C-Ring, ATPase-Komplex und „Gatekeeper“ Protein. Zum Anheften an die Wirtszelle wird Intimin benötigt. **(B):** Aufgeklärte Strukturen von T3SS Proteinen. Diese Abbildung wurde aus Gaytan *et al.*, 2016¹ entnommen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die LEE-PAI in EPEC (siehe auch Abbildung 28).

¹ Die Abbildung wurde Erst-Veröffentlicht in “Frontiers Cellular and Infektion Microbiology”
 Gaytan, M.O., Martinez-Santos, V.I., Soto, E., and Gonzalez-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 129. © Frontiers Frontiers Cellular and Infektion Microbiology.

Einleitung

Das LEE-codierte T3SS ist ein makromolekularer Komplex, welcher als Nanonadel für die Sekretion von Effektormolekülen in das Cytoplasma der Wirtszelle fungiert. Dieser Komplex besteht aus 25 Strukturproteinen (**Abbildung 1**), wobei die Mehrzahl dieser Proteine selbst in phylogenetisch weiter entfernten bakteriellen Pathogenen stark konserviert ist (Ghosh, 2004). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des T3SS zu der bakteriellen Flagelle ist zudem davon auszugehen, dass beide bakteriellen Proteinstrukturen den gleichen evolutionären Ursprung haben (Blocker *et al.*, 2003).

Daneben sind eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren wie PerC, QseA, IHF, FIS, HNS, die außerhalb der LEE-PAI liegen, für die Regulation des EPEC T3SS verantwortlich (Bhatt *et al.*, 2009; Darby *et al.*, 2002; Faleev *et al.*, 1988; Forsbach-Birk *et al.*, 2004; Swimm *et al.*, 2004; Yanofsky *et al.*, 1991). Die Regulation ist abhängig von Umweltbedingungen, wie dem pH-Wert, der Osmolarität, der $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3^-$ und Ca^{2+} -Konzentration, der Temperatur, dem „Quorum Sensing“, sowie der HCO_3^- Konzentration (Aballay and Ausubel, 2002; Tan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2001). In der Regel geschieht dies über die Regulation von *ler*. Ebenfalls wurde der Einfluss des „Carbon Storage Systems“ (Csr-System) auf die Transkription der LEE-PAI beschrieben, die allerdings nicht über die Regulation von *ler* gesteuert wird (Bhatt *et al.*, 2009).

1.2 Carbon storage system (Csr)

Bakterien sind sich ständig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt. Es haben sich evolutionär eine Vielzahl an regulatorischen Prozessen entwickelt, um katabolische und anabolische Prozesse in Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen zu regulieren. Dazu zählt beispielsweise die Optimierung der Energieausbeute in Abhängigkeit der verfügbaren Zucker, die Motilität, die Virulenz, die Biofilmbildung und viele weitere. Besonders enteropathogene Bakterien sind starken Fluktuationen in der Nährstoffzusammensetzung im Wirt sowie der Konkurrenz mit kommensalen Bakterien um Nährstoffe ausgesetzt. In Studien wurde gezeigt, dass die Kolonisierung der Wirtszellen durch enteropathogene *E. coli* eng mit der Umsetzung der verfügbaren Einfachzucker, organischen Säuren und Faserstoffen zusammenhängt. In der Konsequenz ist es sehr wichtig den Primärmetabolismus rapide anzugleichen, um die Infektion zu etablieren (Snider *et al.*, 2009). Der Einfluss von post-transkriptionellen Systemen auf metabolische Stoffwechselwege und auf Funktionen in Bakterien, wie z.B. durch das Csr-System, werden zurzeit noch nicht vollständig verstanden.

1.2.1 Funktion und Regulation des CsrA-Systems

Das Csr-System besteht aus dem dimeren RNA-Bindeprotein „Carbon storage regulator A“ (CsrA) und kleinen regulatorischen RNAs, welche die Aktivität von CsrA inhibieren. Das Gen, welches für CsrA codiert, wurde ursprünglich während eines „Transposon-Mutagenese-Screenings“ entdeckt. Ziel des „phänotypischen Screens“ war die Identifizierung von Genexpressions-Regulatoren, die während der stationären Wachstumsphase aktiv sind. Eine Transposoninsertion in den *csrA* Locus führte dabei zu pleiotropen Effekten auf den Kohlenstoffstoffwechsel, auf die Zellmorphologie sowie auf die Fähigkeit sich an Oberflächen anzuheften (Romeo and Gong, 1993; Romeo *et al.*, 1993).

Mittlerweile ist bekannt, dass CsrA hochkonserviert ist und in vielen Bakterien wie *Yersinia* spp, *Escherichia* spp., *Legionella* spp, *Vibrio* spp und *Bacillus* spp. vorkommt. CsrA besitzt viele unterschiedliche, regulatorische Funktionen in Bezug auf Virulenz, Zentralstoffwechsel, Biofilmbildung, Zelladhärenz, Zellmorphologie und Motilität. Ein orthologes Pendant zu CsrA wurde später in dem pflanzenpathogenen *Pectobacterium*

Einleitung

carotovorum entdeckt und als „**R**egulator of secondary **m**etabolites A“ (RsmA) bezeichnet. Neben Enterobakterien und *Bacillus* spp. verfügen auch *Pseudomonaden* über das CsrA/**RsmA** System, wobei die primäre Regulation hier auf die Exkretion von Virulenzfaktoren, T3SS, Type 6 Sekretionssystem (T6SS) und die Ausbildung von Typ IV Pili ausgerichtet ist.

Die regulatorische Funktion des Csr/Rsm Systems wurde erstmals in *E. coli* in Bezug auf die Glykogensynthese charakterisiert. Es konnte jedoch kein Rückschluss auf die regulatorische Funktion des Systems auf Basis der Proteinsequenz geführt werden, da es keine Ähnlichkeit zu schon bekannten regulatorischen Systemen gab. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die regulatorische Funktion von CsrA auf die *glgC* mRNA, welche Teil der Glykogensynthese ist, nicht abhängig von der Promotorsequenz ist, sondern von einem überlappenden Bereich der 5' untranslatierten Region (5' UTR) mit der Ribosomenbindestelle (RBS) (Liu *et al.*, 1995). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CsrA die *glgC* mRNA destabilisiert (Liu *et al.*, 1995). Später konnte mittels eines CsrA EMSAs die direkte Bindung von CsrA an die 5'UTR im Bereich der RBS nachgewiesen werden. Dadurch wird die RBS für die Ribosomen blockiert und es konnte ermittelt werden, dass die regulatorische Funktion von CsrA in Bakterien post-transkriptional abläuft (Baker *et al.*, 2002).

CsrA ist ein kleines, ca. 9 kDa großes Protein, das als funktionelles Dimer an die mRNA bzw. die 5'UTR bestimmter Ziel mRNAs bindet. Jede Untereinheit von CsrA setzt sich aus fünf Tandem- β -Strängen (β 1-5), einer kurzen α -Helix (H1) und einem flexiblen C-Terminus zusammen (Gutierrez *et al.*, 2005; Heeb *et al.*, 2006). Die Dimerisierung der Monomere wird über die β 1 und β 2 Faltblattstrukturen vermittelt, wobei die Aminosäurereste essentiell für die direkte Interaktion mit der mRNA sind (Mercante *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2007). Eine repräsentative Abbildung des CsrA Dimers ist in **Abbildung 2** dargestellt.

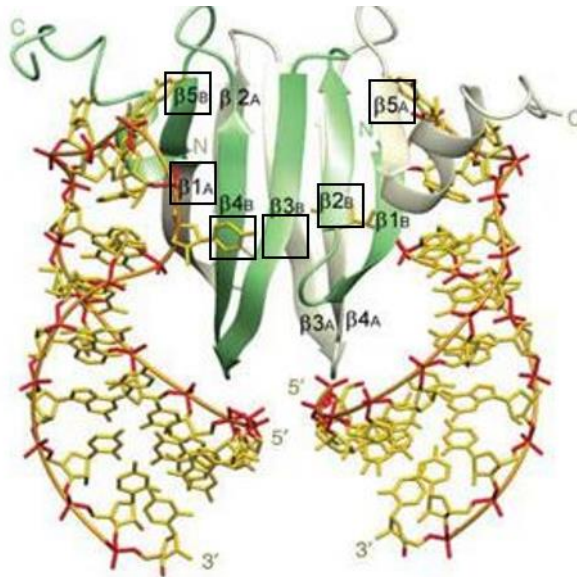


Abbildung 2: Struktur des CsrA-RNA Komplexes. Repräsentative Abbildung des CsrA-Homologs RsmE (grün/grau) in der Komplexbildung mit zwei RNA-Haarnadelstrukturen (gelb). Das CsrA Dimer beinhaltet zwei RNA-Binde-Domänen, die das Binden an zwei verschiedenen RNA GGA Motiven ermöglicht. Die RNAs sind an die stark positiv geladene Oberfläche gebunden, die auf den β -Faltblattstrukturen, der $\beta 1A / \beta 5B$ und der $\beta 1B / \beta 5A$ -Struktur, sowie auf den Regionen um die $\beta 3- \beta 4$ und $\beta 4- \beta 5$ Schleifen liegen (schwarzer Kasten). Diese Abbildung wurde aus Schubert *et al.*, 2007² modifiziert und entnommen.

Die regulatorische Funktion von CsrA basiert auf der hohen Affinität des Protein Dimers zu GGA Motiven, die in der 5' UTR der entsprechenden mRNA Zielsequenz liegt. Dabei ist die Konsensus-Sequenz: RUA CAR GGA UGU, wobei die Motive ACA und GGA komplett konserviert sind. Die meisten Zielsequenzen überschneiden sich oder liegen nahe an der Ribosomenbindestelle (RBS), AGGAGG in *E. coli*, sodass eine Bindung von CsrA den Zugang der Ribosomen zu der mRNA blockiert (Duss *et al.*, 2014). Dadurch wird die Proteinbiosynthese inhibiert und die mRNA zusätzlich in vielen Fällen schneller abgebaut (Vakulskas *et al.*, 2015). Weitere Regulationsmechanismen von CsrA wurden ebenso beschrieben. Eine Art der positiven Regulation von CsrA ist beispielsweise die Stabilisierung der mRNA Zielsequenz bzw. der Sekundärstruktur der mRNA durch die Bindung von CsrA an die Zielsequenz, wodurch eine Bindung der Ribosomen überhaupt erst ermöglicht wird (Mercante *et al.*, 2009; Vakulskas *et al.*, 2015). Weitere Bestandteile des Csr-Systems, sind die kleinen regulativen RNAs (sRNAs – engl. „small regulatory RNAs“), CsrB, CsrC und McaS in *E. coli*. Diese regulatorischen sRNAs bilden charakteristische Sekundärstrukturen durch

² Adaptiert und entnommen mit der Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd: “Nature Structural & Molecular Biology”, (Schubert *et al.*, 2007) copyright © 2007.

Einleitung

komplementäre Basenpaarung aus, wodurch sich Haarnadelstrukturen (engl. „Hairpin - Loops“) herausbilden, die über GGA Motive verfügen. Durch die hohe Affinität von CsrA an die GGA Motive fungieren somit die sRNAs als Bindekonkurrenten zur jeweiligen Zielsequenz auf der mRNA. Dabei sequestrieren die sRNAs CsrB/CsrC, das Regulatorprotein CsrA, und verhindern damit die Bindung an die Zielsequenz auf der potentiellen mRNA (Babitzke and Romeo, 2007; Majdalani *et al.*, 2005; Vogel, 2009). Ein vereinfachtes Modell der Regulation des Csr-Systems ist in **Abbildung 3** gezeigt. Zusätzlich wurde in *E. coli* eine weitere Komponente des Csr-Systems identifiziert. Das Protein CsrD destabilisiert die sRNAs CsrB und CsrC. Zwei funktionale Aminosäuresequenzen des Proteins GGDEF und EAL erleichtern dabei den Abbau der sRNAs durch die zelleigene RNase E (Suzuki *et al.*, 2006).

Neben der Regulation von CsrA durch die Anwesenheit von CsrB/CsrC, auto-reguliert CsrA seine eigene Translation und indirekt auch die Transkription. Somit trägt CsrA selbst zum „fine-tuning“ des Csr-Systems bei. Die Transkription von *csrA* ist von fünf Promotoren abhängig (σ^{70} oder σ^S). Die Transkription mit Hilfe des σ^S -abhängigen P3 Promotors wird indirekt durch CsrA aktiviert. Die 5'UTR des *csrA* Transkripts verfügt über vier CsrA Bindemotive, wobei hier die Bindung von CsrA eine Repression der Translation bewirkt (Yakhnin 2011, Vakulskas 2015).

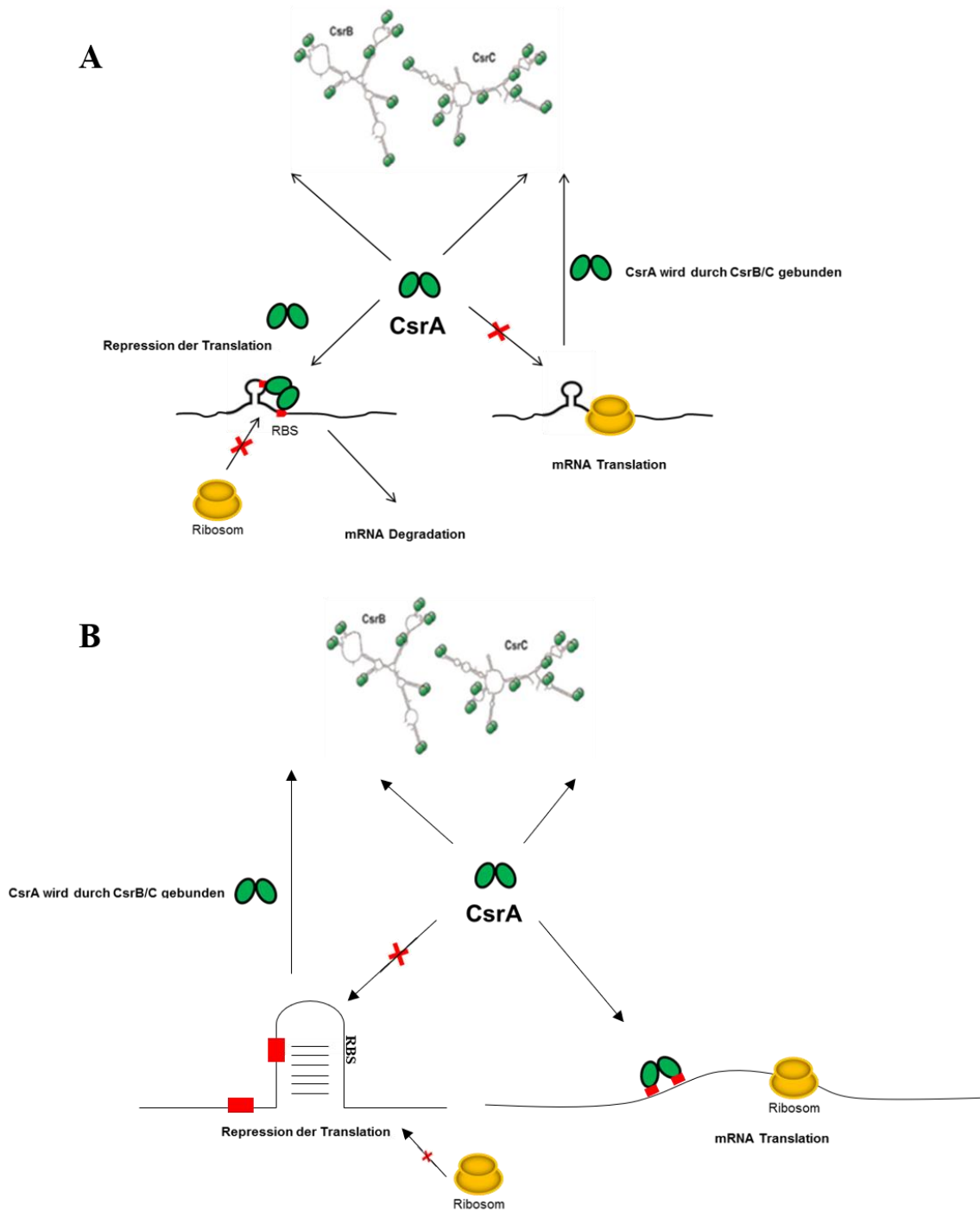


Abbildung 3: Beispielmechanismus des Csr-Systems: A (negative Regulation, z.B. *glgC*). Die beiden nicht-codierenden RNAs CsrB/CsrC sequestrieren CsrA und verhindern somit eine Bindung von CsrA auf der mRNA. Bindet CsrA an die Bindemotive (rot), wird die Ribosomenbindestelle blockiert und es findet keine Translation statt. Die mRNA wird oftmals zusätzlich schneller mittels RNase degradiert. B (positive Regulation, z.B. *moaA*). Die Sekundärstruktur der 5' UTR verhindert ein Binden der Ribosomen an die RBS. Durch das Binden von CsrA an die Bindemotive (rot) wird die Sekundärstruktur so verändert, dass ein Binden der Ribosomen an die RBS ermöglicht wird.

Einleitung

Dies sind nur wesentliche Aspekte der Regulation des Csr-Systems. Generell ist die Regulation hoch-komplex und wird an unterschiedlichen Stellen in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen wie auch der Wachstumsphase beeinflusst. Zusätzlich ist die Regulation co-abhängig von anderen Kreisläufen. Das BarA/UvrY Zweikomponentensystem (engl. „two component system“ – TCS) reguliert die Transkription der sRNAs CsrB und CsrC. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass CsrA ebenfalls indirekt die Expression der RNA Antagonisten CsrB/CsrC in einer negativen Rückkopplungsschleife reguliert (Suzuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003; Yakhnin *et al.*, 2011).

1.2.2 Bekannte Effekte des Csr-Systems in *Escherichia*

Das Csr-System ist ein komplexes, globales Regulon und hat direkt und indirekt auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie Virulenz, Motilität, Biofilmbildung sowie auf den Metabolismus Einfluss. In *E. coli* K-12 Stämmen ist die Wirkung von CsrA auf den Kohlenstoffmetabolismus relativ gut untersucht, aber aufgrund der Komplexität und stammspezifischen Unterschiede noch nicht im Detail verstanden. In *E. coli* K-12 Stämmen konnte das *csrA* Gen nicht deletiert werden, was darauf schließen lässt, dass CsrA für *E. coli* K-12 eine essentielle Funktion im Stoffwechsel erfüllt (Timmermans and Van Melder, 2009). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass CsrA in *E. coli* nicht essentiell für das Wachstum auf Pyruvat jedoch für das Wachstum auf Glucose und Glucose-6-Phosphat als einziger Kohlenstoffquelle ist. Dies ließ darauf schließen, dass die ersten Schritte der Glykolyse von CsrA reguliert werden, jedoch der Citratzyklus nicht beeinflusst wird (Timmermans and Van Melder, 2009). Die Ursache liegt in der differentiellen Regulation der Glykolyse bei der enzymatischen Umsetzung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose 1,6-Bisphosphat. Aufgrund der negativen Regulation der Phosphofruktokinase (*pfkA*), durch fehlende Stabilisierung der *pfkA* mRNA durch CsrA, kommt es zu einer Akkumulation von Fructose-6-Phosphat und gleichzeitig zu einem Mangel an allen folgenden Metaboliten in der Glykolyse (Morin *et al.*, 2016). Neben diesem Effekt auf die Glykolyse sind viele weitere Effekte, vor allem durch Transkriptomanalysen, auf den zentralen Kohlenstofffluss untersucht worden. So waren die Transkripte mehrerer Zuckeraufnahmesysteme und des Citratzyklus negativ durch CsrA beeinflusst, während die Transkripte für die Gluconeogenese in höherer Abundanz vorlagen (Potts *et al.*, 2017). In der Gesamtheit

Einleitung

konnten mehr als 200 Gene für verschiedene Kohlenstoffquellenaufnahmesysteme und andere Nährstoffe identifiziert werden, die direkt oder indirekt von CsrA beeinflusst werden und die Komplexität des Csr-Systems verdeutlichen. Ob diese Effekte jedoch durch eine direkte Regulation des Csr-Systems hervorgerufen werden oder die Folge von weitreichenden Veränderungen der Manipulation von CsrA sind, muss im Einzelnen geklärt werden (Potts *et al.*, 2017). In dem kommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 deutete eine Fluxom-Analyse zusätzlich eine regulative Rolle von CsrA im Entner-Doudoroff-Weg (ED) und im Pentose-Phosphat-Zyklus (PPP) bei einem Wachstum auf Gluconat an. Dies lässt darauf schließen, dass CsrA die Richtung des Kohlenstoffflusses in Abhängigkeit von der genutzten C-Quelle stark beeinflusst. Das bedeutet, dass die Effekte einer CsrA- Perturbation in Bezug auf den Kohlenstoffmetabolismus nicht allein auf die Regulation des Embden-Meyerhof-Parnas-Pathway (EMP) und der Gluconeogenese zurückzuführen sind. In Anbetracht dessen, dass die primären C-Quellen im natürlichen Habitat von *E. coli* hauptsächlich aus Zuckersäuren, vor allem Gluconat, bestehen, stellt dies die Wichtigkeit des Csr-Systems für die Kolonisierung im Dünndarm und Dickdarm von pathogenen und kommensalen *E. coli* Stämmen in den Vordergrund (Revelles *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu dem kommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 und dem K-12 Stamm MG1655 ist eine Perturbation von CsrA in dem enteropathogenen *E. coli* Stamm EPEC E2348/69 nicht letal für das Wachstum auf Glucose, scheint aber in Bezug auf die Regulation der Glykolyse und der starken Überproduktion von Glykogen zu sehr ähnlichen Effekten auf den Primärmetabolismus zu führen (Bhatt *et al.*, 2009; Morin *et al.*, 2016; Revelles *et al.*, 2013). Neben diesen Effekten konnte gezeigt werden, dass CsrA an der Regulation der Virulenzgene in EPEC eine entscheidende Rolle spielt. So war der von Bhatt *et al.* verwendete $\Delta csrA$ Teildeletionsstamm in EPEC E2348/69 nicht im Wachstum gehemmt, wies aber eine deutlich reduzierte Fähigkeit auf in vitro an die Zielzellen zu binden und Aktin-Pedastals auszubilden. Zusätzlich wies diese Mutante eine deutliche Reduktion in der Sekretion der Translokatoren EspA, EspB und EspD (**Abbildung 1**) sowie des Effektors Tir auf (Bhatt *et al.*, 2009). Entsprechend waren auch auf Transkriptebene die Konzentrationen der entsprechenden Transkripte (*sepL*, *espADB*) in der Mutante reduziert. Auf Regulationsebene konnte jedoch keine direkte Regulation von CsrA auf den Masterregulator der LEE-PAI (Locus of enterocyte effacement Pathogenicity island) *ler* nachgewiesen werden, aber eine direkte Bindung

Einleitung

von CsrA an den LEE4 mRNA- „Leader“ sowie eine indirekte Regulation von *escD* beobachtet werden, was die Effekte auf die Translokatoren erklärt. Die LEE4-Gene sowie *escD* codieren für wichtige Translokatoren des T3SS und spielen eine zentrale Rolle in der Virulenz von EPEC (Bhatt *et al.*, 2009). Zusammenfassend führt eine Deletion von CsrA in EPEC zu einer starken Reduktion der Virulenz, die über die verminderte Fähigkeit der Anheftung und Ausbildung von Aktin Pedastals an die Zielzellen und der verringerten Konzentration der Translokatoren induziert wird. Interessanterweise führt eine „Multicopy“ Überexpression von CsrA in EPEC ebenfalls zu einer Repression von LEE4 sowie von LEE2, LEE5 und *escD*. Dies geschieht allerdings wahrscheinlich über eine direkte Regulation des Transkriptlevels von *grlRA*, welches positiv auf die Transkription von *ler* und damit auf die LEE Gene wirkt (Bhatt *et al.*, 2009). Dies bedeutet das CsrA die Transkription der LEE-PAI Gene dosisabhängig reguliert.

Neben der Virulenz reguliert CsrA auch die Motilitätsgene des *flhDC* Operons in EPEC, was dazu führt, dass $\Delta csrA$ Mutanten nicht motil sind (Bhatt *et al.*, 2009). Ein weiterer Effekt von CsrA ist die Regulation der Tryptophanase *tnaA* in EPEC, welche für die Virulenz in *Caenorhabditis elegans* eine wichtige Rolle spielt (Bhatt *et al.*, 2011). Auch in uropathogenen *E. coli* deutet sich eine funktionelle Rolle von CsrA und des BarA/UvrY TCS Systems für die Virulenz im Mausmodell an, wenn auch die genauen Mechanismen noch ungeklärt sind. Anders als EPEC verfügt UPEC als ExPEC, der intra- und extrazellulär die Zellen des Urogenitaltrakts infiziert, über eine ganze Reihe weiterer Virulenzfaktoren wie Toxine und Fimbrien, die in Abhängigkeit vom Csr-System reguliert sein könnten (Herren *et al.*, 2006; Palaniyandi *et al.*, 2012; Vakulskas *et al.*, 2015).

Nach wie vor basieren die meisten Studien über die Auswirkungen von CsrA auf den bakteriellen Stoffwechsel bzw. der Interaktion mit unterschiedlichen Regelkreisläufen weitgehend auf Analysen des Transkriptom, wohingegen ausführliche Metabolomanalysen oder Multi-Omics'-Analysen nur vereinzelt angewandt wurden. Metabolomstudien zum Einfluss von CsrA bzw. einer Deletion von *csrA* wurden im Detail von Morin *et al.* in Bezug auf die Glykolyse untersucht. Der verwendete $\Delta csrA$ *E. coli* K-12 Teildeletionsstamm wies erhöhte Metabolit Konzentrationen für die Glykogen-Vorläufer Metaboliten ADP-Glucose, sowie für die Intermediate des oberen Teils des EMP-Weges, Glucose-6-Phosphat, sowie Fructose-6-

Einleitung

Phosphat auf (Morin *et al.*, 2016). Auch Metaboliten aus dem PPP wiesen eine Erhöhung in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf (6-Phosphogluconolacton, Sedoheptulose-7-Phosphat, Ribose-5-Phosphat). Im Gegensatz zu den Intermediaten aus dem oberen Teil der Glykolyse, waren Metaboliten im unteren Teil der Glykolyse (Fructose 1,6-bisphosphat, 2,3 Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat) und Fumarat aus dem Citratcyclus jedoch nicht differentiell reguliert (Morin *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu, konnte in einer Studie von McKee *et al.* gezeigt werden, dass eine Repression von CsrA durch Überexpression von CsrB weitreichende Effekte auf auch auf die Intermediate der unteren Glykolyse hat. So waren unter diesen Bedingungen, auch die Intermediate Glycerol-3-Phosphat, 2 Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat in deutlich höherer Konzentration detektierbar als im Wildtyp (McKee *et al.*, 2012). Auch die Intermediate des Citratzyklus Oxalacetat, Malat, Fumarat und Succinat waren erhöht, wohingegen Isocitrat/Citrat und Alphaketoglutarat nicht durch eine Überexpression von CsrB beeinflusst wurden (McKee *et al.*, 2012).

Der Großteil der Erkenntnisse über die Funktionsweise des Csr-Systems, wurde jedoch aus verschiedenen Transkriptomanalysen abgeleitet, ohne die Effekte auf die Metabolitenkonzentrationen zu berücksichtigen. Aus diesen Analysen ist bekannt, dass die Regulation von CsrA sehr weitreichende Folgen auf die unterschiedlichsten zellulären Prozesse hat. Dazu zählen zusätzlich Gene zur Aufrechterhaltung der Zellhüllintegrität (via *rseA* und der RpoE Signalkaskade), der Eisenregulation und -aufnahme (Mechanismus nicht bekannt), sowie für andere Regulatorproteinen (FliA, SoxS, Lrp, Cra). Zusammengefasst beeinflusst CsrA die Expression von 87 Transkriptionsregulatoren und elf Sensorinasen, die wiederum das komplette Transkriptom von *E. coli* beeinflussen (Potts *et al.*, 2017; Vakulskas *et al.*, 2015). Diese diversen Effekte von CsrA demonstrieren, dass CsrA eine Schlüsselfunktion bei der Bestimmung der bakteriellen Überlebensstrategie spielt, die eine umfassende Umverteilung von genetischen und metabolischen Ressourcen erfordert (Potts *et al.*, 2017; Romeo *et al.*, 2013).

1.3 Ansätze der Systembiologie

Unter Systembiologie versteht man das Studium der Gesamtheit an Strukturen, sowie die Zusammensetzung und Dynamik eines biologischen Systems, wie z.B. einer bakteriellen Zelle. Dabei haben sich unterschiedliche „omics“-Technologien“ wie Genomik, Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik etabliert, um die komplexen Zusammenhänge eines biologischen Systems und deren Wechselwirkung untereinander zu verstehen. Zusammen mit ergänzenden Experimenten, mathematisch/statistischen Analysen und Prozessmodellierungen dient die Systembiologie der Findung und Verbesserung von Hypothesen und verbessert das Verständnis biologischer Abläufe (Kell, 2004, 2006).

Das Verständnis von lebenden Organismen auf einem molekularen Level mit Hilfe der „omics“ Technologien ist ein relativ neuer Ansatz, wird aber in Zukunft eine Schlüsselrolle in der Wissenschaft darstellen. Einen Überblick über die sogenannte „omics“ Kaskade ist in **Abbildung 4** dargestellt.

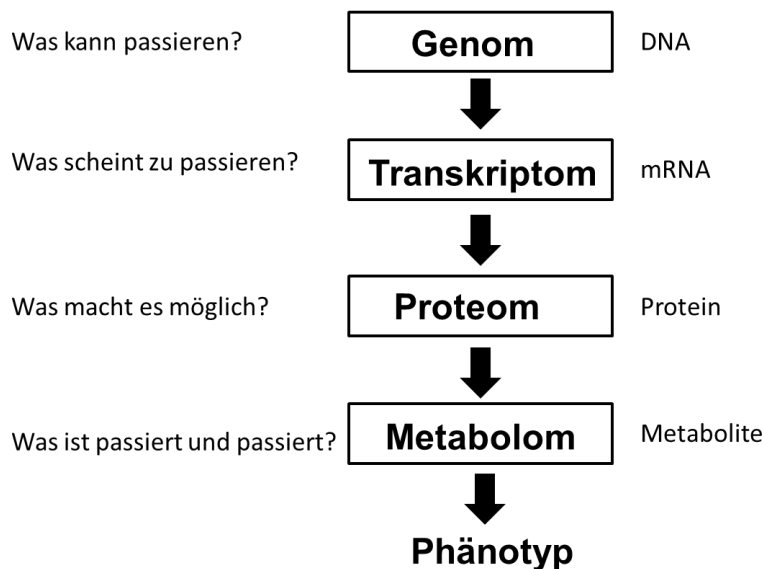


Abbildung 4: Die "Omics" Kaskade der Systembiologie. Die „Omics“ Kaskade beinhaltet die Hauptverfahren der Systembiologie, die es theoretisch ermöglichen die Zellantwort unter einer definierten Testbedingung vorherzusagen. Diese Abbildung wurde modifiziert und übersetzt von Dettmer *et al.*, 2007

Dabei gibt die Genominformation die essentielle Basisinformation über die genetischen Möglichkeiten des Organismus an. Mit Hilfe von Transkriptomanalysen kann die direkte Reaktion des Organismus bzw. die Expressionslevels der Gene in

Einleitung

verschiedenen Zeitmustern, je nach Aufbau des Experiments, dargestellt werden. Die Veränderungen im Transkriptom sind dabei der erste Schritt zum Verständnis der Reaktion von einem Organismus auf sich ändernde Umweltbedingungen oder der Perturbation von Genen und Regulatoren (Sorek and Cossart, 2010). Durch Kombination mit Proteomik wird zusätzlich die Regulation auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene mit einbezogen und gibt dabei den „Ist-Zustand“ wieder, ohne jedoch die metabolische Antwort genau vorhersagen zu können. Genauere Beschreibung der Methodik und quantitative Ansätze von Proteom-MS Analytik sind in folgenden Reviews beschrieben: Bantscheff, 2012; Righetti *et al.*, 2004; Schirle *et al.*, 2012.

Das Metabolom ist der letzte Schritt in der Systembiologie-Kaskade, die die Effekte des Proteoms auf die Metaboliten untersucht (Kell, 2006). Sie sind allerdings stark dynamisch aufgrund der schnellen Adaption der Metabolitenlevel an unterschiedliche Einflüsse (z.B. Umweltbedingungen, Antibiotika-Behandlung etc.). Die Veränderungen im Metabolom sind dabei um einiges schneller als die Reaktionen auf dem Gen- und Transkriptlevel. Erschwerend für die Analyse und Identifikation ist die strukturelle und physikochemische Vielseitigkeit der Analyten, sowie die einzelnen stark unterschiedlichen Charakteristika und Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Metaboliten unter unterschiedlichen Bedingungen (Dettmer *et al.*, 2007).

In dieser Studie wird der globale Einfluss einer CsrA-Perturbation im EPEC Stamm E2348/69 auf das Metabolom untersucht. Zusammen mit einer kombinierten Transkriptomanalyse aus dem gleichen Probenbatch liefert dieser systembiologische Ansatz ein übergreifendes Bild der Stoffwechselfvorgänge und Transkriptionslandschaft von EPEC in Reaktion auf den posttranskriptionellen Regulator CsrA. Die grundlegende Methodik der Metabolom- und Transkriptomanalyse wird im Folgenden beschrieben.

1.4 Metabolomanalyse

1.4.1 Einführung in Metabolomics

Die grundlegende Fähigkeit eines Organismus/Gewebes zum Transport und zur Aufnahme von Nährstoffen sowie die anschließende Umwandlung mittels enzymatischer Reaktionen in Energie, Baustoffe und Reproduktion wird Stoffwechsel oder Metabolismus genannt. Die in diesen chemischen Reaktionen umgewandelten Stoffwechselkomponenten werden als Metaboliten bzw. in ihrer Gesamtheit als Metabolom bezeichnet. Der Ursprung der Metabolomforschung liegt in der Erforschung von Sekundärmetaboliten in Pflanzen. In der Gesamtheit wird die Anzahl der Metaboliten in Pflanzen auf 100.000 – 200.000 angegeben (Hall, 2006; Weckwerth, 2003). Dabei wurde der Begriff „Metabonomics“ das erste Mal von Nicholson *et al.* in der Literatur beschrieben (Nicholson *et al.*, 1999). In Mikroorganismen wie *E. coli* wurde aus bioinformatischen Genomanalysen von bis zu ~ 800 verschiedenen Stoffwechselintermediaten/Metaboliten ausgegangen (Hall *et al.*, 2002). Diese geringe Zahl wurde auf bis zu 1600 Metabolite in der *E. coli* Metabolomdatenbank (ECMDB) aus verschiedenen Studien erweitert (Guo *et al.*, 2013). Heute werden Metabolomikansätze auf Mikroorganismen, Gewebe, Mikrobiome in Mensch und Tier ausgeweitet und stellen eine Zukunfts- und Schlüsseltechnologie zum Verständnis von komplexen Abläufen auf der Ebene des Stoffwechsels bzw. der Adaptation dar (Cui *et al.*, 2018; Rochfort, 2005). Aufgrund der hohen Komplexität des Metaboloms sowie der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Metaboliten ist es nicht möglich, die Gesamtheit der Metaboliten einer Probe komplett abzudecken. Anstelle dessen wird vielfach eine zielgerichtete Analyse durchgeführt, um die Metaboliten einzelner Stoffwechselwege oder bestimmter Stoffklassen zu detektieren. Um ein möglichst großes Spektrum des Metaboloms abzudecken, ist es nötig, verschiedene Extraktions-, Trenn- und Detektionsverfahren zu nutzen. Zusätzlich wird vielfach „Metabolic footprinting“ genutzt, um nicht jeden einzelnen Metaboliten zu erfassen, sondern um Muster oder Fingerabdrücke zwischen verschiedenen Zuständen zu vergleichen. Dazu gezählt wird bspw. auch die Erfassung der sekretierten Metaboliten (Exometabolom) oder aus dem Medium aufgenommene Metaboliten (Fiehn, 2002; Kell *et al.*, 2005). Die Identifikation der Metaboliten wird dabei wahlweise mit hochauflösender Massenspektrometrie (MS) oder auch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) in

Kombination mit Auswertesoftware und Datenbanken durchgeführt (Scalbert *et al.*, 2009).

Metaboliten können in Primärmetaboliten (z.B. Zucker, Aminosäuren, Lipide), die essentiell für das Überleben des Organismus sind und damit Teil des Zentralstoffwechsels (Glykolyse, Citratzyklus, Pentosephosphatweg etc.) oder Sekundärmetaboliten eingeteilt werden. Die Sekundärmetaboliten bieten einen Selektionsvorteil unter bestimmten Umweltbedingungen, der z.B. durch die Expression von Virulenzfaktoren oder die Bildung von antibiotischen Stoffen erzielt werden kann. Dabei unterliegt der Stoffwechsel einer ständigen Dynamik aus katabolen und anabolen Prozessen. Bei einer Analyse des Metaboloms erhält man somit eine Momentaufnahme, die sich im Allgemeinen gut mit dem Phänotyp korrelieren lässt. Zusammen mit anderen systembiologischen Ansätzen kann so ein globales Bild von zellulären Prozessen dargestellt werden (Zhang *et al.*, 2010).

1.4.2 Probenvorbereitung – Quenching und Metaboliten-Extraktion

Zur Analyse des Metaboloms ist ein schnelles Abstoppen des Metabolismus („Quenching“) nötig, da die Umsatzraten von Hochenergieintermediaten wie Zuckerphosphaten oder Energieträgern wie ATP nur wenige Sekunden betragen (de Koning and van Dam, 1992; Weibel *et al.*, 1974). Im ersten Schritt wird in der Regel das Wachstumsmedium via Zentrifugation (Borner *et al.*, 2007) oder Sterilfiltration (Bolten *et al.*, 2007) entfernt. Anschließend erfolgt das Abstoppen der enzymatischen Reaktionen durch Hitze, Kälte oder Zugabe eines Lösungsmittels. „Quenching Methoden“ sind nicht universell und müssen für die jeweilige Probe und Zielmetaboliten optimiert werden (Mashego *et al.*, 2007a; Mashego *et al.*, 2007b). Die Methode ist dabei immer ein Kompromiss aus Anwendbarkeit und Effektivität. Gängige Aufarbeitungsmethoden sind eine Kombination aus „Quenching“ und Zellyse, die den ersten Schritt der Metaboliten-Extraktion darstellt. Für *E. coli* hat sich ein Vermischen der Zellsuspension im Medium mit 60 % eiskaltem Methanol in gleichen Volumenanteilen als effektiv erwiesen und war damit klassischen Extraktionen mit vorhergehender Zentrifugation und Zugabe von Lösungsmitteln überlegen (Winder *et al.*, 2008). Der Vorteil gegenüber alternativen „Quenching Methoden“ liegt im sehr schnellen Abstoppen des Metabolismus durch das kalte Methanol. Dabei ist die

Einleitung

Konzentration des Methanols nicht zu hoch (final 30 %), um eine vorzeitige Lyse und somit ein „Metabolite-Leakage“ der Zellen zu verhindern.

Nach dem „Quenchen“ werden die Zellen chemisch oder mechanisch lysiert, was eine Freisetzung der Metaboliten in das Lösungsmittel bewirkt. Gängige Extraktionsmethoden für Gram-negative Bakterien sind eine Ultraschallbehandlung der Zellen, Schockfrieren in flüssigem Stickstoff oder die Zugabe von Methanol, Ethanol und Acetonitril zu den Zellpellets, was eine sofortige Lyse der Zellen bewirkt (Yanes *et al.*, 2011). Die Lösungsmittel sollten dabei weder physikalisch noch chemisch mit den Metaboliten reagieren, um eine nahezu vollständige Momentaufnahme des Metaboloms zu gewährleisten. Ein möglichst breites Spektrum von polaren und unpolaren Metaboliten lässt sich mit Methanol-Wasser-Extraktionsgemischen erzielen, wohingegen für Lipidomstudien Chloroform-Methanol-Extraktionslösungen effektiver sind (Ivanisevic *et al.*, 2013; Yanes *et al.*, 2011).

1.4.3 Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie

LC-MS basierte Metabolomik ist eine etablierte Methode zur Analyse von kleinen Molekülen (typischerweise > 1500 Da). Sie findet Anwendung in der Biomarkersuche (Nicholson and Lindon, 2008; Zhao *et al.*, 2016), der Mikrobiologie (Newgard *et al.*, 2009; Rubert *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2016) und für metabolische Erkrankungen (Mardinoglu *et al.*, 2017; Newgard *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2018). Ein großer Vorteil gegenüber Gaschromatographie-MS (GC-MS) basierten Metabolommethoden ist die hohe Vielseitigkeit, sowie die Bandbreite an großen Metaboliten, die detektiert werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass Derivatisierungsreaktionen wegfallen, was eine Analyse von thermolabilen- oder hydrolyseanfälligen Substanzen ermöglicht (Cui *et al.*, 2018). In „non-targeted“ Metabolomstudien liegt der Fokus auf einem möglichst breiten Spektrum sowie darauf, möglichst eine hohe Anzahl verschiedenster Metaboliten aufzutrennen und zu identifizieren. Aufgrund der hohen Vielseitigkeit und Effizienz zur Trennung einer hohen Bandbreite von organischen Verbindungen hat sich die „reverse Phase“ Chromatographie mittels C18 (RP-C18) Säule für die meisten Metabolomanwendungen etabliert. Alternativ kommt die „hydrophilic interaction liquid chromatography“ (HILIC) vor allem für biologische Proben mit einer großen Anzahl an hydrophilen

Einleitung

Metaboliten (Zucker, Zuckersäuren, Nukleosiden etc.) zum Einsatz, da die Trennung für diese Metaboliten mittels RP-18 nicht optimal ist, da die Retentionszeiten zu gering sind oder zu nah beieinander liegen (Cui *et al.*, 2018).

Im Zuge dieser Arbeit wurde für den „untargeted“ Metabolomansatz eine polare Extraktion mittels RP-C18 bzw. für den Lipidomansatz eine unpolare Extraktion mittels RP-C8, getrennt. Als stationäre Phase fungiert ein modifiziertes Kieselgel, an das hydrophobe Alkylketten (Octylsilan (C8), Octadecylsilan (C18)) kovalent gebunden sind. Die Trennung beruht somit auf hydrophoben Wechselwirkungen, was dazu führt, dass apolare Analyten stärker retardiert werden als polare Analyten. C18-RP Chromatographie kombiniert mit ESI-MS/MS (Elektrospray Ionisation) ist eine gut etablierte Methode für *E. coli* Metabolomstudien (Issaq *et al.*, 2008; Yanes *et al.*, 2011). Für Lipidomproben gelten sowohl C8-RP Säulen wie auch C18-RP Säulen als Gold-Standard, während HILIC und Normalphasechromatographie nur vereinzelt genutzt werden (Cajka and Fiehn, 2014). Für die in *E. coli* hauptsächlich vorkommenden Phosphatidylethanolamin- (PE) und Phosphatidylglycerol- (PG) Lipide sind ausführliche Lipidomstudien mittels RP-C18 (Oursel *et al.*, 2007) wie auch RP-C8 (Triebel *et al.*, 2017) durchgeführt worden.

1.4.4 Massenspektrometrie und Ionisierung

Für Metabolomanalysen sind verschiedene Typen von Massenspektrometern, die sich in den genutzten Ionenquellen und Detektoren (Quadrupol, Ionenfalle, „Time of flight“) unterscheiden, im Einsatz. Die am häufigsten verwendeten Ionisierungsmethoden sind: Elektronenstoß-Ionisierung (EI), Elektro-Spray-Ionisierung (ESI) sowie „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI). Für GC-Anwendungen wird hauptsächlich EI zur Ionisierung genutzt. Die generierten Spektren enthalten viele Fragmente mit hoch-reproduzierbaren Mustern, was einen Abgleich mit der Metaboliten Datenbanken erheblich vereinfacht. ESI ist die in dieser Studie genutzte Ionisierungsmethode für die LC-MS und MS/MS Messungen. Die Ionen werden erzeugt, indem die Analyten über eine Kapillare, die unter Hochspannung steht, geleitet werden (**Abbildung 5 A**). Die hohe Spannung zwischen Kapillare und Kammerwand führt zu der Bildung geladener Tröpfchen und den Übergang in die Gasphase (**Abbildung 5 A und B**). Die geladenen Tröpfchen werden über eine geheizte

Einleitung

Transferkapillare zur Vorvakuumstufe geleitet. Anschließend werden die Tröpfchen in der Vorvakuum- und der nachfolgenden Hochvakuumstufe aufgeheizt, und haben beim Erreichen der Öffnung zum Massenanalysator durch vollständige Desolvatisierung freie Ionen gebildet (**Abbildung 5 B**).

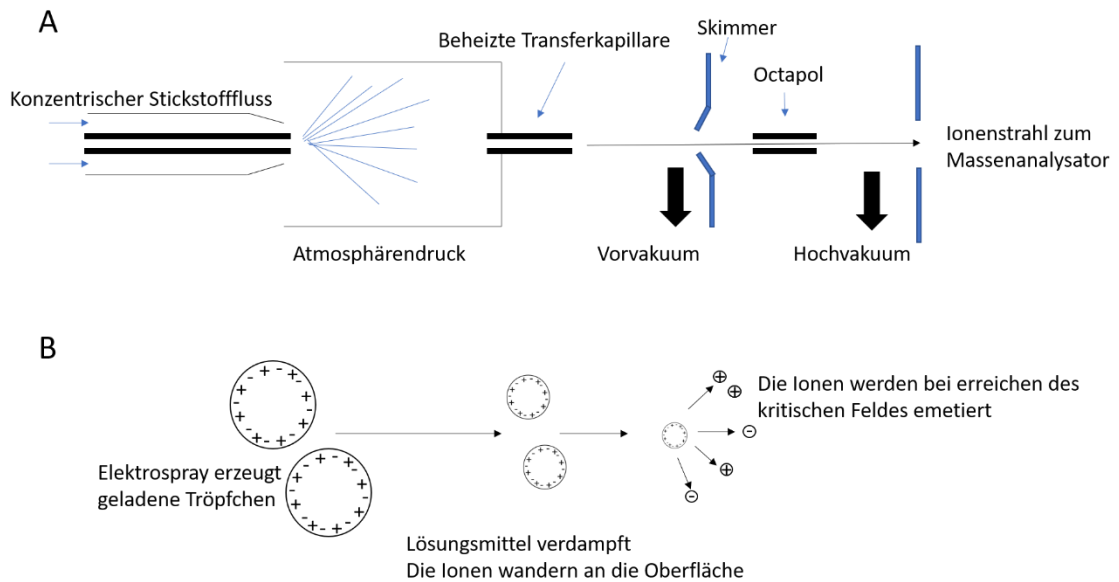


Abbildung 5: A: Schematischer Aufbau einer Elektrospray Ionisierungsquelle. B: Mechanismus der Ionenfreisetzung. Es ist die Bildung geladener Tröpfchen und der Übergang in die Gasphase bei der Elektrospray Ionisierung schematisch dargestellt.

Der Mechanismus der Ionenfreisetzung basiert auf der Anreicherung von positiven Ladungsträgern an der Flüssigkeitsoberfläche. Es bildet sich ein sogenannter Taylor-Kegel, der aus der Kapillare austritt. Durch Verdampfung des Lösungsmittels wird die Oberfläche der Tröpfchen verkleinert, sodass die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tröpfchenoberfläche vergrößert wird. Ab einem kritischen Limit zerfallen die Tröpfchen aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladungen. Dieser Vorgang wird als Coulomb-Explosion bezeichnet. Dies führt zur Bildung freier Ionen in der Gasphase. Durch die Polarität der angelegten Spannung an der Kapillare können entweder positiv oder negativ geladene Ionen erzeugt werden (**Abbildung 5 B**).

Die Ionen werden anschließend in den Massenanalysator abgegeben. ESI kann sowohl im positiv- wie auch im negativ-Ionenmodus durchgeführt werden, wodurch eine bessere Abdeckung bei Metabolomanalysen erreicht werden kann (Dettmer *et al.*, 2007). Für MS-Messungen wird der primäre Massenfilter Q1 nicht als Analysator genutzt, sondern im r.f. Modus betrieben, sodass er funktional nur als

Einleitung

Transmissionselement dient. Der Ionenstrahl wird in den zweiten Analysator (TOF) fokussiert. Im Massenanalysator werden die Ionen anhand des Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) sortiert. Der Detektor liefert die Daten für die Berechnung der Abundanz der einzelnen Ionen.

Poolproben wurden im Auto-MS/MS Mode vermessen. Die Fragmentierung wird durch die Kollision der abundantesten Ionen mit einem neutralen Gas (z.B. Argon) in einer Kollisionszelle Q2 erreicht. Das in dieser Studie genutzte Massenspektrometer ist ein „Quadropole time-of-flight“ Massenspektrometer (QqTOF). Bei dieser Hybridform aus Quadropol-MS und TOF-MS ist Q3 (entsprechend bei einem TripleQuad) durch ein TOF Flugrohr ersetzt. Der erste Quadropol Q1 ist der primäre m/z Massenfilter, der nur das Ziel-Mutterionen selektiert. Q2 bildet die Stoßzelle. Die Produktionen werden entsprechend im zweiten Analysator (TOF) analysiert. Dadurch entsteht ein MS/MS Spektrum das alle Fragmentationen aufzeigt, die auf das zuvor selektierte Vorläuferion zurückgehen. Im TOF-Flugrohr findet die Bestimmung des m/z Verhältnisses durch Messung der Flugzeit der Fragmentationen statt (**Abbildung 6**).

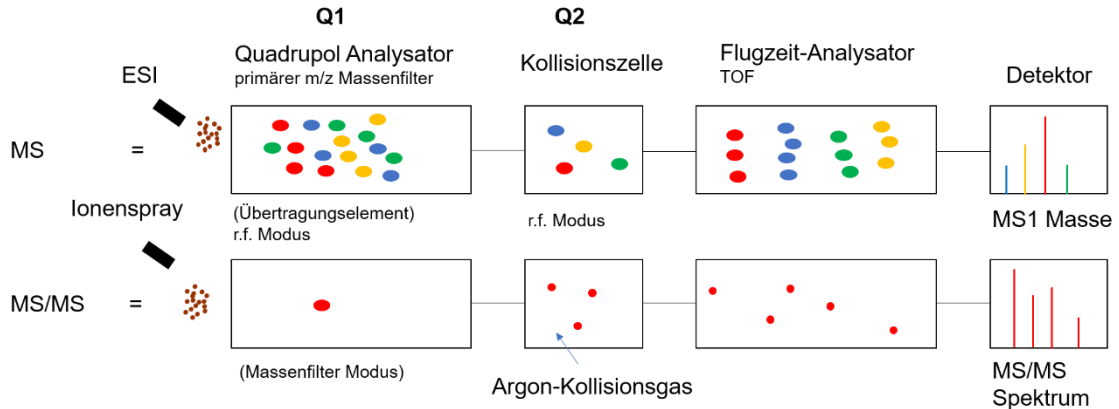


Abbildung 6: Funktionsweise eines ESI-QqTOF in MS (oben) bzw. MS/MS (unten) Modus.

1.4.5 Gaschromatographie – Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie in Verbindung mit Massenspektrometrie (GC-MS) ist zusammen mit der HPLC-MS eine der häufigsten in der Metabolomanalyse verwendete Methodik (Straczynski and Ligor, 2018). Flüchtige Komponenten lassen sich dabei direkt via sogenannter „Headspace“ Analytik in einer GC-MS messen. Für nicht flüchtige Substanzen muss zuerst eine Derivatisierung der Metaboliten durchgeführt

Einleitung

werden, um diese in einem Injektor vaporisieren zu können und anschließend über die GC-Säule zu trennen. Die verwendeten Säulen verfügen über eine stationäre Phase und eine mobile Phase mit einem Trägergas, z.B. Helium (Li *et al.*, 2015).

Die Derivatisierungsreaktion wird häufig mit MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamide) oder BSTFA (N, O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) durchgeführt. Es findet eine Silylierung der funktionellen Gruppen statt, die es ermöglicht, die Metaboliten besser in die Gasphase zu überführen. Die Wahl der Derivatisierungsreagenz beeinflusst die Reproduzierbarkeit und Detektion der Analyten (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Im Zuge dieser Studie wurde zuerst eine Methoxaminierung durchgeführt und anschließend mit MSTFA derivatisiert. Methoxaminierung (**Abbildung 7**) hilft Zucker in der offenen Ringform zu halten und stabilisiert Alpha-Ketonsäuren. Die Zielgruppen der anschließenden Silylierungsreaktion (**Abbildung 7**) mit MSTFA sind Hydroxy-Gruppen, Carboxylate, Amine, Amide und Thiole. Die Reaktion ist empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und muss daher unter Ausschluss von Wasser durchgeführt werden. Eine Derivatisierung mit MSTFA ist besonders geeignet für Kohlenhydratverbindungen, da diese über eine hohe Anzahl an Hydroxygruppen verfügen.

Mit Hilfe von GC-MS Metabolomik gelingt auch die Analyse von Lipiden bzw. deren Derivate, den Fettsäuren. Eine direkte Überführung von Lipiden in die Gasphase ist aufgrund der hohen Masse und des daraus resultierenden hohen Verdampfungspunktes nicht möglich, weshalb eine sogenannte FAME („Fatty acid Methyl ester“) Derivatisierung durchgeführt wird (**Abbildung 7**). Die Derivatisierung der Fettsäuren der Lipide (z.B. der Membranlipidschicht) wird dabei durch Umestern mit Methanol erreicht. Als Katalysator für die FAME Derivatisierung wird eine starke Säure wie BF_3 benötigt. Glycerin wird dabei durch Methanol ersetzt, sodass als Endprodukte Glycerin und FAMES entstehen (Quehenberger *et al.*, 2011).

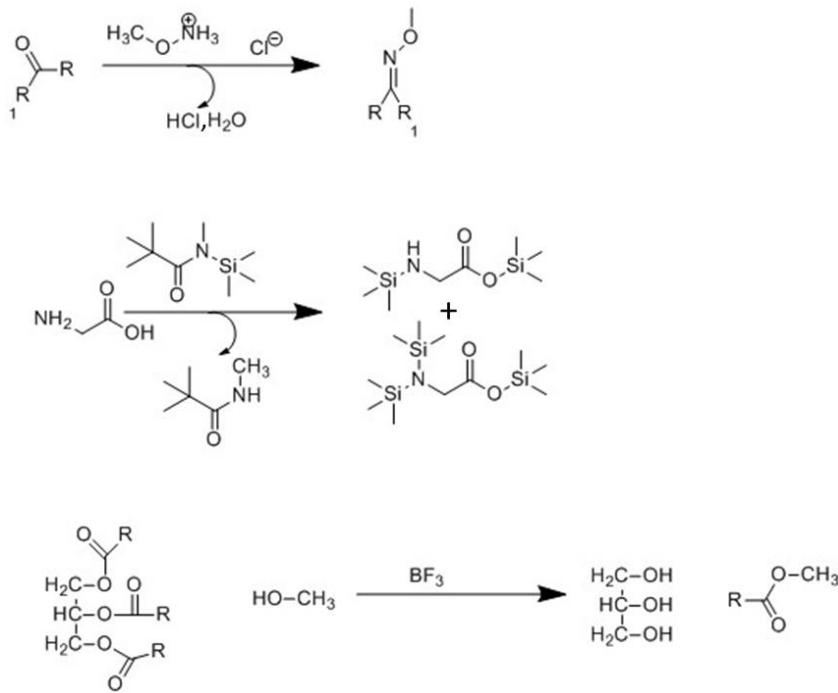


Abbildung 7: Derivatisierungsreaktionen, die in dieser Arbeit angewandt wurden. Im ersten Schritt wurden die Aldehyd- und Ketogruppen methoxaminiert. Dieser Schritt bewirkt zusätzlich, dass Zuckerverbindungen in der offenen Ringform gehalten werden. In der nächsten Reaktion fand eine Sylierung der Metaboliten statt. Dadurch fand eine thermische Stabilisierung der Reaktionsprodukte statt sowie eine Veränderung der Volatilität. Für Lipidproben wurde eine FAME Reaktion durchgeführt. Es fand eine Umesterung der Lipide mit Methanol unter stark sauren Bedingungen statt. Der Alkohol Glycerin wurde dabei gegen Methanol ausgetauscht. Als Katalysator der Reaktion wurde Bortrifluorid verwendet.

Der große Vorteil von GC-MS gegenüber von HPLC-MS ist die hohe Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen GC-MS Messungen bei Verwendung der standardisierten Elektronenionisierungsenergie von 70 eV (Li *et al.*, 2015). Dies ermöglicht einen Abgleich der Messdaten mit kommerziell verfügbaren MS-Spektren-Bibliotheken und erleichtert die Identifizierung der Metaboliten erheblich. Ein Nachteil von GC-MS Metabolomik gegenüber LC-MS Metabolomik ist, dass nicht flüchtige Metaboliten, die trotz Derivatisierung nicht in die Gasphase übertragen werden können, nicht per GC-MS detektiert werden können. Die Chromatographie und Analyse von komplexen Proben (z.B. Zelllysate) kann durch die Kopplung von GC x GC (Jojima *et al.*, 2010) und Verwendung eines TOF-MS weiter verbessert werden (Kell, 2004). Zusammenfassend ist die GC-MS Methodik eine Methode, die eine verlässliche Identifizierung von Metaboliten gewährleistet und auch eine Annotation von unbekanntem Metaboliten ermöglicht (Straczynski and Ligor, 2018).

1.4.6 Metabolom-Datenauswertung LC-MS

LC-MS basierte Analysetechniken sind aufgrund ihrer hohen Sensitivität eine häufig genutzte Methode um biologische Phänomene auf Metabolomebene zu charakterisieren (Franceschi *et al.*, 2014). Die generierten Rohdaten beinhalten die Informationen, die durch einen „Peak-picking“ (auch „feature detection“) Algorithmus ein „metabolomic feature“, definieren. Ein „feature“ lässt sich dabei als ein Ionensignal mit spezifischer m/z , Retentionszeit und Peakfläche beschreiben (Varghese *et al.* 2012). Eine biologische Probe kann tausende von Metaboliten enthalten, die sich stark in chemischer Struktur, Eigenschaft und Konzentration unterscheiden (Cajka and Fiehn, 2016). Die Anzahl der detektierten „features“ einer einzigen Probe wird zum Teil > 20.000 „features“ angegeben (Mahieu and Patti, 2017). Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der „features“ nicht der theoretischen Anzahl der Metaboliten entspricht, da unter anderem unterschiedliche Spezies eines Metaboliten (Addukte, Isotope, Neutralverluste) unterschiedliche m/z Werte haben. Die Identifikation von „features“ ist die größte Herausforderung innerhalb der Metabolomik. Die effektivste Art der Identifizierung ist ein Abgleich der genauen Masse (bzw. des m/z Wertes), der Retentionszeit sowie des charakteristischen Fragmentierungsmusters im MS2 Modus des Analyten mit einem auf der gleichen LC-MS gemessenen Standards (Chaleckis *et al.*, 2018). Im Allgemeinen wird die Identifizierung in 4 Level unterteilt. Eine Identifikation mit Level 1 setzt voraus, dass die Annotation anhand eines chemischen Standards mit mindestens zwei Parametern (z.B. genaue Masse und Retentionszeit) durchgeführt wurde. Level 2 ist durch Annotation mit einem klassenspezifischen Standard definiert. Level 3 ist die Annotation aufgrund eines passenden Parameters (z.B. genaue Masse) und Level 4 ist als unbekanntes „feature“ definiert (Salek *et al.*, 2013). Neuere Definitionen umfassen zusätzlich ein Level 0, das eine komplett aufgeklärte Stereochemie voraussetzt (Chaleckis *et al.*, 2018). Der standardmäßige Abgleich mit den charakteristischen MS2 Fragmentierungsmuster ist dabei keine Voraussetzung der „feature“ Annotation innerhalb der definierten Level 0-4 (Chaleckis *et al.*, 2018). Dies führt häufig zu publizierten Fehlannotationen, da die genaue Masse und Retentionszeit in vielen Fällen nicht ausreichend ist ein „feature“ eindeutig zu identifizieren. Ebenfalls ist problematisch, dass trotz der hohen Genauigkeit moderner Massenspektrometer (sub ppm Bereich) oftmals keine verlässlichen Summenformeln kalkuliert werden können (Kind and Fiehn, 2006).

Einleitung

Der Großteil der Metaboliten, die in dieser Studie identifiziert wurden, wurden durch direkten Abgleich mit der C BIO eigenen Metabolitenbibliothek annotiert. Die Bibliothek umfasst 587 Metaboliten, die als reine Standards im gleichen Geräte-Setup vermessen wurden. Dabei konnte ein direktes annotieren anhand des m/z Wertes und der Retentionszeit, sowie anhand des Fragmentierungsmusters durchgeführt werden. Weitere Möglichkeiten zur Identifikation von „features“ ist der Abgleich mit verfügbaren online Datenbanken wie der *E. coli* Metabolome Datenbank (Guo *et al.*, 2013) oder der Metlin Datenbank (Smith *et al.*, 2005), wobei selbst in einem engen Massengenauigkeitsbereich (10 ppm) viele „features“ nicht zugeordnet werden können, oder es viele putative Annotationen für eine Masse gibt, was eine Identifikation erschwert. (Kim *et al.*, 2016). Ebenfalls ist trotz der wachsenden Anzahl der nicht-kommerziellen online Datenbanken, die Verfügbarkeit von experimentell generierten MS2 Spektren nach wie vor unzureichend (Chaleckis *et al.*, 2018). Für „features“, die nicht mit einer Standard Bibliothek identifiziert werden können, kann ein „in silico“ Spektrum, das über eine Software generiert wird, die Annotation unterstützen. Dennoch muss zu einer eindeutigen Identifikation nach wie vor ein reiner Standard im gleichen Gerät vermessen werden, um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Metabolomik ist die Quantifizierung der Metaboliten, um Änderungen zwischen zwei Testbedingungen zu beschreiben (Xiao *et al.*, 2012). In „targeted“ Metabolomstudien kann die absolute Quantität eines Metaboliten anhand der Korrelation der Signalintensitäten aus den MS-Daten mit einer Kalibrationskurve eines zugesetzten Isotop-markierten Standards des gleichen Analyten gemessen werden (Xiao *et al.*, 2012). Für „untargeted“ Metabolomansätze in denen möglichst viele unbekannte „features“ annotiert werden sollen, ist dieser Ansatz nicht praktikabel, da für jeden annotierten Metabolit ein interner Standard mit vermessen werden müsste. Aus diesem Grund wurde eine relative Quantifizierung zwischen zwei Bedingungen durchgeführt. Dabei wird die Signalintensität aus Bedingung eins gegen die Signalintensität aus Bedingung 2 verglichen, sodass man eine relative Quantifizierung in Form einer Ratio („fold change“) erhält. Ebenfalls ist es möglich näherungsweise, einzelne Metaboliten gegen einen internen Standard bekannter Konzentration zu quantifizieren. Diese Quantifizierung ist jedoch nur ein sehr grober Richtwert, da sich die Signalstärke unterschiedlicher kleiner Moleküle stark von einander unterscheiden.

1.5 Transkriptomanalyse

Neben dem Metabolom wurde im Zuge dieser Studie auch das Transkriptom des pathogenen *E. coli* Stammes EPEC E2348/69 und der entsprechenden $\Delta csrA$ -Mutante bzw. der Überexpressionsmutante untersucht. Transkriptomtechnologien sind Methoden zur Untersuchung des Transkriptoms eines Organismus, also der Gesamtheit der RNA Transkripte. Die Gesamtheit der mRNAs, also der Intermediat-Moleküle zwischen DNA-Ebene und Protein-Ebene, gibt dabei einen Überblick über die Genexpression eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt (Lowe *et al.*, 2017) an.

Next-Generation Sequencing (auch als second generation sequencing bezeichnet) ermöglicht im Gegensatz zur klassischen Sanger Sequenzierung, die Sequenzierung in einem Hoch-Durchsatz Verfahren. Der grundlegende Ablauf der Erstellung der cDNA Bibliothek und der anschließenden Sequenzierung ist in (**Abbildung 8**) gezeigt. Nach der Probenentnahme werden im ersten Schritt alle Nukleinsäuren isoliert weshalb im nächsten Schritt die DNA enzymatisch abgebaut werden muss. Da ribosomale RNA (rRNA) abundant in den Zellen vorliegt, muss diese abgereichert werden. Für prokaryontische Proben erfolgt dies in der Regel über die Zugabe von komplementären Oligonukleotiden, die an die bakterielle 16S- und 23S-rRNAs binden. Diese rRNA-Hybride können anschließend mittels derivatisierter magnetischer Mikroperlen aus den Proben entfernt werden. Die RNA muss für die Library Erstellung fragmentiert werden. Gängige Methoden zur Fragmentierung sind entweder chemisch oder physikalisch, etwa über die Behandlung mit Ultraschall. Um eine Adapter-Ligation zu ermöglichen, wird das 5'Ende der RNAs phosphoryliert. Die Adapter beinhalten die komplementäre Sequenz für die Sequenzierprimer, sowie einen „Barcode“, mit der die später erhaltenen Reads wieder der Probe zugeordnet werden können (Hrdlickova *et al.*, 2017). Dies ermöglicht ein paralleles sequenzieren mehrerer Proben. Ligierte RNA Fragmente werden durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird anschließend über PCR amplifiziert, sodass cDNA Doppelstränge entstehen (**Abbildung 8 A**).

Für die eigentliche Sequenzierung wird die cDNA auf eine „flow cell“ geladen und an die Oberfläche gebunden. Jedes gebundene Fragment wird in einem klonalen Cluster amplifiziert. Dieser Vorgang wird als Brückenamplifikation bezeichnet (engl. bridge amplification). Für die Sequenzierung werden Sequenzierungsreagenzien,

Einleitung

einschließlich fluoreszenzmarkierter Nukleotide zugegeben und die erste Base wird eingebaut. Durch die gleichzeitige Kopplung von Synthese und Sequenzierung, sowie der Möglichkeit zur parallelen Sequenzierung von Millionen Sequenzen, ergibt sich die höhere Durchsatzrate im Vergleich zu klassischen Methoden wie der Sanger-Sequenzierung. Ein Nachteil des Verfahrens ist, dass sich gleichzeitig eine erhöhte Fehlerrate ergibt, die jedoch durch eine höhere Sequenziertiefe und bioinformatische Methoden ausgeglichen wird (Guell *et al.*, 2011, Hrdlickova *et al.*, 2017).

Eine digitale Bildaufnahme der Emission von jedem Cluster wird aufgezeichnet, sodass die emittierte Wellenlänge und Intensität genutzt werden kann um die jeweilige Base zu identifizieren. Der Zyklus wird „n“ mal wiederholt, wodurch eine Leselänge von „n“ Basen erzeugt wird. Die „Reads“ werden mit dem Referenzgenom verglichen und bioinformatisch ausgewertet.

RNA-Seq Analysen generieren eine große Menge an Rohdaten, die prozessiert werden müssen, um verwertbare Informationen zu liefern. Grundsätzlich ist der Ablauf in vier Schritte unterteilt. Die Qualitätskontrolle der sequenzierten „read-counts“ („Quality control“), das „Alignment“ sowie die Quantifizierung und Auswertung der differentiellen Expression, die mit verfügbaren bioinformatischen Methoden ausgewertet werden. Die Daten werden gegen entsprechende Referenzgenome „aligned“, um die Expressionsabundanz des Transkripts zu ermitteln. Die Quantifizierung wird anhand der „read-counts“ für die einzelnen Transkripte bestimmt. Entsprechend anderer „omics“-Techniken werden die Daten normalisiert und mit statistischen Verfahren ausgewertet (Guell *et al.*, 2011; Lowe *et al.*, 2017)

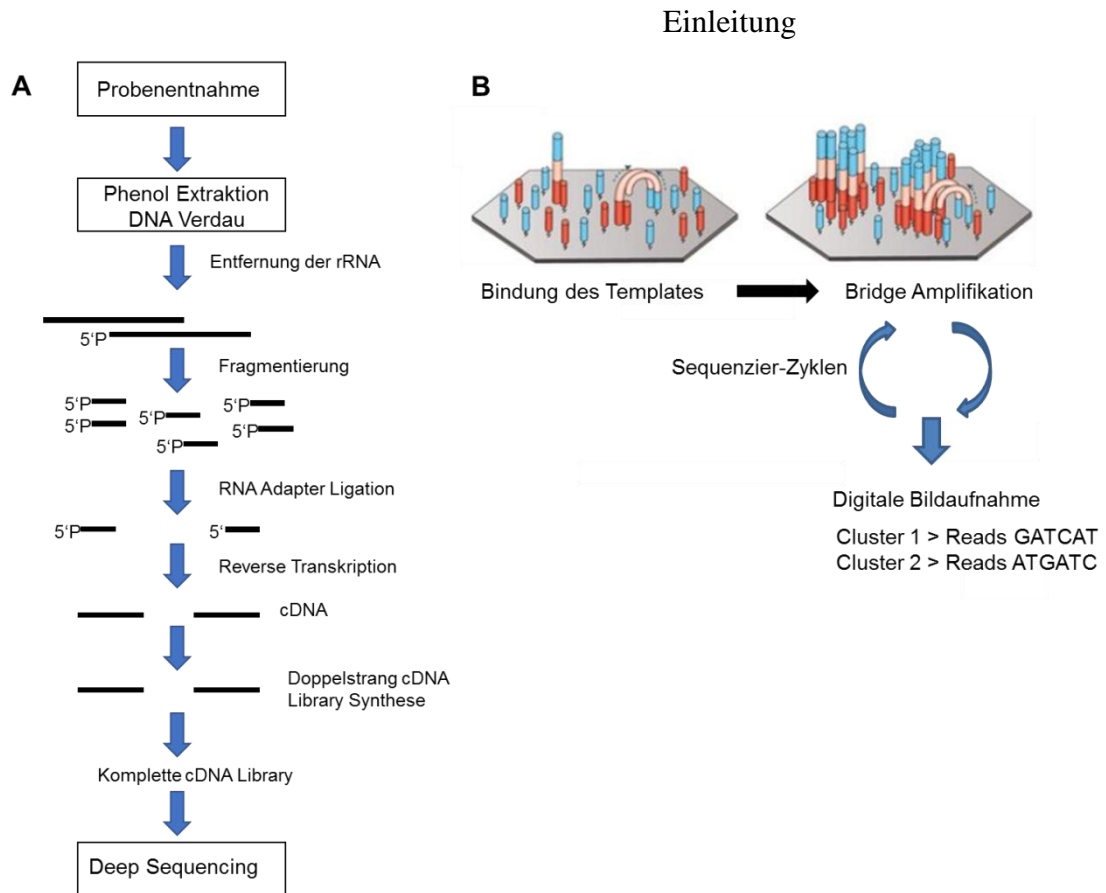


Abbildung 8: A: Arbeitsablauf der Transkriptom RNA-Seq und Erstellung der cDNA Bibliothek. Nach der Probenextraktion wird die RNAs fragmentiert und mittels Ligation an die Adapter gebunden, die für die spätere Sequenzierung benötigt werden. Anschließend wird die cDNA amplifiziert. B: Übersicht der RNA-Sequenzierung (Illumina Sequencing). Die cDNA wird auf eine „flow cell“ geladen und amplifiziert. Durch die Kopplung von Synthese und Sequenzierung können viele Sequenzen gleichzeitig sequenziert werden. Der Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide wird digital aufgezeichnet und parallel ausgewertet. (Abbildung 8 B wurde aus Goodwin *et al.*, 2016 teilentnommen und modifiziert)

1.6 Screening nach CsrA Inhibitoren

CsrA hat pleiotrope Effekte auf den Phänotyp in vielen Bakterien. Zudem ist häufig eine Reduktion oder gar der komplette Verlust der Virulenz bei einer Deletion von *csrA* zu beobachten (Vakulskas *et al.*, 2015). Aufgrund dessen ist CsrA ein mögliches Ziel zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Ein Inhibitor, der gezielt die Regulation des Csr-Systems stört, z.B. indem er die Bindung von CsrA an die mRNA in der Zielzelle unterbindet, wäre ein ideales Medikament, da die Bakterien ihre Virulenz verlieren und stark in Wachstums- und Anpassungsfähigkeit gehindert wären.

Unter „Screening“ versteht man im Allgemeinen ein systematisches Testverfahren, das innerhalb eines definierten Prüfungsbereich eingesetzt wird, um

Einleitung

Elemente mit bestimmten Eigenschaften zu detektieren. Speziell in der Biologie und Medizin bzw. der Wirkstoffforschung dienen Screening-Systeme zur Identifikation von kleinen Molekülen oder Peptiden, die den Phänotyp des Testorganismus auf gewünschte Weise verändern. Traditionelle Screening Systeme detektieren beispielsweise den Einfluss auf die Wachstumsrate von Bakterien anhand der optischen Dichte, sodass potentiell antibiotische Stoffe identifiziert werden können, die das bakterielle Wachstum hemmen.

In dieser Studie, sollte ein spezialisiertes Screening-System entwickelt werden, das gezielt Inhibitoren für den post-transkriptionellen Regulator CsrA identifiziert. Der Vorteil eines in „vivo Screens“ ist, dass nur positive „Hits“ entstehen, wenn die Moleküle die Membran der Zielzelle durchdringen und direkt an CsrA binden. Aus der Literatur sind relativ viele Ziel-mRNAs für das Csr-System bekannt (Heroven *et al.*, 2012; Potts *et al.*, 2017; Vakulskas *et al.*, 2015), die sich als „Readout“ für einen Screen verwenden lassen könnten. Eine Übersichtstabelle an möglichen Zielsequenzen für einen „Screen Readout“ sind in **Tabelle 1** gezeigt.

Dennoch muss im Einzelnen verifiziert werden, ob es sich um eine direkte Bindung von CsrA an die mRNA handelt, also ob eine direkte Regulation vorliegt. Ebenso muss überprüft werden, wie stark die Bindung von CsrA an die mRNA ist. Bis heute, sind keine in vivo aktiven Inhibitoren für CsrA bekannt. Lediglich ein „in vitro Screen“, bei dem die Interaktion von CsrA mit der Ziel mRNA bestimmt wurde, lieferte sechs positive Hits (Maurer *et al.*, 2016).

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Ziel-mRNAs, die als Screen-Readout verwendet werden könnten. Die Tabelle wurde modifiziert übernommen aus Vakulskas *et al.*, 2015.

Organismus	(Regulative sRNAs)	Ziel-mRNA (Quelle)	Phänotyp
<i>E. coli</i>	CsrB/CsrC/McaS	<i>glgCAP, sdiA, pgaABCD, nhaR, cstA, flhDC, LEE4, grlRA</i>	Motilität, Virulenz, Biofilm- Bildung, Glykogen- Metabolismus
<i>S. Typhimurium</i>	CsrB/CsrC	<i>hilD, fimAICDHF, pefACDEF, STM1987</i>	Motilität, Biofilm- Bildung, T3SS

Die Idee eines Screening Assays zur Identifikation von CsrA Inhibitoren ist in **Abbildung 9** dargestellt. Der Assay basiert auf einer Reporter-genfusion von einer

CsrA-Zielsequenz (z.B. *sepL*, *glgC*) mit einer Luxkassette als „Readout System“. Das „Readout Konstrukt“ ist auf einem „low copy“ Vektor (pFU53) codiert. Bei Anwesenheit von CsrA bindet das dimere Protein an die Zielsequenz auf der mRNA und blockiert somit die Ribosomenbindestelle (RBS). Es findet keine Translation des Lux-Reporters statt. Blockiert ein Inhibitor die Bindung von CsrA an die Zielsequenz, bleibt die RBS frei und die Translation des Lux-Reporters wird induziert. Da es keinen bekannten Inhibitor gibt, sollte eine Überexpression von CsrB/CsrC als Positivkontrolle fungieren (siehe **Kapitel 1.2.1**). Die hohe Abundanz von CsrB/CsrC in der Zielzelle sollte in der Theorie ausreichen um CsrA von der Zielsequenz zu sequestrieren, sodass die Translation der Lux-Fusion stattfinden kann. Eine weitere Möglichkeit einer Positivkontrolle ist das Verwenden der $\Delta csrA$ Mutante. Da diese nicht über CsrA verfügt ist die Translation der Lux-Fusion kontinuierlich aktiv.

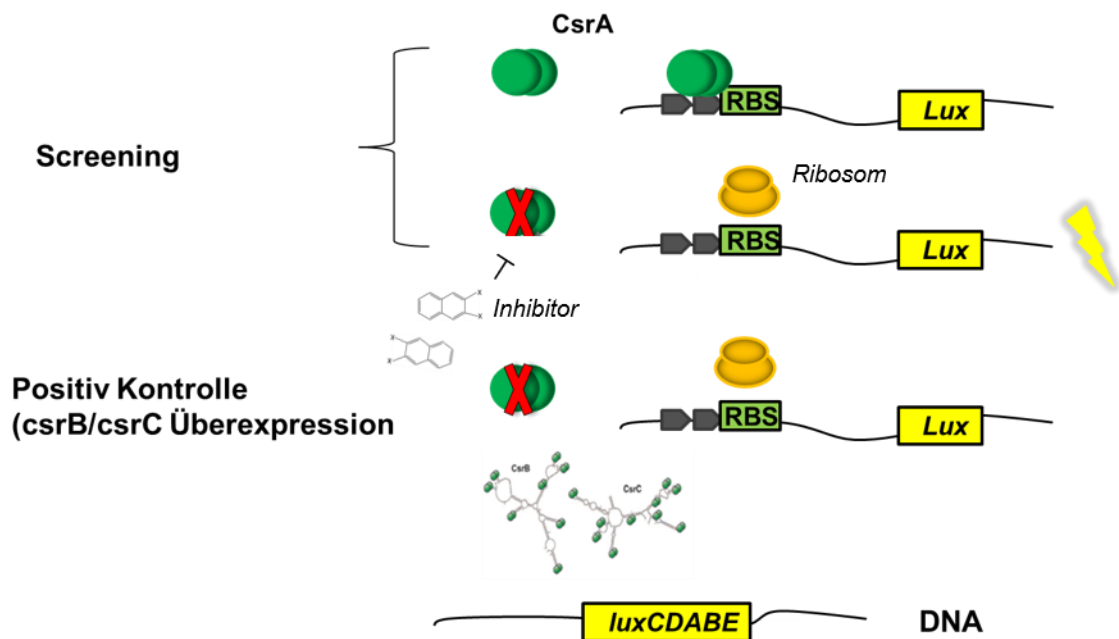


Abbildung 9: Schematische Darstellung des CsrA Screening Assays. CsrA bindet an die Zielsequenz und blockiert die Ribosomenbindestelle, sodass keine Transkription stattfinden kann. Wird CsrA durch einen Inhibitor inaktiviert bleibt die Ribosomenbindestelle frei und die Lux-Reportergenfusion wird translatiert. Als mögliche Positivkontrolle wurde eine Überexpression von CsrB und CsrC, sowie die $\Delta csrA$ Mutante getestet. Ribosom: orange, CsrA Dimer: grün

1.7 Zielsetzung der Dissertation

Pathogene Bakterien können sich den unterschiedlichsten Bedingungen anpassen, um in ihren Wirtszellen oder der entsprechenden Umgebung zu überleben. Diese Fähigkeit setzt eine schnelle Modifikation der Genexpression, Translation sowie des Stoffwechsels voraus. Das Csr-System ist ein globales, regulatorisches System, das eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, Virulenz, Motilität und Biofilmbildung reguliert. Aufgrund der starken Auswirkung einer CsrA Perturbation auf die Virulenz ist CsrA ein mögliches Ziel zur Behandlung von Infektionskrankheiten. In den letzten Jahren wurde intensiv an der regulatorischen Funktion von CsrA geforscht, wobei sich jedoch eine große Anzahl der Studien auf Transkriptomtechniken beschränkten, um die regulatorische Funktion des post-transkriptionellen Regulators aufzuklären. Kombinierte „Multiomic’s Studien“, die den Effekt von CsrA auf den Metabolismus untersuchen, sind bisher noch nicht publiziert. Ein Ziel dieser Studie war, die globale Regulation von CsrA auf den Metabolismus mit Hilfe von Gaschromatographie und Hochdruckflüssigchromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie zu untersuchen. Es sollte ein möglichst umfangreiches Abbild des Metabolismus der $\Delta csrA$ Mutante bzw. der CsrA Überproduktionsmutante im Vergleich zum Wildtyp beschrieben werden. Die CsrA-induzierten Änderungen des Metaboloms sollten mit Transkriptomdaten, die aus dem gleichen Proben generiert wurden, korreliert und plausibilisiert werden. Auch die Expression der Virulenzgene und die Wechselwirkungen mit dem Metabolismus, die beide unter der regulatorischen Kontrolle von CsrA stehen, sollte weiter vertieft untersucht werden. Für ausgewählte Transkripte sollte in funktionellen Studien untersucht werden, ob diese direkt durch Bindung von CsrA reguliert werden.

In einem anderen Teilprojekt, der Arbeit, sollte ein „Screening - System“ etabliert werden, das in einem Hochdurchsatzverfahren zur Findung von Inhibitoren von CsrA genutzt werden kann. Dieses System basiert auf einem „Lumineszenz Readout“, der einen direkten Nachweis über die Bindung von CsrA an die Zielsequenz liefert, die durch mögliche Inhibitoren geblockt werden könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Studie verwendet wurden, wurden von Merck, NEB, Fisher Scientific, Roth, Pierce, Qiagen, Sigma-Aldrich, T.H. Geyer, Invitrogen, Fermentas, Applichem oder Avanti Polar Lipids, falls nicht anders angegeben, bezogen. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in dem jeweiligen Methodenteil angegeben.

2.1.2 Enzyme, Kits und Antikörper

Alle Enzyme, Kits und Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden, sind in folgenden Tabellen aufgelistet:

Tabelle 2: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Taq Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Restriktionsenzyme	NEB
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
T4 RNA Ligase I	NEB
Q5 Polymerase	NEB
Antarktische Phosphatase	NEB
KOD Polymerase	Sigma Aldrich
Benzonase	Merck

Tabelle 3: Kits

Kit	Hersteller
QIAquick™ PCR Purification	Qiagen
QIAquick™ Plasmid Miniprep	Qiagen
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen
Chemiluminescent Nucleic Acid Detection module	Thermo Scientific
Quick Gel Extraction and PCR Kit	Thermo Scientific
Dream Taq Green PCR Master Mix	Thermo Scientific
TranscriptAid™ High Yield	Fermentas
Turbo DNA Free Kit	Ambion

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper (Verdünnung)	Hersteller
Anti-CsrA (1:5.000)	Davis Biotechnology
Anti-rabbit Immunoglobulin HRP conjugate (1;2000)	Cell Signaling

2.1.3 Wachstumsmedien und Zusätze

Alle Medien wurden in ddH₂O angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienzusätze (z.B. Antibiotika) wurden mittels Sterilfiltration sterilisiert und nach dem Autoklavieren zugegeben. Für feste Wachstumsmedien wurde Agar-Agar (Difco, USA) in einer Konzentration von 15 g/L zum Flüssigmedium hinzugefügt.

Tabelle 5: Wachstumsmedien

Medien	Zusammensetzung
Lysogeny Broth Medium (LB) (Miller, 1992)	10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 16 g/L Tryptone
Mueller Hinton Broth	17.5 g/L Casein Hydrolysat, 2 g/L Rindfleischextrakt, 1.5 g/L Stärke

Tabelle 6: Minimalmedien

Medien	Zusammensetzung
MOPS Medium	100 ml 10 x MOPS 10 ml 0,1321 M K ₂ HPO ₄ 1 ml Spurelemente 25 ml 2 % Casaminoacids 10 ml 20 % Glucose
M9 Medium	100 ml 10 x M9 Salze 10 ml 20 % Glucose 25 ml 2 % Casaminoacids 1 ml Spurenelemente 1 ml 1 M MgSO ₄ 0,3 ml 1 M CaCl ₂
M9 modifiziert (M9*)	10 ml 10 x M9* Salz 1 ml Spurelemente 25 ml 2 % Casaminoacids 10 ml 20 % Glucose 1 ml 1 M NH ₄ Cl 100 µl Fe(NO ₃) ₃ * 9 H ₂ O 1 ml 1 M MgSO ₄ 0,6 ml 1 M CaCl ₂ 500 µl FeSO ₄ * 7 H ₂ O

Tabelle 7: 10 x Stocks für Minimalmedien, Spurenelemente

Medien	Zusammensetzung	Konzentration
10 x M9*	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	47,84 g/L
	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	29,94 g/L
	NaCl	58,44 g/L
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,40 g/L
	KCl	3,73 g/L
10 x M9	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	75,20 g/L
	KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	30 g/L
	NaCl	5 g/L
	NH ₄ Cl	5 g/L

Medien	Zusammensetzung	Konzentration
1.000x Spurenelemente	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	148 mg/L
	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	100 mg/L
	CoCl ₂ × 7 H ₂ O	200 mg/L
	NiCl ₂ × 6 H ₂ O	100 mg/L
	CuCl ₂ × 2 H ₂ O	15 mg/L
	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	50 mg/L
	H ₃ BO ₃	100 mg/L
	HCl (25 %)	1 ml/L

Tabelle 8: Antibiotikazusätze

Antibiotikum	Zusammensetzung	Finale Konzentration
Carbenicillin (Cb)	100 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml in Ethanol	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml

2.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide zur Klonierung und Deletionsmutanten-Generierung, sowie für „Check-PCR“ wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und sind in folgender Tabelle aufgelistet. Restriktionsschnittstellen, falls vorhanden, sind unterstrichen angegeben.

Tabelle 9: Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle
#VBP5	CTA AGG AGG ATA TTC ATA TGT CGA CGA GTC AGA ATC AGC	
#VBP6	GAA GCA GCT CCA GCC TAC ACA TAT CCA GGC TGA AAA ATC C	
#VBP7	ACC GCG GTG AAA GCC GTA TCA GGT AAG AGA TGG TG	
#VBP7	TGA GCC GAA AAT GCT GCG AAC CAT GGT TGA TGA TCT G	
#VBP24	CTA AGG AGG ATA TTC ATA TGA TCC CAG CAG TCC AGT TAC	
#VBP25	GAA GCA GCT CCA GCC TAC ACA AAC TCG ACG AGT CAG AAT CAG	

Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle
#VBP26	AGC GCA AAT CTT TCC AGT AAG	
#VBP27	ATC GCT ACT AAA GCC ATA TCA AG	
#VBP13	TAC <u>GCT CGA</u> GCA TAT CAG ACA ATG GCA GGG CG	XhoI
#VBP15	TAC <u>GCT CGA</u> GTC AAA ATT TAC TCC GCC ATG GTC C	XhoI
#VBP16	TAG <u>GCT AGC</u> ACT ATT ACT TAC AAA GGT TAC ATT <u>TTC CAT</u> ATT ATC	NheI
#VBP19	TAC <u>GCT CGA</u> GAG AAA ATC GCG ACG GGA CCA AC	XhoI
#VBP20	TAG <u>GCT AGC</u> TAA GTG ATC GTT CTT CTC TAA ACT AAC C	NheI
#VBP21	TAG <u>GTA CCA</u> TGC TGA TTC TGA CTC GTC	KpnI
#VBP22	TAG <u>TCT AGA</u> TTA GTA ACT GGA CTG CTG G	XbaI
#VBP59	TAG <u>TCT AGA</u> ATG CTG ATT CTG ACT CGTC	XbaI
#VBP60	TAG <u>GTA CCT</u> TA G TAA CTG GAC TGC TGG	KpnI
#VBP61	TAG <u>TCT AGA</u> ATT AAC GCT ATC GAC AAC G	XbaI
#VBP62	TAG <u>GTA CCA</u> TTA ACG CTA TCG ACA ACG	KpnI
#VBP63	A TAA CCG TAT TAC CGC CTT TGA GTG	
fwd1_wza	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GTC TGG ATG CCT GAA AGA CC	
fwd2_wza	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GAT AGC CTG CGG ATG AAA TC	
fwd3_wza	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GAG CGA CCG AAA ATA TAA ATG ATA ATC	
fwd4_wza	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GAT TTT TTT AGG ACT GAT GCC AG	
rev_wza	ATC AAT TTC ATT TTG GAT TTC ATC	
rev2_wza	CAT TGT TTA TTT ATC ACT TTG GC	
rev3_wza	TCA CTT TGG CAG AGT AAT TAT C	
cfa_fwd	GTAATACGACTCACTATAGGTTTTTACGGGGACA GGATC	
cfa_rev	ACG ATG AAC TCA TAG TTT CTC	

Oligonukleotide	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle
entC_fwd	GTAATACGACTCACTATAGTGC GTTACCTCAAGA GTTGAC	
entC_rev	CTT CCT CAG CCA GTG ACG	
cfa2_fwd	GTAATACGACTCACTATAGTCCCGACTCACTATG GATGG	
cfa2_rev	TTT CTC CAT CAC TGG TCG GTG	
entC2_fwd	GTAATACGACTCACTATAGACCACAACCAGATGC AACC	

2.1.5 Stämme und Plasmide

Tabelle 10: Stämme

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> CC118	$\Delta(ara-leu)$ <i>araD</i> $\Delta lacX74$ <i>galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am) recA1 λpir phage lysogen</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> WM3064	<i>endA1 hsdR17 glnV44 (= supE44) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 ϕ80dlac$\Delta(lacZ)M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>zdg-232: Tn10 uidA: pir+</i></i>	(Dehio and Meyer, 1997)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F-endA1 glnV44 thi1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlac$\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169, hsdR17(rK-mK+), λ-</i>	(Platt <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. coli</i> E2348/69 O127:H6	Wildtyp	(Iguchi <i>et al.</i> , 2009)
<i>E. coli</i> E2348/69 O127:H6 <i>tir-blaM</i>	E2348/69 PLEE5- <i>tir-blaM</i> (pCX442)	(Mills <i>et al.</i> , 2007)
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	Wildtyp	(Kroger <i>et al.</i> , 2012)
<i>Y. pseudotuberculosis</i> YP III (YP III)	Wildtyp	(Bolin <i>et al.</i> , 1982)
YP53	YP III, $\Delta csrA$, Kan ^R	(Heroven <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta csrA$	SL1344, $\Delta csrA$, Kan ^R	Diese Studie
<i>E. coli</i> DH5 α $\Delta csrA$	<i>E. coli</i> DH5 α , $\Delta csrA$, Kan ^R	Diese Studie
<i>E. coli</i> E2348/69 O127:H6 $\Delta csrA$	<i>E. coli</i> E2348/69, $\Delta csrA$, Kan ^R	Diese Studie

Tabelle 11: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pACYC184	Expressionsvektor, ori p15a, Tet ^R , Cm ^R	(Chang and Cohen, 1978)
pAKH121	CsrB Überexpressionsvektor (basiert auf pACYC184)	A.K. Heroven
pAKH122	CsrC Überexpressionsvektor (basiert auf pACYC184)	A.K. Heroven
pKD46	Rekombinationsvektor, oriR101 w/ repA101ts, Amp ^R , lambda red Gene	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	“FRT sites”, Kan ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pUC18	Klonierungsvektor, ori pMB1, Amp ^R	(Lin-Chao <i>et al.</i> , 1992)
pZE12-luc	Expressionsvektor, Luciferase, ori p15a, Amp ^R	(Uliczka <i>et al.</i> , 2011)
pVBE1	pFU53, <i>sepL</i> (-460/+27)	Diese Studie
pVBE2	pFU53, <i>hilD</i> (-530/+27)	Diese Studie
pVBE5	pZE12-luc, P _{lac} <i>csrA</i>	Diese Studie
pVBE12	pVBE1, NotI RP4 mob AvrII (pFU72)	Diese Studie
pVBE13	pZE12-luc, P _{csrA} : <i>csrA</i> (-108/+168)	Diese Studie
pVBE14	pUC18, P _{csrA} : <i>csrA</i> (-190/+168)	Diese Studie
pVBE15	pUC18, P _{lac} : <i>csrA</i>	Diese Studie
pFU53	Reportergenvektor, pSC101*, Amp ^R , Lux-Kassette	(Uliczka <i>et al.</i> , 2011)
pFU72	Reportergenvektor, braucht λ <i>pir</i> Gene, konjugierbar, RP4 mob, ori R6K, Amp ^R , Lux-Kassette	(Uliczka <i>et al.</i> , 2011)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisierung

Zu autoklavierende Medien und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar Überdruck in einem Autoklav sterilisiert. Hitzeempfindliche Substanzen, z.B. Antibiotikallösungen, wurden mittels Sterilfilter (0,2 µm Porendurchmesser) sterilisiert.

2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung

Die in dieser Studie genutzten Enterobakterien-Stämme (*Escherichia*, *Salmonella*) wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C, bzw. *Yersinia* Kulturen bei 25 °C in einem Schüttelinkubator bei 160-220 UpM inkubiert. Kultivierung auf festen Medien erfolgte über Nacht in einem 37 °C Inkubator. Zur Stammhaltung wurden 750 µl einer Übernachtskultur mit 750 µl 50 % Glycerol in LB-Medium gemischt und bei – 80 °C gelagert.

2.2.3 Probennahme für die Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse wurde aus den biologischen und technischen Replikaten jeweils 6 ml Kultur bei einer OD₆₀₀ 1 entnommen und bei 4 °C für 1 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Phenol-Extraktion (2.3.2) aufbewahrt.

2.2.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte bakterieller Flüssigkulturen erfolgte photometrisch mittels Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm in einem Spektrophotometer. Dabei entspricht OD₅₇₈ 1 circa $1 \cdot 10^9$ Zellen/ml (Sambrook *et al.*, 2006). Als Referenzwert wurde das entsprechende Wachstumsmedium genutzt.

2.2.5 Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde der entsprechende *E. coli* Stamm in LB-Medium bis zur frühen exponentiellen Phase (OD 0,2 – 0,4) angezogen. 50 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation bei 6000 UpM für 15 min bei 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal mit 50 ml sterilem Wasser und einmal mit 10 % Glycerol in Wasser gewaschen (6000 UpM, 20 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde final in ca. 500 µl 10 % Glycerol in Wasser gelöst. Die Zellen wurden entweder direkt zur Transformation genutzt oder in einem Eppendorfgefäß à 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.6 Elektrotransformation

Zur Elektrotransformation wurde ein Aliquot von 50 µl elektrokompetenter Zellen mit 1 – 5 µl Plasmid oder chromosomaler DNA (10 – 50 ng, chromosomale DNA ~1 µg) auf Eis inkubiert. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette (BioRAD 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation wurde mittels eines Elektroporators (MicroPulse, BioRAD) mit 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF durchgeführt. Nach der Poration wurde 1 ml LB Medium zu den Zellen gegeben und die Zellsuspension für 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen anschließend auf einer Agarplatte mittels entsprechendem Antibiotikum Selektionsmarker selektiert (37 °C, über Nacht).

2.2.7 Transformation via Konjugation

Der homologe Gentransfer dient dem Übertragen von Erbinformation zwischen Bakterien und kann auch artübergreifend stattfinden. Der Vorteil der Konjugation ist, dass das natürliche Methylierungsmuster der DNA vorhanden bleibt, und diese so vor organismeneigenen Endonukleasen geschützt ist, die der Abwehr von Fremd-DNA dienen. Zudem ist die Transformationseffizienz via Konjugation höher im Vergleich zur Elektrotransformation und insbesondere effektiv für sehr große Vektoren (>10 kB), da diese häufig schlecht in EPEC Wildtyp Stämme transformiert werden können (Hobson *et al.*, 2008).

Der verwendete Donorstamm für die Konjugation war der entsprechende *E. coli* WM3064 (*thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4-1360 Δ(araBAD)567 ΔdapA1341: [erm pir]*), der das zu transformierende Plasmid trug. Als Rezipient diente der Zielstamm (hier EPEC E2348/69 Wildtyp oder $\Delta csrA$ Mutante). Aus einer Übernachtskultur von Donor und Rezipient wurden je 2 ml Kultur geerntet und für 2 min bei 13.000 UpM pelletiert. Die Zellen wurden dreimal mit LB-DAP (DAP - 2,6-Diaminopimelinsäure, 300 μ M) gewaschen und final in je 100 μ l LB-DAP vereinigt. Die Mischkultur wurde auf eine LB-DAP Platte aufgetropft und „aufwärts“ stehend für 12 h bei 37 °C inkubiert. WM3064 ist DAP auxotroph, weshalb den entsprechenden Wachstumsmedien DAP zugegeben werden musste. Nach der Inkubationszeit werden die Bakterien mit 2 ml LB Medium (ohne DAP) abgeschwemmt und die Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 13.000 UpM für 2 min pelletiert und anschließend dreimal mit LB gewaschen (hier soll das DAP entfernt werden). Im Anschluss daran wurden Verdünnungen der Konjugation von 1:10 – 1:10.000 hergestellt, auf LB-Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf das entsprechende Plasmid überprüft.

2.2.8 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts wurden Wachstumskurven des $\Delta csrA$ Deletionsstammes, der *csrA* Überexpressionsmutante sowie des *E. coli* O127:H6 Stammes in M9 (für Virulenzgenexpression optimiert) durchgeführt. Eine Übernachtskultur der jeweiligen Stämme wurde zum Animpfen der Hauptkultur in einem 250 ml Erlenmeyerkolben benutzt. Die OD₆₀₀ wurde stündlich, ab Erreichen der exponentiellen Phase alle 30 min, gemessen. Für jeden Stamm wurden zwei biologische Replikate, sowie für jeden Messzeitpunkt zwei technische Replikate vermessen.

2.2.9 Trockengewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Trockengewichts ist essentiell zur Normalisierung von „omics-Daten“, da die optische Dichte stark abhängig von der Zellform- und der Größe ist. Daraus folgt, dass die optische Dichte keine genaue Abschätzung der Zellmasse, die mit der Metabolitenkonzentration korreliert, ermöglicht. Für die Massenbestimmung

wurden je drei biologische Replikate in 250 ml Erlenmeyerkolben in modifizierten M9 Medium bei 37 °C und 160 UpM aerob inkubiert. Es wurden je vier Proben von 6 ml zu drei Zeitpunkten im Wachstumsverlauf genommen und die Zellen anschließend pelletiert (13.000 UpM, 22°C, 5 min). Das überschüssige Medium wurde verworfen und die Zellpellets im Trockenschrank (Omnilab, Memmert) über Nacht bei 80 °C getrocknet. Das Trockengewicht ergibt sich aus der Differenz der Masse der Proben minus der Masse des Leergewichts. Die Korrelation von Trockenmasse gegen die OD₆₀₀ ergibt ein annähernd lineares Verhältnis während der exponentiellen Phase an.

2.2.10 Wachstums-Inhibitions Assay

Mit einem Wachstums-Inhibitions Assay kann die minimale inhibitorische Konzentration (MIC), die minimale Konzentration eines Inhibitors, die das Wachstum stoppt oder hemmt, bestimmt werden. Der Assay wurde in einer 96er Mikrotiterplatte durchgeführt. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde eine Übernachtskultur des Teststammes in LB Medium über Nacht bei 37 °C aerob kultiviert. Die Start OD₆₀₀ der Hauptkulturen im „96er Well“ Format war OD₆₀₀ = 0,05. Für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurde eine Verdünnungsreihe der Testsubstanzen als Triplikat vorgelegt. Abhängig von der Testsubstanz wurde eine lineare Verdünnungsreihe von 1:2 - 1:10 vorbereitet. Die beimpfte Platte wurde für 12-14 h bei 37 °C inkubiert. Ein Beispielschema ist wie folgt dargestellt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	Blank/Medium
B	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	E2348/69 wt
C	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	
D	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	
E	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	E2348/69 $\Delta csrA$
F	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	
G	500	250	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	0.5	0.25	
H	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	MH	Wachstumskontrolle

Abbildung 10: Beispielschema MIC Assay. Von jedem Teststamm wurden Triplikate vermessen. Die Blankkontrolle war das entsprechende Wachstumsmedium (MH-Medium), die Wachstumskontrolle in MH-Medium wurde ohne Zugabe von Testsubstanz inkubiert. Angaben in $\mu\text{g/ml}$ (Verdünnung 1:2).

Die OD_{600} Werte der Mikrotiterplatte wurden jeweils zum Zeitpunkt 0 und zum Endzeitpunkt der Bestimmung (12 – 14 h) mittels Platten-Spektrophotometer (Biotek, Powerwave X2) bestimmt. Als Nullwert für die Messung wurde das unbeimpfte Wachstumsmedium verwendet. Die MIC lässt sich aus der graphischen Darstellung von $\log(10)$ der Testsubstanz-Konzentration gegen die OD_{600} zum Endzeitpunkt ermitteln.

2.2.11 Jod Stärke Test

Aus einer LB-Flüssigkultur wurden verschiedene Verdünnungsausstriche auf Kornberg-Medium Agar- Platten (1,1 % K_2HPO_4 , 0,85 % KH_2PO_4 , 0,6 % Hefeextrakt, 0,5 % Glucose, 1,5 % Agar) der jeweiligen Teststämme ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht (mindestens 12 h) bei 37 °C inkubiert, damit die Zellen in die stationäre Phase übergehen. Nach der Inkubation wurden die Platten entweder mit ca. 5 ml Lugolscher Lösung für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert oder mit elementarem Jod bedampft. Jod interkaliert in die Helix-Struktur der Stärke- und Glykogenmoleküle und färbt diese braun (Gudapaty *et al.*, 2001).

2.2.12 Screening nach CsrA Inhibitoren

Um nach möglichen Inhibitoren für CsrA zu „screenen“, sollte ein „Screening“ System etabliert werden, das es ermöglicht in einem reproduzierbaren Assay im Hochdurchsatzverfahren nach Inhibitoren für CsrA zu suchen. Der „Screening Assay“ basiert auf einer Lux-Reportergenfusion, die auf dem Vektor-Backbone pFU53 basiert.



Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung der Reportergenfusion. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pFU53. Die entsprechende Zielsequenz wurde zwischen die NheI und XhoI Schnittstelle kloniert. Bindet CsrA an die Zielsequenz wird die Ribosomenbindestelle blockiert, sodass keine Translation stattfindet und somit auch kein Signal der Lux-Kassette.

Mittels PCR wurden die Zielsequenzen die als „Readout“ fungieren sollten, amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen NhoI und XhoI in den pFU53 Vektor an die Lux-Kassette fusioniert (**Abbildung 11**). Ein Beispiel einer Zielsequenz ist in **Abbildung 12** dargestellt.

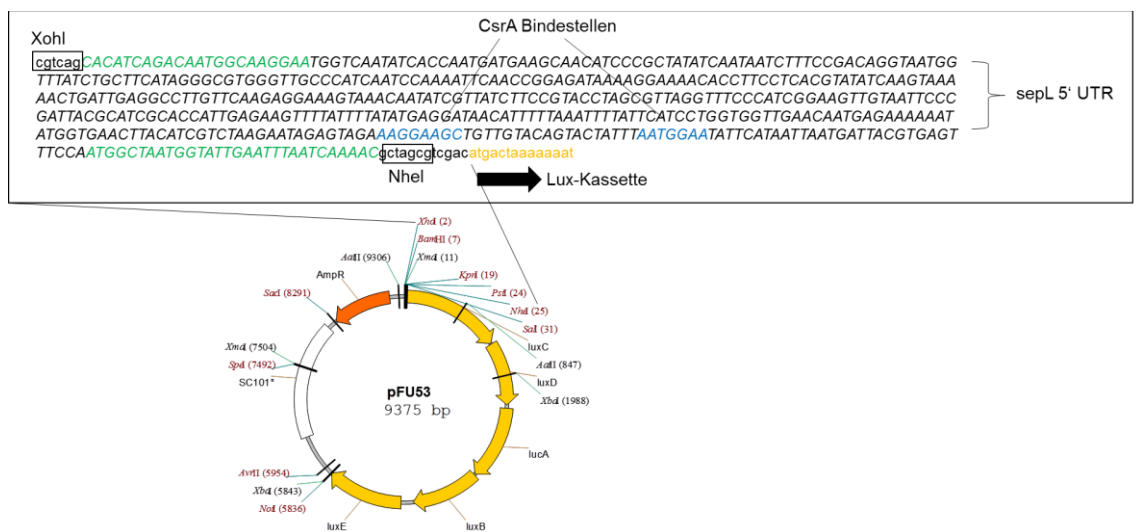


Abbildung 12: Readout System. Die Zielsequenz mit den putativen CsrA Bindestellen wurde in den Vektor pFU53 kloniert. Es sind die Schnittstellen XhoI und NheI (im Kasten), die Primersequenz (grün), sowie die CsrA Bindestellen (blau) gezeigt.

Die genutzten Oligonukleotide und die jeweiligen Vektoren sind in **Tabelle 9** und **Tabelle 11** beschrieben. Die Fusionskonstrukte wurden mittels Transformation in den EPEC E2348/69 Wildtyp und die EPEC $\Delta csrA$ Mutante transformiert. Für die Testläufe wurden die Bakterien im 96 Well-Format bis zur Mid-Log Phase wachsen gelassen. Anschließend wurde die Lumineszenz sowie die OD₆₀₀ gemessen (Synergy4, Biotek). Als Qualitätsparameter für den Screen wurde der Z-Faktors bestimmt (**Formel 1**).

Formel 1: Berechnung des Z-Faktors. σ = Standardabweichung, μ =Mittelwert, n = Negativkontrolle, p = Positivkontrolle

$$Z - Faktor = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Ein Z-Faktor zwischen 0,5 – 1 stellt einen verlässlichen Assay dar. Z-Faktor-Werte unter 0,5 sagen aus, dass der Assay nicht für ein Hochdurchsatzverfahren geeignet ist. Die Klonierung der einzelnen Vektoren ist auch in **Kapitel 2.6.1** beschrieben.

2.3 Molekularbiologische Methoden: Ribonukleinsäuren

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Bestimmung der DNA Konzentration und Reinheit wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm mittels NanoDrop (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland) gemessen. Die maximale Lichtabsorption von DNA wird bei einer Wellenlänge von 260 nm erreicht. Für Proteine liegt die maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm vor. Eine Einheit OD₂₆₀ entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Konzentration der DNA ergibt sich aus dem Produkt des gemessenen OD₂₆₀ Wertes multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor der Probe und 50 µg/ml. Die Reinheit der DNA Probe ergibt sich aus dem Quotienten von OD₂₆₀/OD₂₈₀. Saubere DNA Proben weisen ein Verhältnis von 1,7 – 1,9 OD₂₆₀/OD₂₈₀ auf.

2.3.2 Chloroform Phenol Aufreinigung von RNA

Zur Isolation der RNA zwecks Transkriptomanalyse wurden 6 ml *E. coli* Kultur bei 13.000 UpM und 4 °C pelletiert und bis zum Isolationszeitpunkt bei -80 °C gelagert. Die Zellpellets wurden in 250 µl Resuspensions-Puffer (0,3 M Sucrose, 0,01 M Natriumacetat, pH 4,5) resuspendiert. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 250 µl 2 % Lyse-Puffer (2 % SDS in 0,01 M Natriumacetat, pH 4,5) und einer 90 s langen Inkubation bei 65 °C in einem Thermoblock (Eppendorf, Thermomix 5437) induziert. Anschließend wurden 500 µl Phenol-Wasser- Lösung (Roth, Karlsruhe) zugegeben und bei 65 °C für 3 min in einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 30 s in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Phasentrennung wurden die Proben im Anschluss daran bei 13.000 UpM für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend mit 300 µl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 (Roth, Karlsruhe) gemischt und erneut für drei min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Nach erneutem Waschen mit 300 µl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1, wurde 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,5) und 2,5 Vol. an 95 % Ethanol zur wässrigen Phase zugegeben und für mindestens 1 h, oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach der Fällungsreaktion wurde die RNA mittels 30-minütiger

Zentrifugation (13.000 UpM, 4 °C) pelletiert und anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das RNA Pellet wurde bei Raumtemperatur für circa 30 min getrocknet.

Resuspensions Puffer: 0,3 M Sucrose, 0,01 M NaOAc pH 4,5

Lysis Puffer: 2 % SDS in 0,01 M NaOAc pH 4,5

2.3.3 DNase Verdau

Zur Entfernung überschüssiger chromosomaler DNA nach der Phenol-Chloroform Isolation wurde das DNaseI Kit (Ambion) laut Herstellerangaben benutzt. Der DNA-Verdau wurde mittels Zugabe von 300 µl RNase-freiem Wasser und anschließender Chloroform-Isoamylalkohol-Fällung gestoppt (**siehe 2.3.2**). Das RNA Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser bei -80 °C gelagert.

2.3.4 „In vitro“ Transkription

Die für den CsrA EMSA benötigte RNA wurde mittels „in vitro“ Transkription generiert. Dazu wurde das „Transcription Aid T7 High Yield Transcription Kit“ (Fermentas, England) genutzt. Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Template DNA	6 µl (total 2 µg)
5x “Transcript Aid Buffer”	4 µl
ATP/CTP/GTP/UTP	je 2 µl (final 8 µl)
„Transcript Aid Enzyme Mix“	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde überschüssige DNA mittels Zugabe von 2 µl DNase 15 min bei 37 °C (NEB, England) abgebaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA und Inkubation für 15 min bei 65 °C gestoppt.

2.3.5 Biotinylierung von RNA

Die in "in vitro" transkribierte RNA wurde für den späteren Nachweis im RNA EMSA mit Hilfe von Biotin am 5' Ende markiert. Ein typischer Biotinylierungsansatz sah wie folgt aus:

10x T4 RNA Ligase Puffer	6 µl
10 mM ATP	6 µl
sRNA	2 µg
10 % DMSO	6 µl
10 µM Biotin	6 µl
T4 RNA-Ligase I	2 µl
ddH₂O	x µl
50 % PEG-8000	18 µl

Für die Reaktion wurden 2 µg „in vitro“ transkribierte RNA eingesetzt und das Reaktionsvolumens auf 60 µl eingestellt. Die RNA wurde vor der Zugabe zum Reaktionsmix für 10 min auf 70 °C in einem Heizblock inkubiert. Die Biotinylierungs-Reaktion erfolgte über Nacht bei ~ 17 °C. Die biotinylierte RNA wurde anschließend mittels Chloroform-Phenol Aufreinigung (2.3.2) aufgereinigt.

2.3.6 Dephosphorylierung der RNA

RNA Fragmente wurden vor der radioaktiven Markierung am 5'Phosphat dephosphoryliert. Die Proben wurden für 30 min bei 800 UpM mit Alkalischer Phosphatase (AP) nach Herstellerangaben dephosphoryliert:

10x Cut Smart Puffer	5 µl
RNA (1 µg)	20 µl
AP (10 U)	1 µl
H₂O_{dest.}	24 µl

Nach der Inkubation wurde die RNA mittels Chloroform-Phenol Aufreinigung (2.3.2) aufgereinigt und in 20 µl RNase freiem Wasser gelöst.

2.3.7 Radioaktive Markierung von RNAs

Die radioaktive Markierung der RNAs wurde von Marcel Volk (MIBI Department) im Radioaktivlabor durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung wurde γ -P32-Adenosine 5'triphosphate (P32-ATP) verwendet (SRP-301; Hartmann Analytik, Braunschweig).

Beispiel der Markierungsreaktion:

10x PNK Puffer A		1 µl
RNA (200 ng)	x µl	
PNK (10 U)		1 µl
γ-P³²-ATP (10 µCi)		3 µl
H₂O_{dest.}	x µl	

Die markierte RNA wurde mittels "RNA Clean & ConcentratorTM Kit (Zymo Research, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Durchführung des CsrA EMSAs ist in 2.8.6 beschrieben. Die getrennten Gele wurden für 60 min bei 80 °C getrocknet und anschließend für 30 min abgekühlt. Die Proben wurden über Nacht auf einem Leuchtstoffschirm inkubiert. Das Radiogramm wurde mit einem TyphoonTM FLA 9000 (GE HealthCare) aufgenommen.

2.4 Molekularbiologische Methoden: Desoxyribonukleinsäuren

2.4.1 Auftrennung von DNA Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, das sich das Laufverhalten von geladenen Molekülen in einer Agarosegel-Matrix bei angelegtem elektrischen Feld zunutze macht. Aufgrund der negativen Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats bewegen sich Nukleinsäuren in einem angelegten elektrischen Feld in Richtung der Anode. Dabei bewirkt das Polysaccharid-Netzwerk der Agarose einen „Siebeffekt“, welches die Auftrennung der geladenen Nukleinsäuren der Größe nach ermöglicht. Durch die Auswahl der Agarosekonzentration kann die Auftrennung je nach Größe der zu trennenden Nukleinsäuren optimiert werden. Die Auftrennung von 0,1-20 kbp langer Nukleinsäuren kann in einem Agarosegel der Konzentration von 0,8-2,0 % erreicht werden.

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration in 1xTAE Puffer durch kurzes Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und mit 1-2 Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,7 mg/ml) vermischt. Die Proben wurden in einem 1:6 Verhältnis mit 6x Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren wurde in einem elektrischen Feld mit 100 – 160 V für 20 – 45 min durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert unspezifisch in die DNA und ermöglicht eine Detektion der Nukleinsäure bei einer Wellenlänge von $\lambda = 312$ nm. Das Gel wurde fotografisch dokumentiert (BioRad, ChemieDoc Touch Imaging System).

TAE Puffer: 40 mM TRIS Acetat (pH 8.0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

DNA Ladepuffer: 3 ml Glycerol (30 %), 25 mg Bromphenolblau (0,25 %), 7 ml ddH₂O

2.4.2 Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten nach einer Agarose-Gelelektrophorese wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) genutzt.

Nach der Trennung im Agarosegel wurden die DNA Fragmente mittels eines Skalpell auf einem UV-Transilluminator ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach den Herstellerangaben. Das Aufreinigungsprinzip basiert auf der Bindung von Nukleinsäuren unter Hoch-Salzbedingungen an die Kieselgelsäule des Extraktions Kits während die Elution unter Niedrig-Salz-Bedingungen stattfindet. Die DNA wurde in 20 – 50 µl TE Puffer oder nukleasen-freiem Wasser eluiert und bei -20 °C gelagert.

TE Puffer: 10 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA

2.4.3 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA Fragmenten

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis *et al.*, 1986) wurde chromosomale oder Plasmid DNA als Matrize verwendet. Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction: PCR) ist eine extrem sensitive Methode zur selektiven Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen. Der Ziel-DNA Abschnitt wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primern), die an die flankierenden Regionen der DNA, strang-spezifisch und antiparallel entsprechend der Hybridisierungstemperatur binden, amplifiziert. Die Hybridisierungstemperatur ist dabei hauptsächlich von der Basenkomposition der Primer abhängig, die sich wie folgt berechnen lässt (Patel *et al.*, 1984):

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = [(\text{Anzahl A und T Basen}) * 2^{\circ}\text{C} + (\text{Anzahl G und C Basen}) * 4^{\circ}\text{C}] - 5^{\circ}\text{C}$$

Die PCR läuft in vier grundlegenden Schritten ab. Zuerst muss der DNA Doppelstrang denaturiert werden. Dazu wird der Reaktionsmix auf 95 °C erhitzt, sodass die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen aufgelöst werden. Im nachfolgenden Schritt findet die Anlagerung („Annealing“) der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA statt. Nach dem 30 s – 1 min langen Anlagerungsschritt wird der Reaktionsmix auf 72 °C erhitzt. Dies ist die optimale Reaktionstemperatur der verwendeten DNA Polymerasen. In Einzelfällen, z.B. bei schwer zu amplifizierenden Matrizensträngen, wurde die Elongationstemperatur auf 68 °C erniedrigt, was in einer niedrigen Synthesegeschwindigkeit resultiert und die Amplifikation von sehr GC oder sehr AT reichen Regionen bzw. repetitiven Sequenzen ermöglicht. Die Elongationsreaktion der DNA beginnt am Ende der Oligonukleotidsequenz am freien 3‘ OH Ende in 5‘ zu 3‘ Richtung. Die Schritte der Denaturierung, Annealing und

Elongation werden cyclisch wiederholt (30 - 40 Zyklen), sodass die Ziel-DNA exponentiell vervielfältigt wird. Eine typische PCR lief wie folgt ab.

	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I.	Denaturierung (initial)	5 min	95 °C
II.	Denaturierung	30 s	95 °C
III.	Annealing 35x	30 s	} variabel
IV.	Elongation	variabel	
V.	Elongation (final)	5 min	72 °C

2.4.4 Plasmidisolation

Zur Präparation von Plasmiden aus bakteriellen Zellen wurde das „QIAGEN Plasmid Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. Das Aufreinigungssystem basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim and Doly, 1979) mit anschließender Bindung der DNA unter Hoch-Salz-Bedingungen an eine Silikat-Säule (siehe: 2.4.2). 4 – 6 ml einer Übernachtskultur der bakteriellen Zellen, die das Zielplasmid tragen, wurden geerntet und entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Elution wurden in der Regel 30 – 50 µl doppelt destilliertes Wasser oder der im Kit enthaltene TE Puffer verwendet.

2.4.5 DNA Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten nach einer PCR Reaktion wurde mittels dem „PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerinformationen durchgeführt.

2.4.6 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid DNA und PCR-Produkten wurde durch die Abteilung Genomanalytik (HZI, Braunschweig) durchgeführt.

2.5 Generation von Deletionsmutanten und Klonierung

2.5.1 DNA Restriktion

Zur Integration von DNA Fragmenten in einen Vektor wurde das PCR-Produkt mittels Restriktionsenzymen (NEB, England) geschnitten. Restriktionsenzyme erkennen spezifische palindrome Sequenzen, die mittels Primer während der PCR Reaktion an die Ziel-DNA amplifiziert wurden. Vektor und PCR Produkt wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen bei 37 °C für 2 h geschnitten. Ein typischer Restriktionsansatz sah wie folgt aus:

Plasmid DNA/PCR Produkt (1 – 2 µg)	5 µl
Restriktionsenzym 1	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	0,5 µl
CutSmart Puffer	10 µl
ddH₂O	34 µl

2.5.2 Dephosphorylierung von Vektoren

Zur Vermeidung von Re-Ligationsreaktionen wurde der Vektor nach der Restriktion (2.5.1) am 5' - Ende dephosphoryliert. Zu 20 µl Vektor-Restriktionsansatz wurden 2 µl „Antarctic Phosphatase“ und 2 µl „Antarctic Phosphatase“ Puffer (NEB, England) zugegeben und bei 37 °C für 15 min im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 5 min gestoppt.

2.5.3 DNA Ligation

Um ein DNA – Fragment in einen Vektor zu ligieren, wurde die T4-DNA Ligase von NEB (England) verwendet. Der Ligationssansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA Fragment	8 μ l
Vektor DNA	0,5 μ l
T4 DNA Ligase	0,5 μ l
Ligations Puffer	1 μ l

Die Ligation wurde wahlweise für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht auf Eis inkubiert. Für den Ligationsansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die optimale Menge an Insert wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$50 \text{ ng} * \text{Länge des Inserts (bp)} / \text{Länge Plasmid (bp)} * 5 = \text{Menge an Insert in ng}$$

Das optimale Verhältnis von Vektor und Insert sollte ca. 1:5 betragen.

2.5.4 Generation von Deletionsmutanten mit dem Lambda Red System

Zur Generierung von $\Delta csrA$ Deletionsmutanten wurde das „lambda red system“ (Datsenko and Wanner, 2000) verwendet. Das System basiert auf der homologen Rekombination, ist unabhängig von Restriktionsschnittstellen und wird zur direkten Modifikation von DNA genutzt. Das „lambda red system“ besteht aus drei hauptsächlichen Komponenten des bakteriellen lambda Phagen: **Gam** inhibiert die bakteriellen endogenen Nukleasen RecBCD und SbcCD und verhindert so den Abbau der zu transformierenden linearen DNA. **Exo** ist eine 5' - 3' dsDNA abhängige Exonuklease, die doppelsträngige DNA beginnend vom 5' -Ende abbaut. So entstehen zwei mögliche Produkte, ein dsDNA Duplexmolekül mit Einzelstrang 3' Überhang oder eine ssDNA (hierbei wird bei kurzen Fragmenten der komplette komplementäre Strang abgebaut). **Beta** ist ein Protein, welches an die von Exo generierte ssDNA bindet und die homologe Rekombination unterstützt. Zur Integration von ssDNA wird nur Beta benötigt. Die Phagengene, die zur homologen Rekombination mittels „lambda red systems“ benötigt werden, sind auf dem Vektor pKD46 codiert, der über einen thermosensitiven Replikationsursprung verfügt.

Zur Generation des Deletionsfragments wurden 500 Bp der flankierenden Regionen von *csrA* „upstream“ und „downstream“ amplifiziert und mittels der genutzten Oligonukleotide homologe Sequenzen von 20 – 25 Bp an das jeweilige 3' -Ende synthetisiert. Als Selektionsmarker wurde die Antibiotikakassette aus pKD4

amplifiziert. Die resultierenden drei Fragmente wurden in einer Fusions-PCR zu einem PCR-Fragment fusioniert. Das Fusions-PCR Produkt wurde für die Transformation genutzt (**Abbildung 13**).

Der Vektor pKD46 wurde in den Zielstamm (*E. coli* O127:H6 E2348/69) transformiert und bei 30 °C angezogen. Zum Start der frühen exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,2) wurde die Expression der „lambda red“ Proteine Gam, Exo und Beta durch Induktion des Arabinose Promotors, mittels Zugabe von Arabinose in einer finalen Konzentration von 0,2 %, induziert. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen und mit dem PCR Produkt transformiert. Die transformierten Zellen wurden für 2 h bei 37 °C aerob kultiviert und anschließend auf einer Selektions-Agar-Platte selektiert.

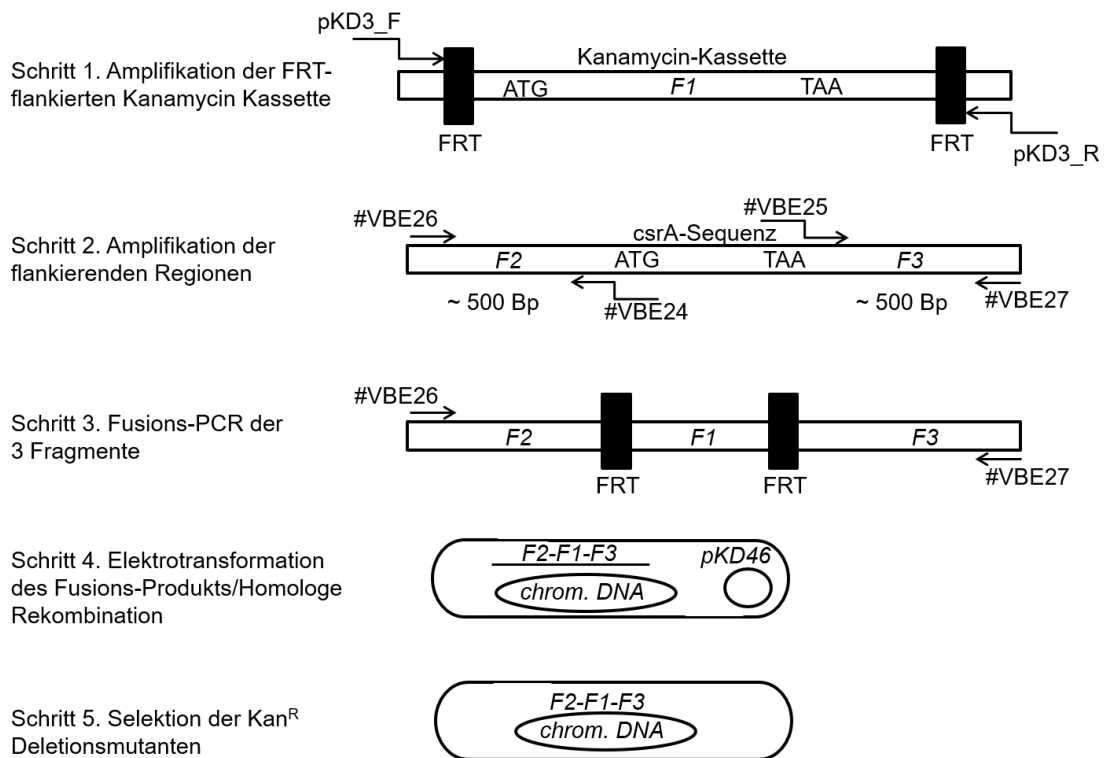


Abbildung 13: Fusions-PCR und Generation der $\Delta csrA$ Deletionsmutante via λ red Rekombinase System.

2.6 Plasmid Konstruktion

2.6.1 Klonierung der pFU53 Screening Vektoren

Die Screening Vektoren basieren auf den pFU53 Vektor (Uliczka *et al.*, 2011). Der Vektor beinhaltet eine Ampicillin-Resistenz-Kassette, sowie die LuxCDABE Kassette, welche als Reporter für den Screen dient. Als „very low copy“ (~1 Kopie pro Zelle) Vektor trägt das Plasmid den pSC101* Replikationsursprung. Aufgrund seiner Größe (<10 kBp) und Kopienzahl ließ sich der Vektor nicht via Elektrotransformation in EPEC E2348/69 transformieren und es wurde anstatt dessen via Konjugation mit WM3064 transformiert. Die entsprechenden putativen Zielgene für den „Screening Assay“ wurden mittels PCR amplifiziert. Zur Klonierung wurden an das 5‘ Oligonukleotid zusätzlich die Erkennungssquenz für die Schnittstelle von XhoI und an das 3‘ Oligonukleotid die Erkennungssquenz für die Schnittstelle von NheI amplifiziert. Vektor und PCR-Produkt wurden in einem Doppelverdau geschnitten und anschließend ligiert. Es wurden Standard Klonier Techniken verwendet (siehe: 2.4.3, 2.4.4, 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3). Da der pFU53 Vektor nicht über einen OriT (ori RP4 mob) verfügt, wurde dieser aus dem Vektor pFU72 (AvrII und NotI) amplifiziert und über Restriktion und Ligation in pFU53 integriert.

2.6.2 Klonierung von *csrA* Überexpressionsvektoren

Zur Überproduktion von CsrA wurde *csrA* mit chromosomaler DNA von EPEC E2348/69 als Template amplifiziert und über Standard Klonier Techniken in pZE12luc oder pUC18 kloniert. Beide Vektoren verfügen über ein IPTG induzierbares lac-Promotorsystem und sind gängige Vektoren zur Überproduktion von Proteinen. Es wurden insgesamt vier unterschiedliche Überexpressionskonstrukte kloniert. Es wurde die *csrA* Sequenz alleine (IPTG induzierbar), sowie *csrA* mit nativem Promotor in den puc18 Vektor oder in den pZE12luc Vektor integriert. Beide Vektoren verfügen über einen „high copy“ Replikationsursprung (pZE12luc ColE1, puC18 pMB1) sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion. Die Effektivität der Überexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse gegen CsrA getestet.

2.7 Metabolomanalyse und -analytik

2.7.1 Kultivierungsbedingung für GC- und LC – MS Experimente

Für die Metabolom- bzw. Transkriptosstudie wurden aus einer Vorkultur je Teststamm sechs biologische Replikate in 500 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikane angeimpft. Die Start-OD₆₀₀ der Replikate wurde auf 0,05 (Kulturvolumen 120 ml) in M9_{mod.} angeimpft und bei 37 °C in einem Schüttelinkubator mit 160 UpM aerob kultiviert. Nach Erreichen der Ziel OD₆₀₀ von 1 wurden für die Metabolomstudie 25 ml Kultur in einen mit 25 ml eiskaltem Methanol (60 % (v/v) in ddH₂O) gefüllten 50 ml Falkons geerntet. Dieser Schritt dient dem schnellen Abstoppen der Enzymfunktionen der Zellen, ohne eine Zelllyse zu riskieren (Winder *et al.*, 2008). Die „gequenchte“ Zellsuspension wurde direkt bei 11.000 UpM, 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden anschließend im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion bei -80 °C gelagert. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Für die Transkriptomstudie wurde aus den identischen Kulturen je 3x 2 ml Zellkultur bei einer OD₆₀₀ von 1 geerntet (13.000 UpM, 4 °C, 2 min). Die Zellpellets wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Metaboliten Extraktion LC-MS

Die Zellpellets wurden in 600 µl 100 % Methanol (-20 °C) resuspendiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und direkt 600 µl ddH₂O zugefügt. Es folgten zwei weitere Zyklen von Schockgefrieren und anschließendem Auftauen. Zwischen den Zyklen wurden die Zellpellets in einem Ultraschallbad für 10 min inkubiert (Bandelin, SonoRex DigiPlug). Durch das Lösungsmittelgemisch, das Einfrieren und das Auftauen mit anschließender Ultraschallbehandlung, wurden die Zellen gezielt aufgeschlossen. Die Extrakte wurden für 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert, um Proteinbestandteile und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und über Nacht in einer Vakuumzentrifuge (Labconco, Refrigerated CentiVaP Concentrator) eingetrocknet. Die getrockneten Metabolitenextrakte wurden final in 30 – 100 µl Lösemittelpuffer gelöst und in Glasvials zur weiteren Analyse überführt. Bis zur

Messung wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Dem Extraktionslösemittel (100 % Methanol), sowie dem Lösemittelpuffer (Methanol/ddH₂O 1:1) wurden folgende interne Standards zur späteren Normalisierung zugefügt:

Tabelle 12: Interne Standards LC-MS (polare Extraktion)

Interner Standard	Lösungsmittel	Konzentration
Nortriptylin	Methanol	200 ng/ml
Trimethoprim	Methanol	200 ng/ml
Glipizid	Methanol	600 ng/ml
Koffein	Methanol: ddH ₂ O (1:1)	1 ng/ml
Naproxen	Methanol: ddH ₂ O (1:1)	8 ng/ml

2.7.3 Metaboliten Extraktion GC-MS

Die Extraktion für die GC-MS Proben entspricht dem Extraktionsprotokoll der LC-MS Proben (2.7.2). Zusätzlich wurden den extrahierten Proben, nach den Extraktionenszyklen, 1 ml Chloroform (Sigma-Aldrich, USA) zugegeben. Die Proben wurden intensiv gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (13.000 UpM, 2 min). Die obere Chloroform -Phase wurde abgenommen und zur späteren Analyse in frische 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Der polare Extraktionsmix wurde wie in 2.7.2 beschrieben in einer Vakuumzentrifuge über Nacht eingetrocknet. Dem Extraktionslösemittel (100 % Methanol) für die GC wurde Ribitol als interner Standard zugesetzt.

Ribitol Stammlösung: 0,05 g Ribitol in 250 ml ddH₂O

2.7.4 Lipid Extraktion LC-MS

Die Zellpellets (2.7.1) wurden in 500 μl eiskaltem Methanol resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgten drei Gefrier-Auftau-Ultraschall -Zyklen wie in 2.7.2 beschrieben. Nach dem letzten Extraktionsschritt wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben und die Proben intensiv gemischt. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend wurden 1,4 ml der

unpolaren Phase in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Daraufhin wurde bei 10.000 x g für 2 min in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert und die obere unpolare Phase vollständig abgenommen. Die Proben wurden unter einem konstanten Stickstofffluss (Techne, Sample Concentrator) eingetrocknet und final in 50 µl Lösungsmittelpuffer (80/20 v/v Chloroform/Methanol) aufgenommen. Es wurden dem Extraktions- bzw. Lösemittelpuffer interne Standards in folgender Konzentration zugesetzt:

Tabelle 13: Interne Standards für Lipid-Metabolom Analyse (LC-MS)

Extraktionspuffer	Stockkonz. µg/ml	Lösungsmittel
Methyl-Nonadecanoat	100	Chloroform
Squalen	100	Chloroform
Glipizid	1000	Methanol
Lösemittelpuffer		
N-Acetyl-Sphingosin	5,9	Chloroform
Methyl-Sterat	100	Chloroform

2.7.5 Lipid Extraktion GC-MS

Die Extraktion der Metaboliten für die GC-MS Analyse entspricht dem Protokoll der Extraktion, die in 2.7.4 beschrieben ist. Nach dem Eintrocknen unter Stickstoff wurde dem Metabolitenextrakt 1 ml Chloroform zugegeben und das Extraktionsgemisch in 4 ml „Glasvials“ übertragen. Es wurden folgende interne Standards für die GC-MS zugegeben:

Tabelle 14: Interne Standards für Lipid-Metabolom Analyse (GC-MS)

Extraktionspuffer	Finale Konzentration µg/ml	Lösungsmittel
Methyl- Nonadecanoat	100	Chloroform
Nonadecanoat	100	Chloroform
Heptadecanoat	1000	Chloroform

Anschließend fand die Derivatisierung der unpolaren Phase statt (2.7.7).

2.7.6 Derivatisierung der polaren Phase für GC-MS

Die polare Phase der GC-Proben wurde zuerst mit Methoxamine/Pyridine derivatisiert und anschließend durch MSTFA silyliert. Dazu wurden die Proben in 40 µl der Methoxamine/Pyridine (Methoxamine 20 mg/ml in Pyridine) Lösung (20 mg/ml w/v) gelöst und für 90 min bei 30 °C auf einem Schüttler (Eppendorf, Thermomix 5437) 1000 UpM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 60 µl MSTFA zum Reaktionsmix zugegeben, und die Proben wurden für weitere 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden direkt nach der Derivatisierung in der GC analysiert.

2.7.7 FAME Derivatisierung

Die Derivatisierung der Fette wird durch Umestern mit Methanol erreicht. Die in dieser Studie genutzte Reaktion ist durch die Säure BF_3 katalysiert. Bei der Reaktion wird Glycerin durch Methanol ausgetauscht, sodass Glycerin und „fatty acid methyl ester“ (FAMES) entstehen. Durch einen Überschuss an Methanol wird die Reaktion auf die Seite der Produkte (FAMES) verschoben. 1 ml extrahierte Lipid-Metaboliten in Chloroform wurden dazu in 4 ml „Glasvials“ überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125 µl BF_3 /Methanol 14 % (Sigma-Aldrich, UK) und Inkubation für 90 min bei 80 °C in einem Heizblock gestartet. Nach der Reaktion wurde das

Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von 300 µl ddH₂O gestoppt. Die stark unpolaren FAMES wurden durch die Zugabe von 600 µl Hexan (Sigma-Aldrich, UK) gelöst. Die organische Hexan-Phase wurde anschließend abgenommen und für mehrere Stunden unter dem Abzug eingetrocknet. Die FAMES wurden im Anschluss in 100 µl Hexan gelöst. Die Proben wurden bis zur Messung bei -80 °C in GC-Glasvials aufbewahrt.

2.7.8 HPLC-MS Analyse der polaren Extraktionsproben

Für die LC-MS Analyse wurden 3 µl pro Probe injiziert. Pro Stamm wurden sechs biologische und je zwei technische Replikate generiert. Zur Identifikation der Metabolite wurden pro Stamm und pro Messreihe eine Gesamtpoolprobe generiert. Dazu wurden je 2 µl der Proben in einem Glasvial zur weiteren Analyse „gepoolt“. Die generierten Proben wurden zusammen mit Blank-Proben sowie einer Qualitätskontrollprobe (**Tabelle 15**) randomisiert in einer Messreihe („Batch“) gemessen. Die Qualitätskontrollproben wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende der Batches gemessen, um Verschiebungen in der Massengenauigkeit und Retentionszeit während der Messreihe überprüfen zu können. Die Auftrennung erfolgte mittels „Ultra High Performance Flüssigchromatographie“ (UHPLC; Dionex Ultimate 3000, Bruker, USA) mit einer „reverse Phase“ Säule Phenomenex Kinetex 1,7 µ C18 150 x2,1 mm (Phenomenex, USA). Die Messung wurde bei einer Flussrate von 300 µl/min durchgeführt. Es wurde ein linearer Gradient gefahren. Die Säulenofentemperatur betrug 40 °C. Die mobile Phase setzte sich wie folgt zusammen:

Lösungsmittel A: Wasser + 0,1 % Ameisensäure

Lösungsmittel B: Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure

Start:	1 % B / 99 % A
2 min	1 % B / 99 % A
20 min	100 % B
25 min	100 % B
30 min	1 % B / 99 % A

Tabelle 15: Qualitätskontrollprobe

Standard	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Finale Konzentration [µmol/l]
2-Methoxybenzoesäure	10	20
Biochanin A	1	20
Ferulasäure	10	20
3-Indoleacetonitrile	1	20
Indole-3-carbaldehyd	2	20
Kaempferol	0,25	20
Kinetin	1	20
p-Cumarsäure	10	20
L- (+) -alpha-Phenylglycin	1	20
Phlorizin Hydrat	10	20
Rutin Trihydrate	1	20
Indole-3-Acetyl-L-Valin	1	20

Die Proben wurden mit einem “Quadrupol time of flight” Massenspektrometer Bruker Daltonics maXis HD QToF (Bruker, USA) gemessen. Es wurde mittels „Elektrospray“ Ionisierung ionisiert und im „positive ion mode“, sowie im „negative ion mode“ gemessen. Die Scan-Bandweite für alle Messungen war 50-1500 m/z. Die Scan-Frequenz betrug 4 Hz. Pool Proben wurden im Auto-MSMS mode gemessen

(positiv- und negativ-Modus). Eine interne Kalibration wurde mit Hilfe der „Natrium Formiat Cluster“ und einer „Lock mass“ (622,0290 m/z) Kalibrierung durchgeführt. Die exakten MS Parameter sind in **Anhang XIX** als Acquisition Report angegeben.

2.7.9 HPLC-MS Analyse der unpolaren Extraktionsproben

Das prinzipielle Mess-Setup entspricht dem der polaren Extraktionsproben (2.7.8). Von jeder Probe wurden 2 µl injiziert. Als Qualitätskontrolle diente ein Lipid-Mix (SPLASH LipidMIX™ Internal Standard, Avanti Polar Lipids, USA), der zu Beginn, nach 30 Injektionen und am Ende der Messung, gemessen wurde. Aufgrund der unpolaren Proben wurde eine C8 (Phenomenex Kinetex 1,7 µ RP8 100 x2,1 mm) Säule verwendet. Die Flussrate betrug 300 µl/min. Es wurde ein linearer Gradient gefahren. Die Säulenofentemperatur lag bei 60 °C. Die mobile Phase setzt sich wie folgt zusammen:

Lösungsmittel C: Wasser + 20 mM NH₄-Formiat

Lösungsmittel D: Acetonitril

Start:	75 % C / 25 % D
3 min	45 % C / 55 % C
15 min	34 % C / 66 % D
20 min	75 % C / 25 % D
30 min	75 % C / 25 % D

Es wurde jeweils im positiv und negativ Modus gemessen.

2.7.10 GC-MS Analyse der polaren Extraktionsproben

Zur Analyse der polaren Extraktionsprobe mittels GC-MS wurde 1 µl pro Probe splitfrei injiziert. Zu Beginn und am Ende einer Messreihe sowie für alle fünf Proben wurde ein Alkan Mix (Decan, Undecan, Dodecan, Tridecan, Pentadecan, Octadecan, Nonadecan, Docosan, Pentacosan, Ocatacosan, Dotriacontan, Hexatriacontan) zur Qualitätskontrolle und Kalibrierung injiziert. Pool-Proben, Blanks und die einzelnen

Proben wurden wie schon in **2.7.8** beschrieben, randomisiert gemessen. Nach zehn Messproben wurde zusätzlich ein Waschschrift mit Cyclohexan durchgeführt. Die Analyse fand auf einem „Thermo Trace Ultra GC - ITQ900MS GC-MS“ (Thermo, USA) statt. Die verwendete Säule war eine Phenomenex ZB-5MS Säule 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Partikelgröße und plus 5 m integrierte Vorsäule. Die Temperaturbedingungen im Injektor waren von 70 °C auf 180 °C bei einer Steigerung von 14 °C/s eingestellt. Die Säulentemperatur wurde bei einer Initialtemperatur von 70 °C für eine Minute gestartet und pro Minute um 8 °C auf bis zu 330 °C gesteigert. Die Heliumdurchflussrate betrug 1,2 ml/min. Es wurde Elektronenstoß-Ionisation (EI+) zur Ionisierung der Metaboliten genutzt bei einer Energie von 70 eV und mit einer m/z Akquisitions Bandbreite von 50 – 600 m/z im „full scan mode“.

Tabelle 16: Alkan Zeitstandard (Retentionsindex Kalibrationsmix).

Alkan	Einwaage [mg]	Finale Konzentration [g/l]
Decan, C ₁₀ H ₂₂	12,5 mg bzw. 17,1 µl	0,5 g/L
Dodecan, C ₁₂ H ₂₆	12,5 mg bzw. 16,7 µl	0,5 g/L
Pentadecan, C ₁₅ H ₃₂	12,5 mg bzw. 16,2 µl	0,5 g/L
Nonadecan, C ₁₉ H ₄₀	12,5 mg	0,5 g/L
Docosan, C ₂₂ H ₄₆	12,5 mg	0,5 g/L
Octacosean, C ₂₈ H ₅₈	12,5 mg	0,5 g/L
Dotriacontan, C ₃₂ H ₆₆	12,5 mg	0,5 g/L
Hexatriacontan, C ₃₆ H ₇₄	12,5 mg	0,5 g/L

2.7.11 GC-MS Analyse der unpolaren Extraktionsproben

Die FAMEs wurden mit dem gleichen Instrumenten-Setup gemessen wie die polaren Metaboliten. Es wurde je 1 µl Probe einmal „splitless“ und in einem zweiten Batch mit einem 1:20 Split gemessen. Zur Kalibration wurde der Alkan Mix wie schon in 2.7.10 beschrieben eingesetzt. Von jeder Probe wurde ein Volumen von 1 µl injiziert. Die Temperaturbedingungen im Injektor waren von 60 °C auf 140 °C bei einer Steigerung von 20 °C/s. Die Säulentemperatur wurde jeweils um 5 °C/min auf bis zu 325 °C gesteigert. Es wurde Elektronen-Ionisation (EI+) zur Ionisierung der Metaboliten genutzt, bei einer Energie von 70 eV und „full scan mode“ mit einer m/z Akquisitions Bandbreite von 50-700 m/z. Als Qualitätskontrolle und zur späteren Identifikation wurde ein BAME-Mix (Sigma-Aldrich, Deutschland) sowie ein FAME Mix (Sigma-Aldrich, Deutschland) je am Anfang und am Ende, sowie alle zehn Proben vermessen.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 CsrA Expression Protein-Aufreinigung

Zum Nachweis von Protein-RNA Interaktionen wurde CsrA mit einem C-terminalen His₆ Tag Epitop von pAKH172 exprimiert. Dazu wurde der Vektor in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Zur Expression von CsrA wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ ~0,5 in 500 ml DYT Medium (Kanamycin 100 µg/ml) wachsen gelassen und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG für 5 h bei 18 °C induziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet (10 min, 6.000 UpM, 4 °C). Das Zellpellet wurde bei -20 °C gelagert. Für die Aufreinigung wurde das Zellpellet in 10 ml CsrA Lyse Puffer resuspendiert (20 mM Imidazole und „complete EDTA-free protease Inhibitor cocktail“; Roche, Schweiz). Die Zellen wurden mittels einer „French Press“ (G. Heinemann, Deutschland) mit vier Durchgängen und einem Druck von 18.000 Psi aufgeschlossen. Mittels Zentrifugation bei 18.000 x g, 4 °C, 30 min wurden Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde anschließend mittels einer Ni-NTA Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Schritte im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Die Säule wurde mit 10 ml Lyse Puffer äquilibriert. Der Proteinüberstand wurde auf die Säule

geladen und in einem 15 ml Falcon aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit zweimal 10 ml Waschpuffer gewaschen und die Durchläufe gesammelt. Die Elution wurde mit sechsmal 500 µl Elutionspuffer durchgeführt. Alle Fraktionen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Elutionspuffer gespült und daraufhin in 20 % Ethanol gelagert. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden anhand eines Bradford Assays (2.8.2) auf ihre Proteinkonzentration hin untersucht. Die Proteindetektion erfolgte bei 595 nm. Die Elutionsproben wurden mittels SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung auf Reinheit untersucht. Die Probe mit der höchsten Proteinkonzentration wurde über Nacht bei 4 °C gegen ein 1000x Volumen an Lysepuffer dialysiert. Dialysierte Proteine wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.8.2 Bradford Assay

Der Bradford Assay ist eine Standard Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen und basiert auf der Farbreaktion von Triphenylmethan Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) mit Proteinen. CBBG bildet in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. In ungebundener Form liegt das Absorptionsspektrum bei 470 nm, welches sich durch die Komplexbildung auf 595 nm verschiebt und ermöglicht so eine quantitative Bestimmung von Proteinen anhand einer photometrischen Messung. Zur Kalibrierung wurde eine BSA Verdünnungsreihe (0, 25, 125, 250, 500, 1.000, 1.500, 2.000 µg/ml) vermessen. Dazu wurden 5 µl der BSA Proben bzw. der CsrA Probe mit 250 µl Bradford Reagenz für 5 min bei Raumtemperatur in einer 96-Well Platte inkubiert. Die Proben wurden als Triplikate photometrisch in einem SunriseTM Mikrotiterplatten Plattenreader (Tecan, Schweiz) gemessen.

2.8.3 SDS Page

Die Größen- bzw. Massentrennung von Proteinen wurde mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Ungefaltete, denaturierte, und zusätzlich partiell negativ geladene Proteine werden innerhalb eines elektrischen Feldes von der Anode angezogen, hierbei werden sie durch den Siebeffekt der Polyacrylamidgelmatrix der Größe nach aufgetrennt. Die

Denaturierung und die negative Partialladung wurde durch kurzes Aufkochen (10 min, 90 °C) in SDS Probenpuffer induziert. In dieser Studie wurde die SDS-PAGE als vertikale Elektrophorese im „Mini-PROTEAN® tetra Cell System“ (Bio-Rad, USA) durchgeführt. Abhängig von dem Molekulargewicht wurden Trenngele von 10 – 15 % genutzt. Das Ladegel hatte eine Polyacrylamidkonzentration von 5 %. Kleine Proteine (z.B. CsrA) wurden mittels Tris-Tricine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (Schagger, 2006).

Tabelle 17: SDS Polyacrylamidelektrophorese

Zusammensetzung	Ladegel	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %
Ladegelpuffer	2,5 ml	-	-
Trenngelpuffer		2,5 ml	2,5 ml
30 % (w/v) Polyacrylamide	1,1 ml	4,0 ml	5 ml
ddH ₂ O	6,5 ml	3,5 ml	2,5 ml
APS 10 %	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 18: Tris-Tricine SDS Polyacrylamidelektrophorese

Zusammensetzung	Ladegel	Trenngel 15 %
3 x Gel Puffer	3,1 ml	5 ml
Glycerol	-	1,5 ml
30 % (w/v) Polyacrylamid	1,1 ml	7,5 ml
ddH ₂ O	7,6 ml	1,5 ml
APS10 %	150 µl	50 µl
TEMED	15 µl	15 µl

2.8.4 Western-Blot

Ein spezifischer Nachweis bestimmter Proteine wurde mittels Western-Blot und anschließender Immunodetektion durchgeführt (Towbin *et al.*, 1979). Nach der SDS-PAGE wurden die Gele elektrophoretisch auf eine hydrophobe Immobilon®-P PVDF Membran (Sigma, UK) transferiert und immobilisiert. Die PVDF Membran wurde vor Gebrauch für 15 s in 100 % Methanol aktiviert und daraufhin kurz in ddH₂O gewaschen

und anschließend für 5 min in 1x Transfer Puffer inkubiert. Die Membran wurde auf das Gel gelegt. Zum Feuchthalten wurden jeweils zwei in 1x Transfer Puffer getränkte „Whatman Paper“ (Neolab, Deutschland). auf die Membran bzw. unter das Gel gelegt. Der Transfer wurde in einem „Semi-Dry-Blotter“ (BioRad, TransBlot SD SemiDry Transfer Cell) durchgeführt. Die Proteine wurden mit einer Stromstärke von 1.5 – 2 mA/cm² für 30 – 60 min auf die Membran geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran in Block-Lösung (5 % Milchpulver (w/v in TBS) für 30 min bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Anti CsrA, 1:5000) in Blocklösung (**Tabelle 4**) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und ggf. erneut mit dem 2. Antikörper (Anti rabbit, 1:2000) in Blocklösung inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in TBS-T erfolgte die Immunodetektion mit dem „Western Lightning ECL II kit“ (Perkin Elmer, USA) und anschließender Dokumentation mit dem ChemiDoc XR+ System (Bio-Rad, USA). Die Immunodetektion basiert auf der an dem zweiten Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP).

2.8.5 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Zur qualitativen Analyse wurden Proteine nach der SDS-PAGE ggf. mittels des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dazu wurden die Gele in Coomassie Arbeitslösung (Coomassie-Brilliant-Blau G250 20 % (v/v), Isopropanol 10 % (v/v), Essigsäure 10 % (v/v)) über Nacht auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gele wurden nach der Inkubation dreimal mit Wasser gewaschen.

2.8.6 RNA EMSA

Der „CsrA-Bandshift“ Assay ist ein Verfahren zum Nachweis von direkter Protein RNA – Interaktion. Durch das Binden von CsrA an Sequenzen in der 5'UTR der Test-RNA lässt sich mit elektrophoretischer Auftrennung ein „Bandenshift“ nachweisen, der umso stärker ist, je höher die eingesetzte Proteinkonzentration gewählt wurde. Zur Amplifikation der Testsequenzen wurden die Primer (**Tabelle 9**) sowie chromosomale DNA von *E. coli* O127:H6 gewählt. Das PCR Produkt wurde mittels PCR- „Clean up Kit“ gereinigt und aufkonzentriert und anschließend für die „in vitro“

Transkription genutzt. Die RNA wurde mit Hilfe des „TranscriptionAid T7 High Yield Transcription Kit“ (Fermentas, USA) generiert (2.3.4) und anschließend mit Biotin am 5'Ende markiert (2.3.5). Für die Bindungsreaktion von RNA und CsrA wurden 2 nM Biotin-markierte RNA und unterschiedliche Konzentrationen von CsrA (0; 2,5; 5; 10; 25; 5; 100 [nM] finale Konzentration) für 20 min auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurde HNS-RNA (AG Molekulare Mikrobiologie, HZI) in einer Konzentration von 2 nM zugesetzt. Die RNA und die jeweilige Konzentration an CsrA wurden in einem finalen Volumen von 10 µl in CsrA „Bandshift Puffer“ angesetzt. Der komplette Ansatz wurde auf ein TBE Gel (2.8.7) geladen.

Test-RNA	2,5 µl
CsrA	5 µl
HNS-RNA	2,5 µl (Negativkontrolle)

Als Positivkontrolle wurde RovC (AG Molekulare Mikrobiologie, HZI) markierte RNA bei einer CsrA Konzentration von 0 und 100 nM verwendet.

2.8.7 TBE – Gel (RNA EMSA)

Zur Auftrennung der EMSA Proben wurde ein TBE-Gel verwendet. Die Zusammensetzung des Gels war folgende:

ddH₂O	8 ml
40 % Polyacrylamid	1 ml
10x (TBE)	1 ml
TEMED	10 µl
10 % APS	100 µl

Ein Gel-Vorlauf wurde für 15-20 min bei 90 V durchgeführt. Anschließend wurden die Proben geladen und das Gel für 45-60 min bei 80 V mit einmal TBE als Laufpuffer laufen gelassen. Anschließend erfolgte ein „Semi Dry Blot“ (30 min, 20 V). Die RNA wurde auf der Nylonmembran (Roche, Schweiz) durch „Crosslinken“ (Stratalinker®,

Stratagene, USA) bei 120.000 μJ fixiert. Im Anschluss daran erfolgte die Membranentwicklung mittels „Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit“ (Fisher Scientific).

2.8.8 Detektion Biotin-markierter RNAs

Die Membranentwicklung erfolgte mittels „Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit“ (Thermo Scientific) mit allen zugehörigen Puffern und Lösungen. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem 50 ml Falcon auf einem Rollinkubator bei Raumtemperatur. Aufgrund der geringen Volumina wurden die Puffer nach jedem Inkubationsschritt mittels Pipette vollständig entfernt. 5 ml der Blocklösung sowie 20 ml Waschpuffer wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad ($\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) vorgewärmt, um das enthaltende SDS zu lösen. UV-fixierte Membranen wurden für 15 min in 5 ml Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-HRP Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 zugegeben und erneut für 15 min inkubiert. Die Membran wurde viermal mit 5 ml 1x Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit 5 ml Equilibrations Puffer equilibriert. Die Membran wurde in 1 ml Chemiluminescent Substrat Arbeitslösung (500 μl „Luminol/Enhancer“ Lösung + 500 μl „Stable Peroxide“ Lösung) entwickelt. Die Detektion der RNA erfolgte in einem ChemiDocTM XRS+ „Imaging System“ (Bio-Rad, USA).

2.8.9 Urea-TBE-Gel zur Trennung von RNA Fragmenten

Zur Analyse der RNAs nach der „in vitro“ Transkription wurde 500 ng – 1 μg RNA auf ein 8 % TBE-Urea Gel geladen:

Harnstoff (6M)	4,2 g
10 x TBE	1 ml
40 % Polyacrylamid	2 ml
10 % APS	30 μl
TEMED	10 μl

Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für 60 min. Das Gel wurde in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend in einer ChemiDoc™ XRS+ „Imaging System“ (Bio-Rad, USA) detektiert.

2.8.10 Isolation von Kolansäure

Kolansäure oder M-Antigen ist ein Bestandteil der Exopolysaccharidmatrix und charakteristisch für pathogene *E. coli* Stämme. Verstärkte Produktion von Kolansäure schützt die Zelle in einer sauren Umgebung, indem sich die Kolansäure wie eine schützende Kapsel um die Zelle legt. Zur Isolation der Kolansäure (Bergmaier *et al.*, 2001) wurden 50 ml einer Übernachtskultur für 15 min bei 100 °C erhitzt und somit die Proteinbestandteile der Zelle denaturiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 30 min bei 11.000 x g, 4 °C für 30 min zentrifugiert. 40 ml des Überstandes wurden mit dem dreifachen Volumen Ethanol (4 °C) präzipitiert und anschließend für 12 h bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension für 30 min bei 11.000 x g, 4 °C zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 5 ml ddH₂O gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einer Dialysekassette (MWCO 3500 Da, Thermo Fisher Scientific) für 48 h gegen ddH₂O dialysiert. Nach dem Dialyseschritt wurde das Dialysat in einer Vakuumzentrifuge bei 4 °C über Nacht eingedampft. Polypeptide, die nicht durch die Dialyse entfernt werden konnten, wurden durch anschließende Zugabe von 5 ml 10 % (v/v) Trichloressigsäure präzipitiert und anschließend durch erneute Dialyse gegen ddH₂O für fünf Tage entfernt. Die erhaltene Kolansäure wurde anschließend eingedampft und final in 1 ml ddH₂O gelöst.

2.8.11 Quantitative Bestimmung der Kolansäure

Die Quantifizierung der Kolansäure basiert auf der photometrischen Detektion von Fucose (6-deoxy-Hexose) (Dische and Shettles, 1951). Fucose ist ein Zucker, der in Bakterien ausschließlich als Bestandteil der Kolansäure vorkommt und nicht durch Dialyse entfernt werden kann. 10 – 100 µl der Kolansäure- Proben wurden in 1 ml ddH₂O und mit 4,5 ml Schwefelsäure (6:1, v/v) gemischt. Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 100 °C inkubiert und daraufhin auf Raumtemperatur abgekühlt. Eine Normalisierung für die unspezifische Farbreaktion wurde wie folgt

durchgeführt. Die Extinktion wurde für jede Probe bei einer Wellenlänge von 396 nm und 427 nm (Kontrollprobe) und nach der Zugabe von 100 µl Cystein-Hydrochlorid (Cysteinprobe) in einem Spektralphotometer gemessen. Die Extinktion der Kontrollprobe wurde von der Extinktion der Cysteinprobe subtrahiert (ΔA_{396} , ΔA_{427}). Die Differenz von $\Delta A_{396} - \Delta A_{427}$ der Proben wurde gegen eine Standardkurve von Fucose (5 – 100 µg/ml) korreliert.

2.8.12 Quantitative Bestimmung der mikrobiellen Exopolysaccharide (EPS)

Die quantitative Bestimmung der EPS (Mendrygal and Gonzalez, 2000) wurde wie folgt durchgeführt. Die *E. coli* Teststämme wurden über Nacht auf einer Agarplatte bei 37 °C inkubiert. 60 mg Bakterienmasse wurden mittels Drigalskispatel vorsichtig von der Platte entnommen und in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ der Zellsuspension bestimmt und die Probe für 10 min bei 100 °C in einem Heizblock inkubiert, um etwaige Enzymaktivitäten zu unterbinden. Die Proben wurden daraufhin für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Für den folgenden Assay wurde ausschließlich der Überstand verwendet. 400 µl jeder Probe wurden mit 100 µl frisch angesetzter Anthron-Lösung 2 % in Ethylacetat vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml konzentrierter Schwefelsäure gestartet. Nach Ablauf der Reaktion und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm mit einem Spektrophotometer (Eppendorf, Biophotometer) gemessen. Als „Proxy“ für die EPS Menge wurde der Extinktionswert gegen eine Glucose Kalibrationskurve (10 – 100 µg/ml) korreliert und gegen die OD₆₀₀ der Zelldichte normalisiert.

2.9 Elektronenmikroskopie

Probenvorbereitung und Mikroskopie von *E. coli* O127:H6 und der $\Delta csrA$ Deletionsmutante wurden von Manfred Rohde (Zentrale Einheit für Mikroskopie, HZI) durchgeführt.

2.9.1 Rasterelektronenmikroskopie

Übernachtskulturen der Proben wurden mit 2 % Glutaraldehyd und 5 % Formaldehyd in HEPES Puffer (0,1 M HEPES, 0,09 M Sucrose, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 6,9) bei 7 °C über Nacht fixiert. Objektträger mit einem Durchmesser von 12 mm wurden für 5 min mit Poly-L-Lysin Lösung (Sigma, München) beschichtet und anschließend mit ddH₂O gewaschen und an der Luft getrocknet. Auf die Objektträger wurden 50 µl der fixierten Proben aufgetragen und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde erneut in 1 % Glutaraldehyd in TE Puffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt nach der Inkubationszeit mit TE Puffer gewaschen. Die Proben wurden im Anschluss daran in einem Aceton Bad (Aceton 10, 30, 50, 70, 90, 100 %) für je 10 min dehydratisiert. Die Dehydratisierung wurde für jeden Schritt auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem CO₂ überkritisch getrocknet (CDP 300 Leica, Wetzlar). Die getrockneten Proben wurden danach mit einem Gold-Palladium Film durch Kathodenzerstäubung beschichtet (SCD 500 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Die mikroskopische Untersuchung wurde in einem Zeiss-Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop von Merlin (Oberkochen) unter Verwendung des Everhart Thornley SE-Detektors und des Inlens SE-Detektors im Verhältnis 50:50 mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kVf durchgeführt. Der Kontrast und die Helligkeit der Abbildungen wurde mit Adobe Photoshop C5 adjustiert.

HEPES Puffer: 0,1 M HEPES, 0,09 M Sucrose, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 6,9)

TE Puffer: 10 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA

2.9.2 Negativ Färbung

Dünne Kohlenstoffträgerfilme wurden durch Sublimation von Kohlenstoff auf einer frisch gespaltene Glimmeroberfläche hergestellt. Bakterien wurden mit 1 % (w/v.) wässrigem Uranylacetat, pH 5,0, nach dem Verfahren von (Valentine *et al.*, 1968) negativ gefärbt. Die Proben wurden mit 300 Mesh-Kupfergittern gesammelt, mit TE-Puffer und mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Proben wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop TEM 910 (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersucht. Bei kalibrierten Vergrößerungen wurden die Bilder mittels Linienreplik aufgenommen. Die Bilder wurden mit einer „Slow-Scan-CCD-Kamera“ (ProScan, 1024 x 1024, Scheuring,) mit ITEM-Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster) digitalisiert.

TE-Puffer (20 mM TRIS, 2 mM EDTA, pH 6,9)

2.10 Statistische Methoden und Auswertung

2.10.1 Metabolom Datenprozessierung LC-MS mit XCMSonline

Die Rohdaten wurden mit der Bruker-eigenen Exportsoftware als mzXML.data exportiert und auf XCMSonline analysiert [<https://xcmsonline.scripps.edu/>]. Es wurden Standardparameter von XCMS-online verwendet, falls nicht anders angegeben. Die „Feature Detektion“ wurde anhand des „CentWave“ Algorithmus mit einer Maximaltoleranz von 5 ppm m/z Abweichung zwischen den „Scans“ durchgeführt. Die Retentionszeit-Korrektur wurde mit dem „Obiwrap“ Algorithmus (1 m/z stufenweise) durchgeführt. Die genauen XCMSonline Parameter sind in **Tabelle 19** angegeben:

Tabelle 19: XCMS-online Parameter

Feature Detektion	Wert	Beschreibung
(cent wave)		
ppm	10	Maximal tolerierte m/z Abweichung in aufeinanderfolgenden Scans
Minimale Peakweite	10,9	Minimum Peakweite (Chromatogramm) in s
Maximale Peakweite	31,12	Maximum Peakweite (Chromatogramm) in s
Retentionszeitkorrektur		
(obiwarp)		
„profStep“	1	Stufenweise (in m/z) zur Profilgenerierung ausgehend von den Rohdaten
Alignment		
Feature-Detektion	Wert	Beschreibung
bw	5	zulässige Abweichungen in der Retentionszeit in s.
Minfrac	1	Mindestfraktion von Proben, die in mindestens einer der Probengruppen notwendig ist, damit sie eine gültige Gruppe darstellt.
mzwid	0,026	Breite überlappender m / z-Schichten, die zum Erstellen von Chromatogrammen mit Peak-Dichte und zum Gruppieren von Peaks über Proben hinweg verwendet werden.

2.10.2 Annotation der LC-Daten

Statistisch signifikant regulierte „Features“ wurden mit Hilfe der METLIN Metaboliten Datenbank (Smith *et al.*, 2005) sowie der *E. coli* Metabolom (Guo *et al.*, 2013) Datenbank abgeglichen. Die Identifizierung wurde durch den Abgleich der m/z, der Retentionszeit sowie der MS/MS Fragmentierung gegen eine Metabolitenbibliothek (HZI, Abteilung chemische Biologie) durchgeführt. Die CBIO Metabolitenbibliothek umfasst 587 Metabolite, die als reine Standards auf demselben System unter gleichen Bedingungen vermessen wurden. Dies ermöglicht einen direkten Abgleich mit der Retentionszeit und dem MS2 Spektrum. Metaboliten, die nicht in der Bibliothek vermessen wurden, wurden vorläufig durch Abgleich der genauen Masse und der

MS/MS Fragmentierung mit online-Bibliotheken abgeglichen. Theoretische MS/MS Fragmentierungen wurden mit „MetFrag“ generiert (Ruttkies *et al.*, 2016; Wolf *et al.*, 2010).

2.10.3 Datenanalyse mit XCMS package (R-basiert)

Die Parameter wurden für die Lipidomanalyse optimiert. Die Lipid-Metabolomdaten (exportiert als .mzXML) wurden mit Hilfe des „XCMS package“ (Johannes Rainer, DOI: 10.18129/B9.bioc.xcms) ausgewertet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Standardparameter genutzt. Die „Peak Detektion“ wurde mit Hilfe des „centWave“ Algorithmus durchgeführt und die Parameter an das Datenset angepasst. Die Korrektur der Retentionszeiten wurde mit dem „Obiwrap“ Algorithmus durchgeführt. Die genauen Parameter sind in **Tabelle 20** gelistet:

Tabelle 20: XCMS Packet Parameter:

Feature Detektion	Wert	Beschreibung
(cent wave)		
ppm	10	Maximal tolerierte m/z Abweichung in aufeinanderfolgenden Scans
Minimale Peakweite	20	Minimum Peakweite (Chromatogramm) in s
Maximale Peakweite	80	Maximum Peakweite (Chromatogramm) in s
Noise	100	Noise Filter
Signal zu Noise Threshold	100	Schwelle des Verhältnisses Signal zu Noise
mzdiff	0.0155	m/z Differenz
„prefilter“	3, 1000	Massenspuren werden nur berücksichtigt, wenn sie mindestens drei Peaks mit einer Intensität von 1000 beinhalten
Retentionszeitkorrektur		
(obiwrap)		
„profStep“	1	Stufenweise (in m/z) zur Profilgenerierung ausgehend von den Rohdaten
„centerSample“	Pool Probe	Die Proben wurden anhand einer Pool-Probe ausgerichtet
Alignment		

bw	10	Zulässige Abweichungen in der Retentionszeit in s.
Minfrac	0.4	Mindestfraktion von Proben, die in mindestens einer der Probengruppen notwendig ist, damit sie eine gültige Gruppe darstellt.
mzwid	0,026	Breite überlappender m / z-Schichten, die zum Erstellen von Chromatogrammen mit Peak-Dichte und zum Gruppieren von Peaks über Proben hinweg verwendet werden.

2.10.4 Datenanalyse der GC-Proben mit „Metabolite Detektor“

Die Rohdaten der GC-MS Analyse wurde mit der Software „Excalibur“ (Thermo Fischer, USA) als netCDF exportiert. Die Prozessierung der Daten wurde mit der „MetaboliteDetector Software“ durchgeführt (Hiller *et al.*, 2009). Die Software dekonvolutioniert automatisch alle Massenspektren der Chromatogramme und berechnet die Retentionszeiten unter Zuhilfenahme eines Retentionsindex (RI) der genutzten Alkan Kalibrierlösung (**Formel 2**).

Formel 2:

$$RI^{(T)} = 100 \cdot [(y - x) \cdot \left(\frac{\log(t_i) - \log(t_x)}{\log(t_y) - \log(t_x)} \right) + x]$$

$RI^{(T)}$ = Retentionsindex im Temperaturgradient

x = Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, die vor dem Analyten eluieren

y = Anzahl der Kohlenstoffatome des Alkans, die nach dem Analyten eluieren

t = Retentionszeit des Analyten

t_i = Retentionszeit des Alkans, das vor dem Analyten eluiert

t_y = Retentionszeit des Alkans, das nach dem Analyten eluiert

Zur weiteren Kalibrierung wurde Ribitol (RI =1727.1) als interner Standard genutzt. Die Metaboliten wurden automatisch anhand der Spektren sowie der

kalibrierten Retentionszeiten mit einer GC-MS Spektren Bibliothek (**MD-Library 2014-03-31**) identifiziert (Hiller *et al.*, 2009).

Zur Reduzierung der Nullwerte (durch Metaboliten in niedriger Konzentration) wurde zusätzlich ein „extended single ion chromatogram scan“ durchgeführt. Die gewählte maximale RI Abweichung betrug fünf Einheiten. Die Normalisierung der Daten wurde anhand des zuvor bestimmten Zellrockengewichts, der genauen Ernte-OD sowie anhand des internen Standard Ribitol normalisiert. Alle methoxamierten und silylierten Derivate wurden zu einem Metaboliten mit Hilfe von „itool“ (Phyton/MySQL Script für GC-MS Daten, summiert die Analyten jedes Metaboliten und berechnet die Mittelwerte und Fehlerwerte für jede Probengruppe und jeden Metaboliten, bereitgestellt von AG Schomburg, TU-BS) zusammengefasst.

2.10.5 Statistische Datenanalyse der Metabolomdaten

Metabolomik und Transkriptomik sind als typische „omics-Studien“ stark von einer sinnvoll angepassten, statistischen Bewertung der Messwerte abhängig, da die Probenanzahl aufgrund des aufwendigen experimentellen Aufbaus sehr eingeschränkt ist. Der Signifikanztest wurde nach Welch (Bonett and Price, 2002) als Zweistichproben-t-Test für kleine Probengruppe berechnet. Die t-Test Korrektur wurde anhand der „False Discovery Rate“ Korrektur nach Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) durchgeführt. Ein korrigierter p-value $\leq 0,05$ wurde als signifikant definiert. Die Featureliste wurde anhand des p-Values sowie einer maximalen prozentualen Abweichung des Standardfehlers von 20 % innerhalb einer Probengruppe zwischen den Replikaten gefiltert. Der „fold change“ gibt die quantitative Veränderung zwischen zwei Bedingungen an. Dabei wurde die $\Delta csrA$ Mutante bzw. *csrA* Überexpressionsmutante gegen den Wildtyp als Referenz verglichen und die Ratio berechnet. Für rechnerische fold changes < 1 (negative Regulation) wurde der negative Kehrwert berechnet, um eine vereinheitliche Skalierung für die Regulationsrichtung zu erhalten (**Formel 3**). Eine \log_2 Transformation wurde aufgrund der niedrigeren fold changes in Metabolom Ansätzen nicht durchgeführt.

Formel 3: Berechnung der fold changes:

$$\begin{aligned} &\text{Positive Regulation: Wert in } \Delta csrA > WT \\ \text{fold change } (\Delta csrA: \text{Wildtyp}) &= \frac{\Delta csrA}{WT} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Negative Regulation: Wert in } \Delta csrA < WT \\ \text{fold change } (\Delta csrA: \text{Wildtyp}) &= \frac{\Delta csrA}{WT} * (-1) \end{aligned}$$

Identifizierte Metaboliten wurden als signifikant reguliert definiert, wenn der „fold change“ $|fc| \geq 1,5$ und der korrigierte p-value $\leq 0,05$ betrug. Der Datensatz wurde zuvor auf die optische Dichte der Proben zum Erntezeitpunkt, der Trockenmasse und der verwendeten internen Standards normalisiert.

2.10.6 Readmapping, Bioinformatik und Statistik von Transkriptomdaten

Die statistische Analyse der Transkriptomdaten wurde von Michael Beckstette (Abteilung Molekulare Mikrobiologie, HZI) durchgeführt.

Qualitätskontrollierte Bibliotheken wurden auf das Genom des *E. coli*-Stammes E2348/69 (Acc: chr: FM180568.1, Plasmid pE2348-2: FM18070.1, Plasmid pMAR2: FM180569.1) unter Verwendung von Bowtie2 (Version 2.2.3) (Langmead and Salzberg, 2012) mit voreingestellter Parametrisierung abgebildet. Nach dem Lesemapping wurde SAMtools (Li *et al.*, 2009) verwendet, um die resultierenden BAM-Dateien nur auf eindeutig zugeordnete Lesevorgänge (beide Stränge) zu filtern. Lesevorgänge wurden als eindeutig zugeordnete Lesevorgänge mit einem eindeutigen genomischen Standort klassifiziert, und zwar nur dann, wenn sie nicht an einen anderen Speicherort mit einer höheren oder gleichen Mappingqualität ausgerichtet werden konnten. Die resultierenden Bam-Dateien bildeten die Grundlage für alle weiteren nachgelagerten Analysen. Detaillierte Mapping-Statistiken sind im **Anhang IX** hinterlegt. Mit annotierten Genen ausgerichtete „Reads“ wurden mit dem *htseq-count*-Programm (Anders *et al.*, 2015) im Union-Modus unter Verwendung der öffentlichen NCBI-Gen-Annotationen für den *E. coli*-Stamm E2348/69 (Kanehisa *et al.*, 2017) quantifiziert. Die ermittelten eindeutig abgebildeten Lesezahlen dienten als Eingabe für DESeq2 (Anders and Huber, 2010) zum paarweisen Nachweis und zur Quantifizierung der differentiellen Genexpression. Für die DESeq2-Parametrisierung wurde ein „Beta-

Prior“ verwendet und die Filterung der „cook-distance“ deaktiviert. Alle anderen Parameter blieben unverändert. Die Liste der DESeq2-ermittelten differentiell exprimierten Gene (DEGs) wurde mit einem konservativen absoluten \log_2 „fold change-cutoff“ von mindestens 2 und einem Cutoff für einen mehrfach getesteten p-Wert von höchstens 0,05 gefiltert. Listen von differentiell exprimierten Genen wurden mit Pfadinformationen aus der KEGG-Datenbank versehen. FASTQ-Dateien aller verwendeten Bibliotheken werden im Data Repository GEO mit der Zugangsnummer GSE103415 hinterlegt. Die Ergebnisse der vergleichenden Transkriptom-Analyse sind in **Anhang I+II** hinterlegt.

3 Ergebnisse

CsrA ist ein hoch-konservierter, globaler Regulator, der einen Einfluss auf eine Vielzahl von Stoffwechselwegen in Bakterien hat. Durch die Kombination einer Metabolom- und Transkriptomstudie konnte ein umfassendes Bild auf die direkten und indirekten Effekte von CsrA abgebildet werden. Ergänzende Experimente gaben Einsicht auf die phänotypischen Effekte, die eine CsrA Deletion auf den enteropathogenen *Escherichia coli* E2348/69 O127:H6 Stamm hat.

3.1 CsrA beeinflusst den Wachstumsphänotyp von E2348/69

CsrA wurde erstmals mittels eines „Transposon-Mutagenese Screens“ entdeckt. Die *csrA* Mutanten hatten pleiotrope Effekte auf Gene, die im Zusammenhang mit dem Kohlenstoff - Stoffwechsel, Motilität, Biofilmbildung sowie dem Phänotyp stehen (Vakulskas *et al.*, 2015). In früheren Studien konnten zeigen, dass CsrA Mutanten verschiedener Bakterienspezies z.B. *E. coli* K-12 Stämme (Timmermans and Van Melderren, 2009) eine verminderte Generationszeit in Wachstumsmedien aufzeigten. Um zu überprüfen, ob dies auch für den enteropathogenen *E. coli* Stamm EPEC E2348/69 O127:H6 zutrifft, wurden Wachstumskurven in verschiedenen Minimalmedien aufgenommen (**Tabelle 21**). Der EPEC Wildtyp erreichte im MOPS Minimalmedium die kürzeste Verdopplungszeit mit ca. 32 min. Im M9 Minimalmedium mit 0,2 % Casaminoacids verlängerte sich die Verdopplungszeit auf fast 65 min, wohingegen die Trockenmasse sich nicht signifikant zwischen den Wachstumsmedien unterschied. Die $\Delta csrA$ Mutante hat eine generell reduzierte Teilungsrate in den getesteten Minimalmedien im Vergleich zum Wildtyp. Im MOPS Minimalmedium betrug die Verdopplungszeit ca. 66 min bzw. im M9 Minimalmedium ca. 95 min. Die Trockenmasse der $\Delta csrA$ Mutante ist ca. 11 – 16 % niedriger als die Trockenmasse des E2348/69 Wildtyps in den getesteten Wachstumsmedien (**Tabelle 21** und **Abbildung 14**). Das Wachstumsverhalten der EPEC $\Delta csrA$ Mutante deckt sich damit mit den Literaturquellen (Timmermans and Van Melderren, 2009, Vakulskas *et al.*, 2015). Ein verminderter Wachstumsphänotyp einer *csrA* Deletionsmutante ist für die meisten Enterobakterien beschrieben. Im Gegensatz zu der *E. coli* K12- Mutante (Timmermans and Van Melderren, 2009) ist eine komplette Deletion von *csrA* in EPEC allerdings vital. Somit ist CsrA für EPEC nicht zum Überleben essentiell.

Tabelle 21: Wachstum des EPEC Wildtyps bzw. der $\Delta csrA$ Mutante in verschiedenen Wachstumsmedien.

Stamm	Medium	μ [h^{-1}]	t_d [min]	Trockenmasse [mg]*
<i>E2348/69</i> Wildtyp	MOPS 0,2 % CA	$1,26 \pm 0,036$	$32,3 \pm 0,8$	$294,24 \pm 23,38$
<i>E2348/69</i> Wildtyp	M9 0,02 % CA	$0,66 \pm 0,042$	$64,7 \pm 3,1$	$305,34 \pm 29,44$
<i>E2348/69</i> $\Delta csrA$	MOPS 0,2 % CA	$0,66 \pm 0,024$	$65,7 \pm 2,7$	$263,76 \pm 0,01$
<i>E2348/69</i> $\Delta csrA$	M9 0,02 % CA	$0,042 \pm 0,054$	$95,1 \pm 5,2$	$258,59 \pm 7,38$

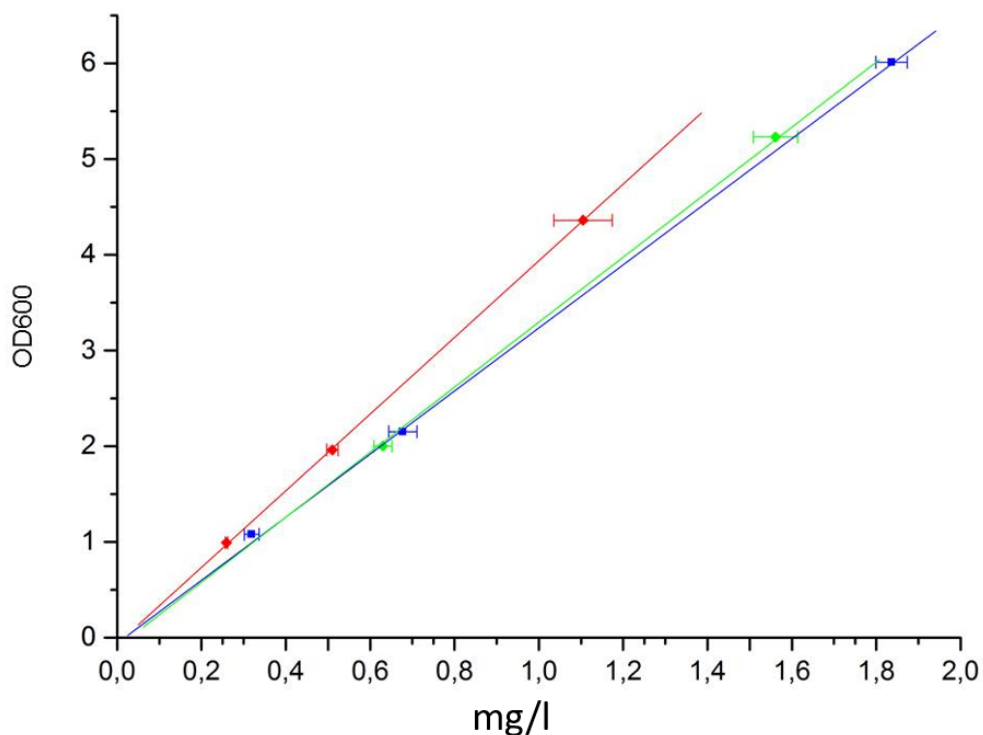


Abbildung 14: Trockenmasse - optische Dichte-Korrelation der $\Delta csrA$ Mutante (rot), des E2348/69 Wildtyps (blau) sowie der *csrA* Überexpressionsmutante (grün). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der OD-Trockenmassekorelation für den Wildtyp zur Überexpressionsmutante festgestellt werden. Die $\Delta csrA$ Mutante hatte im Vergleich zum Wildtyp ca. 11 – 16 % weniger Zelltrockenmasse bei der entsprechenden optischen Dichte. (*Die Trockenmasse ist auf [mg] für 1 l Kulturvolumen bei einer OD_{600} von 1 berechnet und angegeben).

3.2 Virulenzgenexpression ist abhängig von den Wachstumsbedingungen

Enteropathogene *E. coli* sind weltweit häufig Verursacher von Durchfallerkrankungen und daher als Modellorganismen für enterobakterielle Infektionen sehr wichtig. Die Pathogenese von EPEC ist abhängig von der Bildung von Mikroläsionen, die durch die Anheftung von EPEC an die Wirtszelle, mit Hilfe des „Bundle forming pilus“ und der anschließenden Sekretion von Effektorproteinen in die Wirtszelle via eines Typ III Sekretionssystems entstehen. Die Mikroläsionen sind eine direkte Folge von Tyrosin-Phosphorylierungsreaktionen und Signaltransduktionskaskaden, die durch die Virulenzeffektoren ausgelöst werden. Die stark regulierten Virulenzgene liegen zum Großteil auf Pathogenitätsinseln (Clarke *et al.*, 2003). Die Expression der Virulenzgene ist stark reguliert und von den Wachstumsbedingungen abhängig. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass Ammoniumchlorid die Sekretion des T3SS im M9 Medium inhibiert (Kenny *et al.*, 1997). Da wir die Auswirkung der CsrA Deletion auf das Metabolom und Transkriptom unter Virulenz-induzierten Bedingungen untersuchen wollten, wurde das M9 Medium für diese Bedingungen optimiert. Als Proxy für die Expression von EPEC Virulenzgenen wurde der EPEC E2348/69 Stamm mit einer genomischen Tir-Bla Fusion (Tir Rezeptor fusioniert an β -Lactamase) verwendet (Mills *et al.*, 2007).

Die Virulenzgenexpression in EPEC ist vor allem abhängig von einer niedrigen Konzentration von Ammoniumchlorid im Medium (**Abbildung 15**). Zusätzlich wurden die Konzentrationen von Calciumchlorid angepasst, da in dem nah verwandten enterohämorrhagischen *E. coli* Stamm EHEC ein Zusammenhang zwischen Virulenzgenexpression und der Calciumchlorid-Konzentration im Medium gezeigt werden konnte (Abe *et al.*, 2002). Eisennitrat ist die primäre Eisenquelle in DMEM und wurde deshalb zusätzlich zu dem modifizierten M9 Medium zugegeben. Durch die zusätzliche Zugabe von Hydrogencarbonat wird die natürliche Umgebung von EPEC im Dünndarm nachgebildet, da der Verdauungssaft nach der Magenpassage durch Carbonat im Dünndarm neutralisiert wird. Starke Expression der „Tir-Bla Fusion“ konnte auch bei völliger Abwesenheit von Ammonium im Wachstumsmedium nachgewiesen werden (**Abbildung 15, Tasche 13 und 15**). Allerdings war das Wachstum unter diesen Bedingungen sehr gering, weshalb ein Wachstumsmedium ohne Ammonium für die Metabolomanalyse ungeeignet ist.

Es konnte keine Expression der „Tir-Bla Fusion“ im Standard M9 Medium sowie im SOB Vollmedium detektiert werden (**Abbildung 16**). Als Positivkontrolle für die Virulenzgenexpression diente das DMEM Medium (aerob oder unter mikroaeroben Bedingungen, 5 % CO₂). Die stärkste Expression wurde unter mikroaeroben Bedingungen in DMEM erreicht. Das modifizierte M9-Medium mit reduzierter Ammoniumchlorid-Konzentration, supplementierten Casaminsäuren und Phosphat/Carbonat Puffer erreichte eine ähnlich hohe Signalstärke im Western-Blot wie im DMEM Medium unter aeroben Bedingungen. Die genaue Zusammensetzung des Virulenz-optimierten M9 Medium ist in Sektion **2.1.3** beschrieben. Die Wachstumsbedingungen des modifizierten M9 Mediums bilden die Bedingungen im natürlichen Habitat von EPEC nach (Carbonat Puffer, hohe Aminosäuren-Konzentration, wenig Ammonium). Dabei ist die Grundlage als Minimalmedium ein Kompromiss zwischen Virulenz-optimierten Wachstumsbedingungen und möglichst definierter Zusammensetzung des Wachstumsmediums für Metabolomstudien.

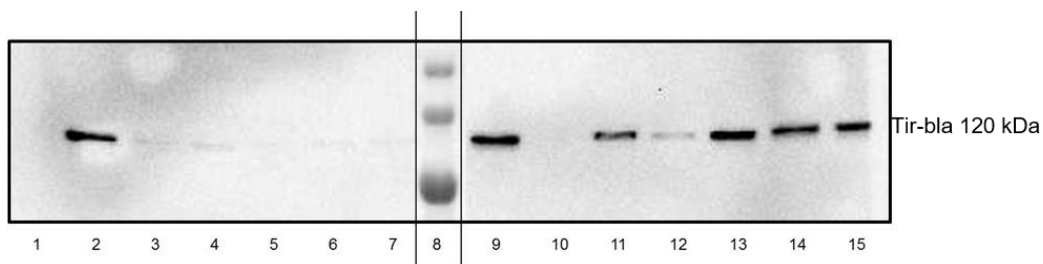


Abbildung 15: Verschiedene Testbedingungen zur Virulenzgenexpression. Es wurden die Konzentrationen von FeNO₃, NH₄Cl, CaCl₂ entsprechend der Tabelle 7 angepasst, um die optimalen Bedingungen für die Virulenzgenexpression in EPEC zu finden. Der „pre-stained“ Marker (Tasche 8) wurde nachträglich in das Gel Bild eingefügt (Banden ~ 180 kDa, ~130 kDa, ~100 kDa; Page Ruler, Thermo Scientific). Die Größe des Tir Bla Fusionsproteins beträgt 120 kDa. Negativkontrollen: Tasche 1 M9 Medium Tasche 6 LB, Positivkontrollen: Tasche 2 DMEM (aerob), Tasche 14 DMEM (5 % CO₂). Die Zusammensetzung der Testmedien (Tasche 3-5,7,9, 10-13,15) sind in Tabelle 22 angegeben)

Tabelle 22: Zusammensetzung des modifizierten M9 Mediums (2.1.3). Die angegebenen Konzentrationen in [mM] wurden modifiziert, um die optimalen Virulenz-Genexpressionsbedingungen anhand der Tir-Bla Fusion zu finden. Die Expression der Tir-Bla Fusion ist abhängig von einer niedrigen Konzentration von NH_4Cl . Die Zusammensetzung von Tasche 9 entspricht der finalen Konzentration des modifizierten M9 Mediums.

Tasche	3	4	5	7	9	10	11	12	13	15
NH_4Cl [mM]	0,1	1	0,6	-	1	-	1	1	-	-
CaCl_2 [mM]	0,6	0,6	0,25	0,25	0,6	0,6	1	0,25	0,3	0,3
FeNO_3 [mM]	0,25	0,25	10	10	0,025	0,5	0,025	0,6	0,025	0,025
HCO_3^- [mM]	-	-	-	-	44	-	-	-	-	44

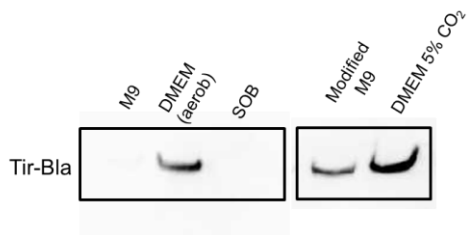


Abbildung 16: CsrA und Tir-Bla Expression in verschiedenen Wachstumsmedien: Western-Blot der Tir- β -lactamase (Tir-Bla) Fusion aus dem Zelllysat unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bei einer Ernte- $\text{OD}_{600} = 1$. Zelllysat von EPEC (DMEM, microaerob) wurde als Positivkontrolle verwendet.

3.3 „Untargeted“ Metabolom und Transkriptom Ansatz

Um einen globalen Überblick auf den Einfluss des CsrA Regulons auf den bakteriellen Metabolismus und die Genexpression zu bekommen, wurde eine kombinierte „untargeted“ Metabolom- und Transkriptomstudie durchgeführt. Da EPEC unter Standard-Wachstumsbedingungen keine Virulenzfaktoren exprimiert, wurde das entsprechende Wachstumsmedium für die Analyse auf Virulenzgenexpression optimiert (siehe 3.2). Durch die Kombination von drei unterschiedlichen Analyseansätzen, Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) mit positiver oder negativer Ionisierung sowie Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) war es möglich 159 Metaboliten zu identifizieren (**Anhang III**). Die Proben für die

Metabolomanalysen (GC-MS und LC-MS), sowie für die Transkriptomanalyse wurden aus den gleichen biologischen bzw. technischen Replikaten generiert. Ein Schema der Probengenerierung ist in **Abbildung 17** gezeigt. Dabei wurden die Transkriptomproben direkt aus den Kulturen, möglichst zeitgleich mit den Metabolomproben entnommen und der Metabolismus durch „Quenching“ abgestoppt. Die genaue Vorgehensweise der Probenentnahme für die Transkriptom- und Metabolomanalyse ist in **2.7**, **2.2.3** und **2.3.2** beschrieben.

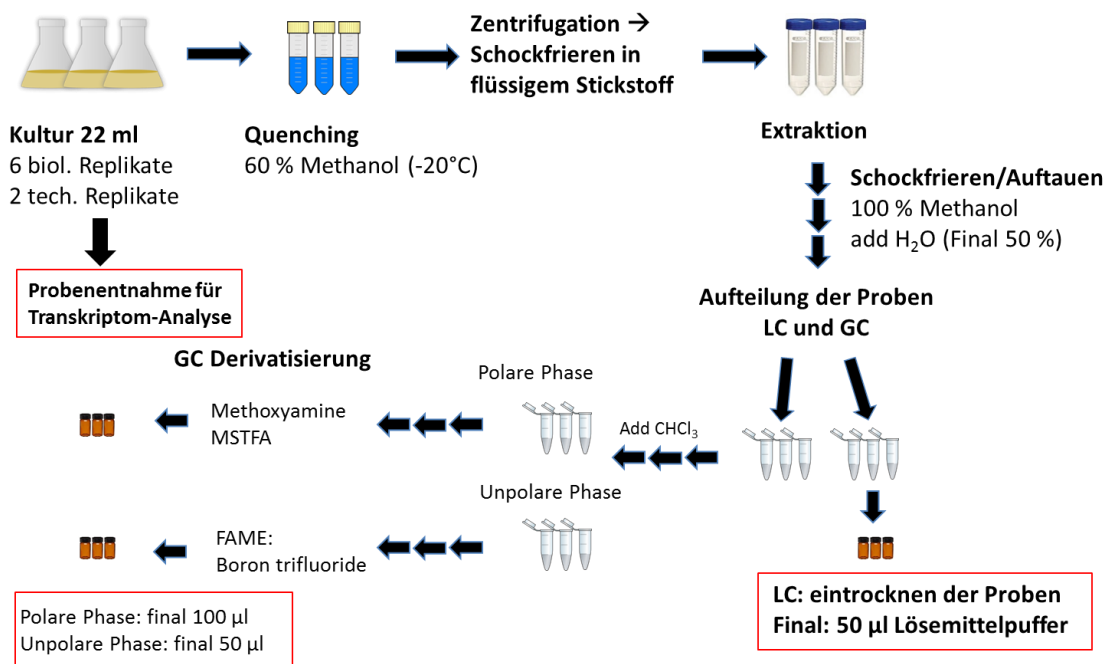


Abbildung 17: Probengenerierungsschema. Aus den Replikaten wurde zeitgleich die Probenentnahme für die Transkriptomanalyse und die Metabolomanalyse durchgeführt. Die Transkriptomproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80 °C gelagert. Die Metabolomproben wurden „gequencht“ und Schockgefroren um den Metabolismus schnellst möglich zu stoppen. Nach der Extraktion wurden die Proben für die Analyse mit der GC-MS oder LC-MS aufgeteilt. Da alle Proben aus den jeweilig gleichen biologischen/technischen Replikaten extrahiert wurden, konnte eine gute Korrelation zwischen den einzelnen Analysen erreicht werden.

Die Identifikation der Metaboliten erfolgte durch Abgleich der Retentionszeit, der genauen Masse und der MS2 Spektren mit der CBIO-eigenen Metaboliten-Bibliothek oder durch Abgleich der MS/MS Spektren und genauen Masse (5 ppm Toleranz) mit den verfügbaren Online-Datenbanken wie der ECMDB (<http://ecmdb.ca/>) und der METLIN Datenbank (<https://metlin.scripps.edu/>). Unbekannte „Features“ wurden durch Filtern nach Standard-Error ($\leq 15\%$) und

korrigiertem „p-Value“ ($\leq 0,05$) definiert. Von den 159 identifizierten Metaboliten waren 30 Metaboliten signifikant hoch-reguliert bzw. 67 signifikant runter-reguliert ($|\text{fold change (fc)}| \geq 1,5$; $\text{fc} \leq -1,5$; $\text{p-value} \leq 0,05$ (**Anhang III**). Gefilterte Features sind in **Abbildung 18** für die Messung im Positivmodus und Negativmodus für die ΔcsrA Deletionsmutante gegen den Wildtyp gezeigt.

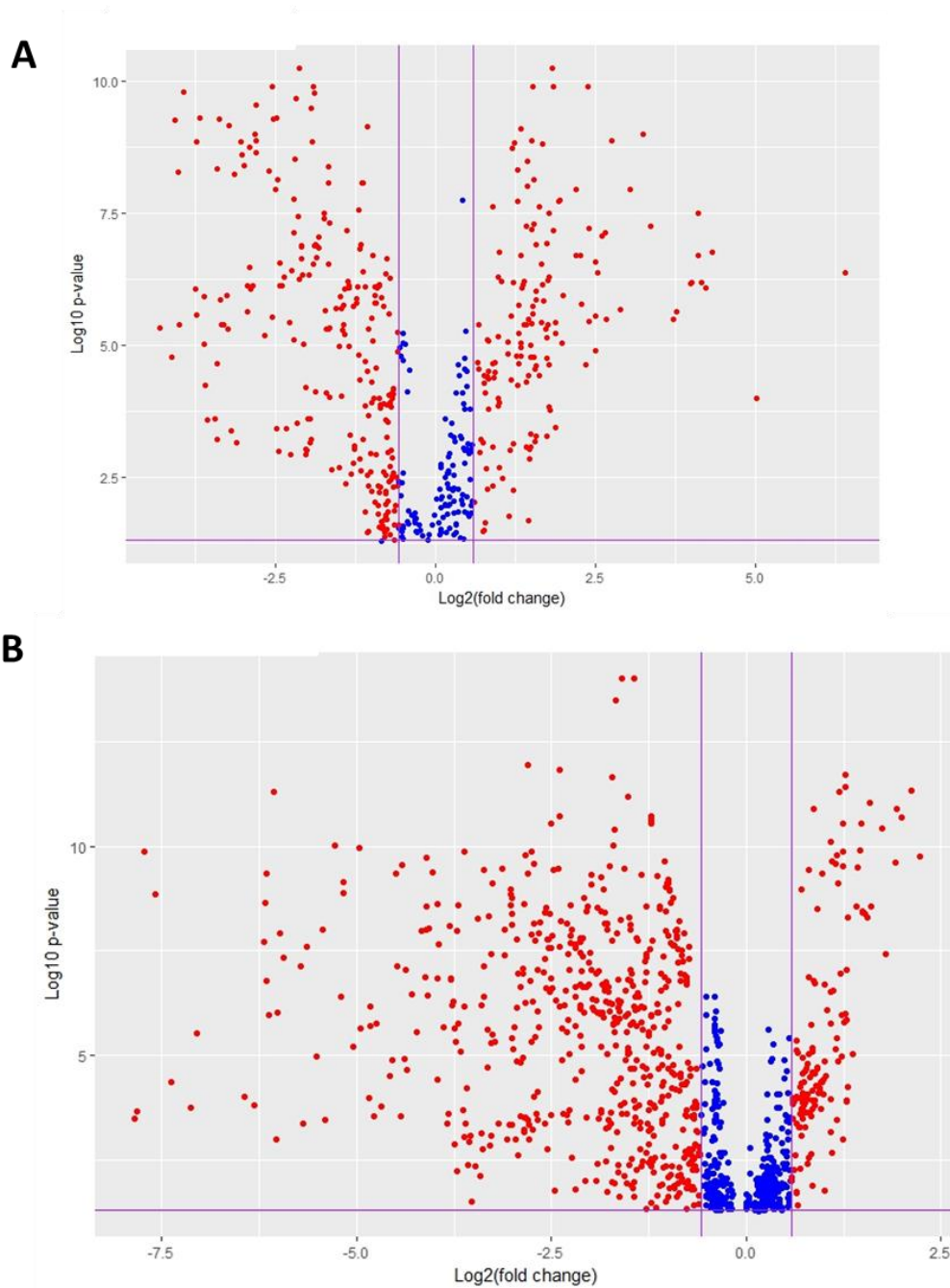


Abbildung 18: Volcano Plot der gefilterten Features zwischen ΔcsrA und Wildtyp im A: negativ. und B: positiv-Ionenmodus. Signifikant regulierte Features: P-Value $\geq 0,05$ $|\text{fc}| > 1,5$.

Beispiele für Feature Identifikationen sind in **Abbildung 19** und **Abbildung 20** gezeigt. Die Identifikation erfolgte zuerst anhand der Masse des Features bzw. des Addukts (in der Regel $[M+H]$ im positiv-Modus oder $[M-H]$ im negativ-Modus). Für Nortriptylin (als interner Standard zugegeben) konnte ein Feature des $[M+H]$ Addukts mit einer m/z von 264.1747 identifiziert werden. Durch Abgleich mit der CBIO Spektren Bibliothek konnte die Retentionszeit und das MS2 Spektrum verglichen werden, wodurch das Feature eindeutig als Nortriptylin identifiziert werden konnte. Eine Identifikation aufgrund von MS, MS2 und Retentionszeit mit der gemessenen Reinsubstanz im gleichen Geräte-Setup als Referenz ist die sicherste Art der Identifikation eines Metaboliten. Als zusätzliche Referenz für die Fragmentierung im MS/MS mode wurden die Spektren von identifizierten Features mit online Datenbanken wie Metlin oder der ECMDB abgeglichen (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Für Features die nicht in der CBIO-Metabolitendatenbank hinterlegt und gemessen wurden, wurde der Abgleich nur anhand der genauen Masse und der Referenzspektren in den Online Datenbanken durchgeführt.

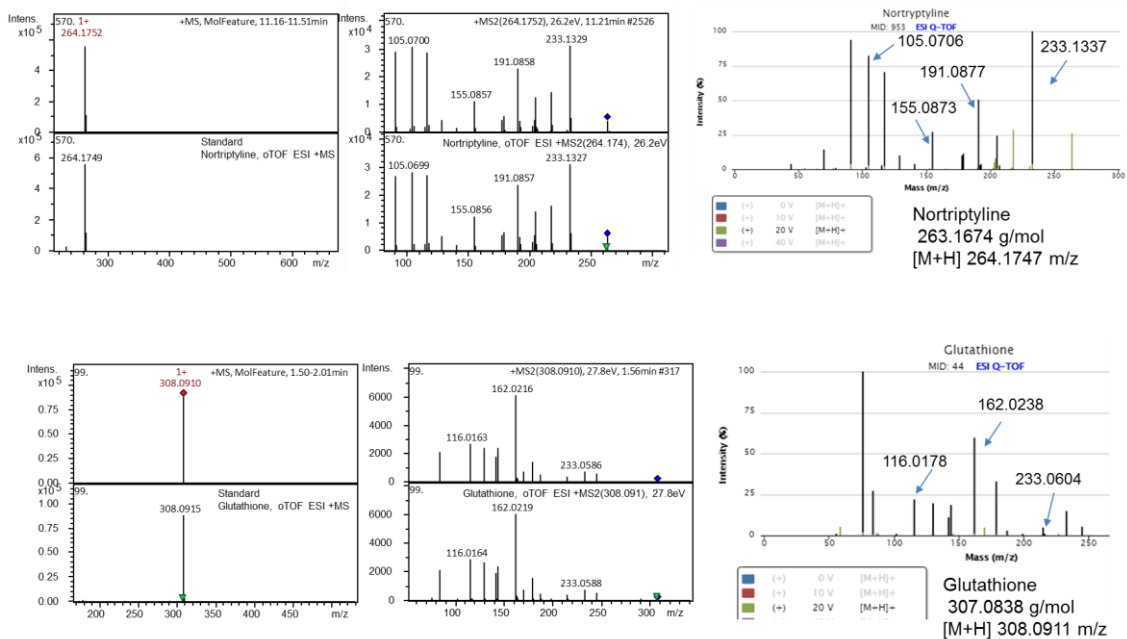


Abbildung 19: Feature Annotation anhand von Nortriptylin und Glutathion. Beide Features wurden im positiv Modus gemessen und anhand der m/z (Nortriptylin $[M+H]$ 264.1747 m/z, Glutathion $[M+H]$ 308.0934 m/z), der Retentionszeiten (Vergleich mit der CBIO internen Standard-Bibliothek), sowie des MS2 Spektrums verglichen. Der Abgleich des MS2 Spektrums erfolgte einmal mit der CBIO internen Standard-Bibliothek, sowie wie hier gezeigt mit den Referenzspektren³ aus der Metlin Metabolom-Datenbank.

³Die Referenzspektren wurden aus der Metlin Metabolom Datenbank entnommen:
<https://metlin.scripps.edu>; (Smith *et al.*, 2005)

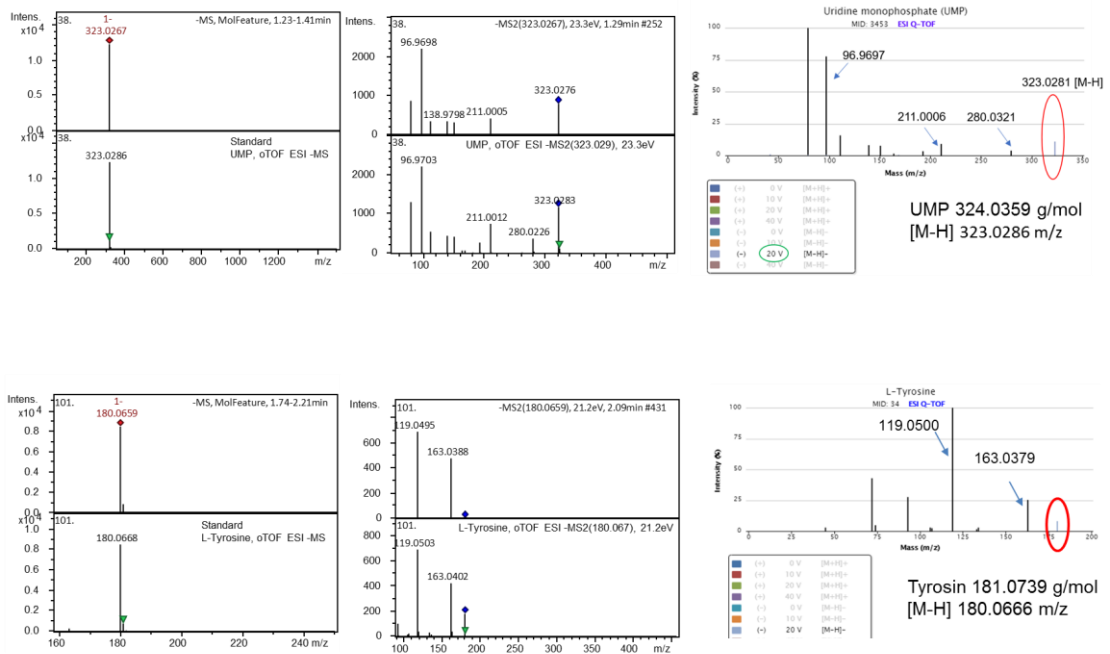


Abbildung 20: Feature Annotation anhand von Uridinmonophosphat und Tyrosin. Beide Features wurden im negativ-Modus gemessen und anhand der m/z (UMP [M-H] 323.0286 m/z , Tyrosin [M-H] 181.0739 m/z), der Retentionszeiten (Vergleich mit der CBIO internen Standard-Bibliothek), sowie des MS2 Spektrums verglichen. Der Abgleich des MS2 Spektrums erfolgte einmal mit der CBIO internen Standard-Bibliothek, sowie wie hier gezeigt mit den Referenzspektren⁴ aus der Metlin Metabolom-Datenbank.

Mit Hilfe der Transkriptomanalyse konnten 4159 Transkripte identifiziert werden, wovon 97 signifikant hoch- bzw. 36 (Abbildung 21 B) signifikant runter-reguliert (E2348/69 $\Delta csrA$ gegen E2348/69 Wildtyp, $|\log_2 fc| \geq 2,0$) waren. Die Probengruppen waren in der PCA-Analyse getrennt (Anhang XV, Read-Mapping Statistik Anhang IX). Der Vergleich der *csrA* Überexpressionsmutante mit dem E2348/69 Wildtyp zeigte eine Hoch-Regulation von 69 Transkripten und eine Runter-Regulation von 48 Transkripten (Abbildung 21 A). Der Vergleich der E2348/69 $\Delta csrA$ gegen die Überexpressionsmutante lieferte dahingegen ein ähnliches Bild wie der Vergleich der E2348/69 $\Delta csrA$ Mutante gegen den Wildtyp (Transkripte: 87 signifikant hoch-reguliert, 54 signifikant runter-reguliert (Abbildung 21 C)). Die „p-Values“ und „Fold-Changes“ der einzelnen Testbedingungen sind als „Volcano-Plots“ in (Abbildung 21) dargestellt.

⁴ Die Referenzspektren wurden aus der Metlin Metabolom Datenbank entnommen: <https://metlin.scripps.edu/>; (Smith *et al.*, 2005)

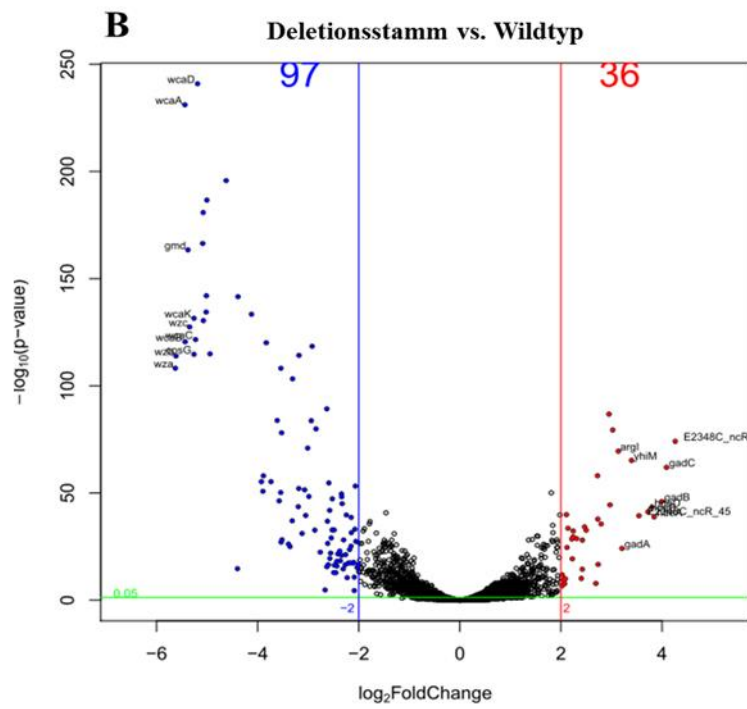
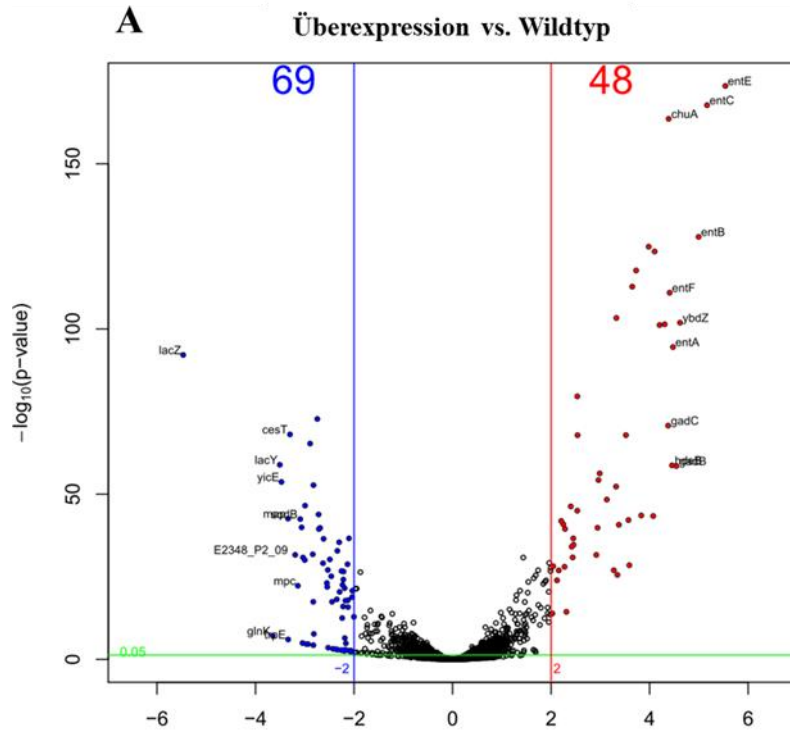


Tabelle 23: Identifizierte Metaboliten, die in GC-MS und LC-MS unabhängig von einander identifiziert wurden.

Metabolit	fold change (KO:WT) GC-MS	fold change (KO:WT) LC-MS pos. [M+H]	fold change (KO:WT) LC-MS neg. [M-H]
2,3 Dihydroxybenzoate	-6.22	Nicht detektiert	-3.82
2'Deoxyadenosin	13.57	4.63	Nicht detektiert
Adenosin	15.73	3.60	3.60
AMP	-1.10	-8.25	-6.45
Guanin	2.46	2.27	Nicht detektiert
Inosin	2.53	3.57	3.76
Phenylpyruvat	-3.18	Nicht detektiert	-1.84
Phosphoenolpyruvat	-16.96	Nicht detektiert	-2.46
Spermidin	-1.36	1.17	Nicht detektiert
UMP	-1.32	Nicht detektiert	-5.92
Uridin	4.98	Nicht detektiert	9.13

In Bezug auf das Transkriptom zum Metabolom, lies sich eine gute Korrelation darin erkennen, dass die Regulation von Transkripten, die für Enzyme oder Operons kodieren, direkten Einfluss auf die Produkte und Edukte der enzymatischen Reaktion auf Metabolomebene hatten. Ein Beispiel ist die Regulation der Transkripte für die Enzyme Fructose-1,6-bisphosphatase (*fbp* fold change 1,81, p-value $1,59 \cdot 10^{-10}$) und Phosphofruktokinase (*pfkA* fold change -2,37 fold change $1,41 \cdot 10^{-21}$), und die jeweiligen Edukte Fructose-6-Phosphat (fold change 3,69, pval $3,56 \cdot 10^{-2}$) bzw. Fructose-1,6-Bisphosphat (*fc* -4,34, pval $6,48 \cdot 10^{-3}$). Weitere Beispiele sind die Regulation des *glgCAP* Operons und der Enterobactin Biosynthese. Dies wird im Einzelnen in den folgenden Kapiteln diskutiert.

3.4 Globale Effekte von CsrA auf das Metabolom und den Stoffwechsel

Zur Aufklärung und zum Verständnis des globalen Regulators CsrA ist es notwendig, ein umfassendes Bild auf die phänotypischen Effekte zu bekommen, sowie die Veränderungen im Stoffwechsel zu erfassen. Dazu wurde in dieser Arbeit ein „untargeted“ Metabolomikansatz zusammen mit einer RNAseq Transkriptomstudie

kombiniert. Die Kulturbedingungen sowie der komplette Auswerteaufbau sind in Abschnitt 2.7 erläutert.

3.4.1 Einfluss auf die Glykolyse und angrenzenden Stoffwechselwege

Durch die Kombination von GC-MS und LC-MS war es möglich alle Intermediate des Embden Meyerhof Parnas Wegs (EMP) mit Ausnahme von Pyruvat (Pyr) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu detektieren und zu identifizieren (**Abbildung 22 A**). Der wichtigste Regulationspunkt der Glykolyse ist die Phosphorylierungsreaktion von Fructose-6-Phosphat (F6P) zu Fructose 1,6-Bisphosphat (F1,6P) durch das Enzym Phosphofruktokinase (*pfk*). Die Konzentration von F6P (war in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (fc 3,69, pval $3,56 \cdot 10^{-2}$), wohingegen die Konzentration des Reaktionsprodukts der *pfk*, F1,6P stark erniedrigt (fc -4,34, pval $6,48 \cdot 10^{-3}$) war. Alle folgenden Intermediate der Glykolyse wiesen eine niedrigere Konzentration in der $\Delta csrA$ Mutante auf als im Wildtyp (**Abbildung 22 A**). Eine gute Korrelation der Metabolomdaten ließ sich auf dem Transkriptlevel beobachten. Die Transkriptlevel der *pfk* waren stark erniedrigt, was eine Akkumulation von F6P bzw. eine Erniedrigung von F1,6P erklärt. Im Gegensatz dazu war der Transkriptlevel des Enzyms Phosphofruktokinase (*fbp*), das die Umkehrreaktion der *pfk* von F1,6P zu F6P katalysiert, in der $\Delta csrA$ Mutante stark erhöht. Auf Metabolomebene führte dies zu einer Hochregulation der oberen Glykolyse bzw. einer Runterregulation der unteren Glykolyse und des daraufhin folgenden Krebszyklus (**Abbildung 22**). Eine Verschiebung des Kohlenstoffmetabolismus in Richtung der Glykogensynthese lässt sich auch stark an der Anreicherung der Metabolitenlevels von Mehrfachzuckern beobachten (**Tabelle 24**), die aus Oligomeren von bis zu sieben Hexose-Einheiten bestehen, welche signifikant höher in der $\Delta csrA$ Mutante als im Wildtyp waren. Das gleiche gilt für die Enzym-Transkripte des Glykogen-Synthese-Operons (*pgm*, *glgP*, *glgC*, *glgA*), welches in der $\Delta csrA$ Mutante hoch-reguliert war (**Abbildung 23**). Zusätzlich konnte auf Metabolomebene eine Depletion des Schlüsselintermediates der Glykogensynthese, ADP-Glucose, gezeigt werden, was eine Folge der starken Aktivität der Glykogensynthese in Abwesenheit von CsrA sein könnte.

Im Gegensatz dazu waren die Intermediatkonzentrationen der unteren Glykolyse ab F1,6P sowie die korrespondierenden Transkriptkonzentrationen der Enzyme (*gapC*, *pgk*, *gpmA*, *pykA*, *pykF*) allesamt in der $\Delta csrA$ Mutante erniedrigt. Gleiches gilt für die Metaboliten des Citrat-Zyklus, die in der $\Delta csrA$ Mutante alle eine niedrigere Konzentration als im Wildtyp aufwiesen (**Abbildung 22 B**). Hier konnte kein direkter Zusammenhang mit den Transkriptlevels hergestellt werden, da diese im Gegensatz zu den Transkriptlevels in der Glykolyse nicht beeinträchtigt waren. Nur das Succinat-Dehydrogenase-Operon wies eine Erhöhung in den Transkriptlevels auf, welches aber keinen Effekt auf das Metabolom zu haben scheint (**Abbildung 22 B**). Aufgrund der nicht veränderten Transkriptlevels für den Citratzyklus ist ein indirekter Effekt auf die Metabolitenlevels des TCA Zyklus durch eine Runterregulation der unteren Glykolyse am wahrscheinlichsten.

Im Gegensatz zu den Effekten, die sich in der $\Delta csrA$ Mutante beobachten lassen, ließ sich kein signifikanter Effekt auf die Glykolyse, den TCA bzw. die Glykogensynthese auf Transkriptomenebene der Überexpressionsmutante feststellen. Die Transkriptlevels der beteiligten Enzyme waren in der Überexpressions-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant verändert. Die Metabolitenkonzentrationen der Glykolyse und der Citrat-Zyklus Intermediate waren allerdings ähnlich verändert wie im Vergleich $\Delta csrA$ -Mutante gegen Wildtyp (**Anhang III**). Interessanterweise waren die Metabolitenspiegel der Polyzucker (**Tabelle 24**) genau gegensätzlich reguliert. Im Vergleich Überexpressionsmutante gegen Wildtyp waren die „fold changes“ durchweg negativ, was auf einer gegensätzlichen Regulation in der Überexpression im Vergleich zur $\Delta csrA$ Mutante hindeutet. Auch wenn die Regulation auf Transkriptomenebene nicht nachweisbar ist, kann es auf Grund der Dosisabhängigkeit der Regulation des *csrA* Operons zu solch starken Effekten im Metabolom im Bereich der Glykogensynthese kommen.

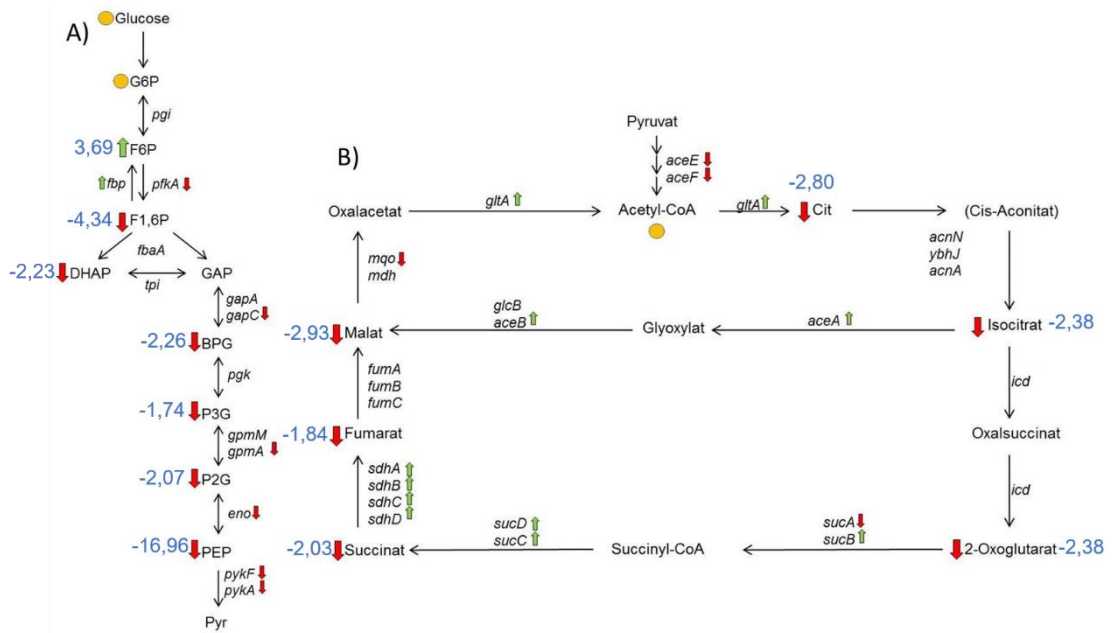


Abbildung 22: Einfluss von CsrA auf den Zentralstoffwechsel. Regulation der Glykolyse (A) und des Citrat Zyklus (B) in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Rote Pfeile geben einen negativen „Fold Change“, grüne Pfeile einen positiven „Fold Change“ an. Gelbe Kreisflächen geben eine Identifikation des Metaboliten ohne Regulation an. Die „Fold Changes“ beziehen sich auf eine Regulation in der $\Delta csrA$ Mutante gegen den E2348/69 Wildtyp. Metaboliten: Glucose-6-Phosphat G6P, Fructose-6-Phosphat F6P, Fructose 1,6-Bisphosphat F1,6P, Dihydroxyacetonphosphat DHAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat GAP, Bisphosphoglycerat BPG, 3-Phosphoglycerat 3PGA, 2-Phosphglycerat 2PGA, Phosphoenolpyruvat PEP, Pyruvat Pyr. Fold changes der Metaboliten in blau.

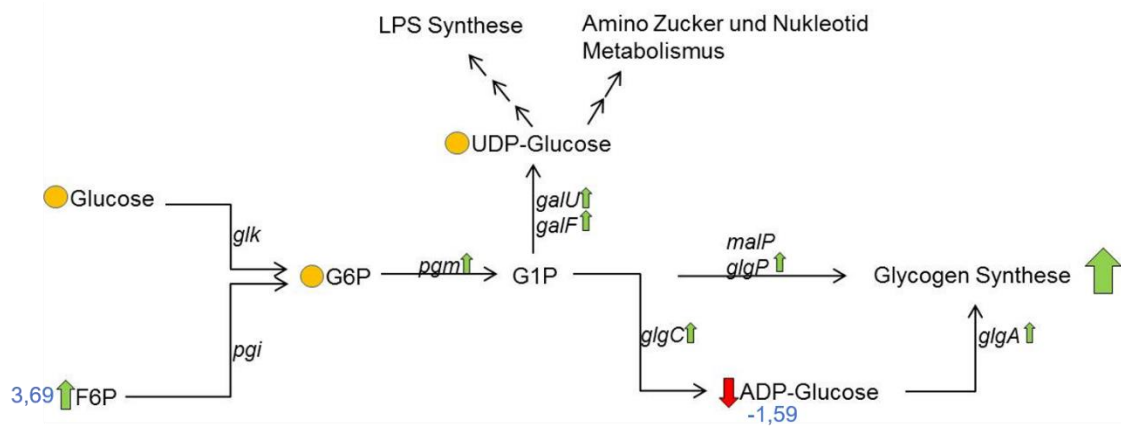


Abbildung 23: Einfluss der CsrA Perturbation auf die Glykogensynthese. Rote Pfeile geben einen negativen „Fold Change“, grüne Pfeile einen positiven „Fold Change“ an. Gelbe Kreisflächen geben eine Identifikation des Metaboliten ohne Regulation an. Die „Fold Changes“ beziehen sich auf eine Regulation in der $\Delta csrA$ Mutante gegen den E2348/69 Wildtyp. Fold changes der Metaboliten in blau.

Tabelle 24: Identifizierte Intermediate der Glykogensynthese bzw. anderer zuckerassoziierter Stoffwechselwege. Alle Intermediate wurden in höherer Abundanz in der $\Delta csrA$ Mutante detektiert. Octahexose und Nonahexose konnten detektiert und identifiziert, jedoch nicht quantifiziert werden (dnq – detektiert nicht quantifiziert)

Metabolit	Methode	Fold Change $\Delta csrA/WT$	p-value
Disaccharide	GC	4,81	$4,79 \cdot 10^{-6}$
Trihexose	GC	5,36	$1,05 \cdot 10^{-2}$
Trihexose	LC-negativ	2,45	$3,13 \cdot 10^{-8}$
Tetrahexose	LC-negativ	2,25	$4,59 \cdot 10^{-11}$
Pentahexose	LC-negativ	2,35	$5,62 \cdot 10^{-14}$
Hexahexose	LC-negativ	3,28	$4,49 \cdot 10^{-8}$
Heptahexose	LC-negativ	3,34	$6,26 \cdot 10^{-12}$
Octahexose	LC-negativ	dnq	dnq
Nonahexose	LC-negativ	dnq	dnq

3.4.2 Nucleotid-Salvage-Stoffwechsel und Redoxäquivalente

Neben dem Einfluss auf die Glykolyse und den allgemeinen Kohlenstoffstoffwechsel waren starke Effekte auf die „Nucleotid-Salvage-Stoffwechselwege“ zu beobachten. Auf Metabolitenebene kam es zur Akkumulation von Nucleosiden (Uridin, Guanosin, Adenosin, Cytidin) und Basen (Guanin, Cytosin, Xanthin), wohingegen die Metaboliten-Pools von Nucleotiden wie UMP, AMP und ADP signifikant geringer in der $\Delta csrA$ Mutante waren (**Anhang III**). Der „Nucleotid-Salvage Stoffwechselweg“ dient zum Recyceln der Biomoleküle bzw. der Neusynthese aus den entsprechenden Abbauprodukten. Auf Transkriptebene waren ebenfalls Effekte der CsrA Perturbation zu beobachten. Die Transkriptlevels einiger Enzyme der „Nucleotid-Salvage-Pathways“ wie der Cytidin Deaminase (*cdd*), der Pyrimidin spezifischen Hydrolase (*rihB*) und der Thymidin Dephosphorylase (*deoA*) waren signifikant niedriger in der $\Delta csrA$ Mutante als im Wildtyp, wohingegen die saure Phosphatase/Phosphotransferase *aphA* leicht hochreguliert war (**Anhang I** und **Anhang II**). Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung der Phosphatgruppe von 5' und 3' Mononucleotiden und 5' Monodeoxynucleotiden und weist ebenfalls eine Phosphotransferase-Aktivität „in vitro“ auf (Passariello *et al.*, 2006; Thaller *et al.*, 1997). Allerdings ist ein direkter Zusammenhang zwischen Metabolom und Transkriptom im Bezug auf den „Nucleotid-Salvage“ Stoffwechselweg eher unwahrscheinlich.

Ebenfalls ließ sich ein starker Einfluss auf die Metabolitenlevels aus dem Nicotinat- und Riboflavin-Metabolismus feststellen. Die Redoxäquivalente Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) und Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) sowie das Intermediat Nicotindamid-Ribotid (NMN) aus dem Synthese/“Salvation“ Stoffwechselweg waren signifikant niedriger in der $\Delta csrA$ Mutante als im Wildtyp. Im Gegensatz dazu waren die entsprechenden Vorläufermetaboliten Nicotinat und Nicotinamid in höherer Konzentration im $\Delta csrA$ Deletionsstamm nachweisbar. Die Metabolitenkonzentrationen der wichtigen Co-Faktoren FMN und FAD waren im Kontrast dazu signifikant reduziert in der $\Delta csrA$ Mutante (**Anhang III**). Auf Transkriptomebene konnte keine Verbindung zu diesem Stoffwechselweg hergestellt werden.

In der *csrA* Überexpressionsmutante waren ähnliche Effekte auf die Metabolitenkonzentrationen zu beobachten. Es konnte – wie in der Deletionsmutante – ebenfalls eine Akkumulation der Nukleoside und Basen wie auch eine signifikante Reduktion von Nukleotiden bestimmt werden. Es scheint, als ob eine Überproduktion von CsrA gleiche bzw. ähnliche Effekte auf diese Stoffwechselwege hat. Im Gegensatz dazu waren die Metabolitenlevels aus dem Nicotinat- und Riboflavin-Metabolismus nicht signifikant verändert. Auf Transkriptomebene waren lediglich die Transkriptlevels von *rihB* (fc – 1,81) leicht erniedrigt bzw. von *aphA* (fc 1,72) leicht erhöht.

3.4.3 Aromatische Aminosäuresynthese

Auch abgeleitete bzw. angrenzende Stoffwechselwege der Glykolyse bzw. des Citratzyklus sind durch eine CsrA Perturbation betroffen. Auch wenn die Spiegel der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) an sich nicht verändert waren, wurden veränderte Metabolitenspiegel in der Synthese der aromatischen Aminosäuren (**Abbildung 24**) in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet, die sich zum Teil auch auf differentielle Transkriptspiegel in der Mutante zurückführen lassen könnten. Die beiden Intermediate Erythrose-4-Phosphat (fc -3,19, pval 9,02E-06) aus dem Pentose-Phosphat-Zyklus (PPP) und Phosphoenolpyruvat (fc – 16,96, pval 1,08E-03) aus der Glykolyse waren beide in geringerer Konzentration in der $\Delta csrA$ Mutante detektierbar als im Wildtyp. Beide Intermediate sind wichtige Vorläufer für die Synthese der aromatischen Aminosäuren. Zusätzlich konnte eine Akkumulation

des Schlüsselintermediates des Shikiminsäurestoffwechselwegs, Shikimat (fc 20, pval 5,47E-04) sowie des Vorläufermoleküls 3-Dehydroshikimat detektiert werden (**Anhang III**). Auf Transkriptebene lässt sich die Akkumulation der Intermediate 3-Dehydroshikimat und Shikimat mit der geringeren Transkriptmenge von *aroL* (fc - 2,69, pval 5,70E-18) in der $\Delta csrA$ Mutante erklären (**Abbildung 24**). Die Shikimat-Kinase AroL nutzt dabei ATP zur Phosphorylierung der 3-Hydroxy Gruppe von Shikimat und bildet Shikimat-3-Phosphat. Im Gegensatz dazu war die mRNA für die 3-Phosphoshikimate-1-Carboxyvinyltransferase AroA (fc 2,54, pval 3,28E-15) in der $\Delta csrA$ Mutante in größerer Menge detektierbar als im Wildtyp. AroA katalysiert die Reaktion von Shikimat-3-Phosphat zu 5-O-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate. Es ist möglich, dass eine Runterregulation von *aroL* dazu führt, dass der Shikimat Stoffwechselweg ab dieser Reaktion in den folgenden Schritten aufgrund der zu langsamen Bereitstellung des Intermediates Shikimate-3-Phosphat weniger abläuft. Im Gegenzug dazu erklärt die geringere Menge an *aroL* die Akkumulation des Reaktionsprodukts Shikimat und des Intermediats 3-Dehydroshikimats. Auch wenn es nicht möglich war Chorismat und Prephenat, die folgenden Intermediate der Synthese für Phenylalanin und Tyrosin, zu detektieren, konnten die direkten Vorläufermoleküle der beiden aromatischen Aminosäuren detektiert werden. Die Vorläufermoleküle für die Synthese von Tyrosin, 4-Hydroxyphenylpyruvat (fc - 2,97, pval 8,50E-04) bzw. Phenylpyruvat (fc -1,84, pval 9,61E-05) lagen beide in geringerer Konzentration in der $\Delta csrA$ Mutante vor (**Abbildung 24**). Auf Transkriptebene war die mRNA, die für bifunktionelle „Chorismate-Mutase/Prephenate-Dehydrogenase (TyrA)“ codiert, negativ im Vergleich zu der Deletionsmutante gegen den Wildtyp reguliert. TyrA katalysiert sowohl den Reaktionsschritt von Chorismate zu Prephenat, ein Vorläufer für die beiden Syntheseschritte für Phenylalanin und Tyrosin wie auch die Reaktion von Prephenat zu dem Vorläuferintermediat 4-Hydroxyphenylpyruvat für die Tyrosin Biosynthese. Dagegen wies der Transkriptlevel für *pheA*, das den Schritt von Chorismat zu Phenylpyruvat über Prephenat katalysiert, einen positiven „Fold Change“ im Vergleich Deletionsmutante gegen Wildtyp auf. Dementsprechend ist die Runterregulation bei 4-Hydroxyphenylpyruvat stärker als bei Phenylpyruvat. Es ist wahrscheinlich, dass CsrA hauptsächlich Einfluss auf die Regulation im oberen Teil des Shikimat Stoffwechselwegs nimmt und es so zu einer Akkumulation von Shikimat und 3-Dehydroshikimat kommt. Ein möglicher Mangel an aromatischen Aminosäuren

könnte durch entsprechende Aufnahme aus dem Wachstumsmedium ausgeglichen werden und wäre somit nicht direkt im Metabolom sichtbar.

Im Gegensatz zum Effekt der Deletionsmutante ist auf Transkriptomebene keine signifikante Regulation der aromatischen Aminosäuresynthese zwischen Überexpression und Wildtyp festzustellen. Die Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren sind mit Ausnahme von Tryptophan nicht verändert, welches im Überexpressionstamm einen negativen „Fold Change“ aufweist. Interessanterweise sind die beiden Vorläuferintermediate für die Synthese von Tyrosin und Phenylalanin, Phenylpyruvat und 4-Hydroxyphenylpyruvat positiv und damit genau gegensätzlich zum Vergleich Deletionsmutante gegen Wildtyp reguliert (**Anhang III**).

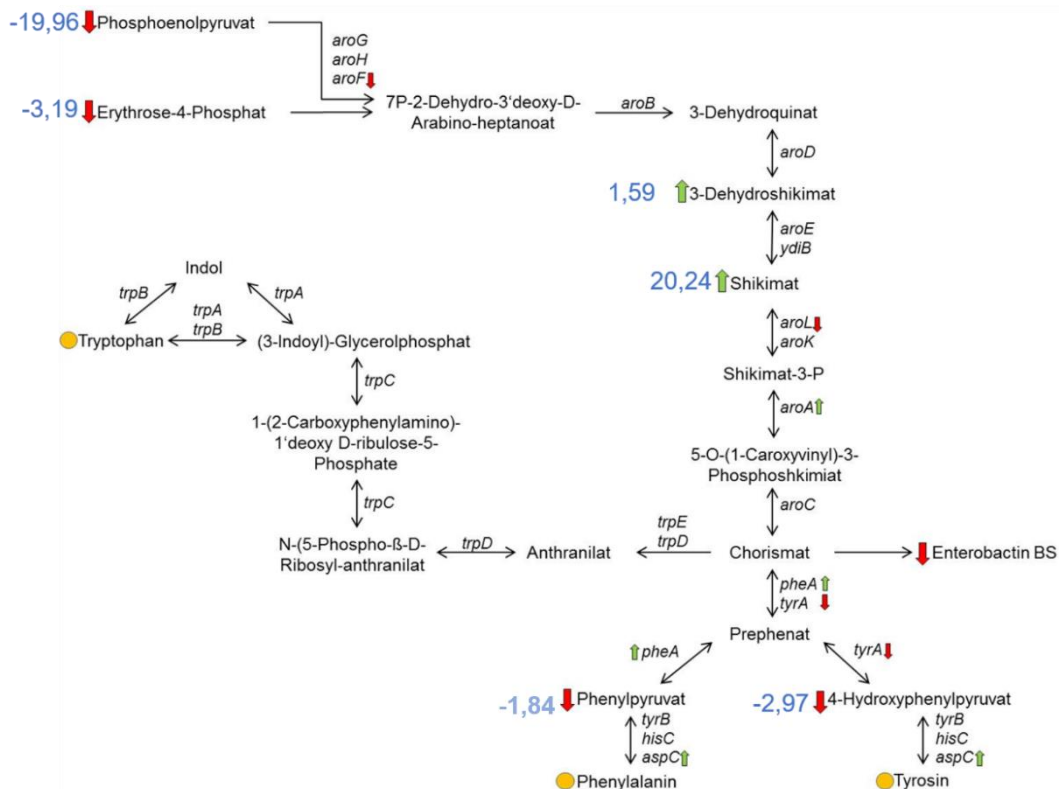


Abbildung 24: Biosynthese der aromatischen Aminosäuren bzw. Shikimate Stoffwechselweg und Indolsynthese. Rote Pfeile geben einen negativen „Fold Change“, grüne Pfeile einen positiven „Fold Change“ an. Gelbe Kreisflächen geben eine Identifikation des Metaboliten ohne Regulation an. Die „Fold Changes“ beziehen sich auf eine Regulation in der Δ *csrA* Mutante gegen den E2348/69 Wildtyp. Fold changes der Metaboliten in blau.

3.4.4 Einfluss auf die Enterobactin Biosynthese

Ausgehend von der aromatischen Aminosäuresynthese und dem Intermediat Chorismat zweigt sich die Synthese des Siderophores Enterochelin (oder auch Enterobactin) ab. Auf Transkriptomebene konnte eine negative Regulation des kompletten Synthese-Operons von Enterobactin festgestellt werden (*entABCDEF* fc > -2,5). Im Transkriptom war dies einer der stärksten Effekte im Deletionsstamm (**Abbildung 25**). Interessanterweise lässt sich der gleiche negative Effekt bei einer Überproduktion von CsrA feststellen (**Anhang II**), wobei hier die negative Regulation deutlich höhere „Fold Changes“ angibt (*entABCDEF* fc > -5). Es scheint so, als ob eine hohe Konzentration des Regulators CsrA einen ähnlich negativen Effekt auf die Biosynthese von Enterobactin hat wie eine Deletion und damit eine komplette Abwesenheit des Regulators. Einen weiteren Hinweis auf die negative Regulation von CsrA auf diesen Biosynthese Stoffwechselweg lässt sich im Metabolom beobachten. Die direkte Vorstufe von Enterobactin, 2,3 Dihydroxybenzoat war ebenfalls in dem *csrA* Überexpressionsstamm bzw. im Deletionsstamm verglichen mit dem Wildtyp negativ reguliert (**Anhang III**). Es konnte ebenfalls das Abbauprodukt von Enterobactin, 2,3-Dihydroxybenzoylserin detektiert werden, welches im Deletionsstamm negativ reguliert war (fc -4,55, pval $1,31 \cdot 10^{-8}$).

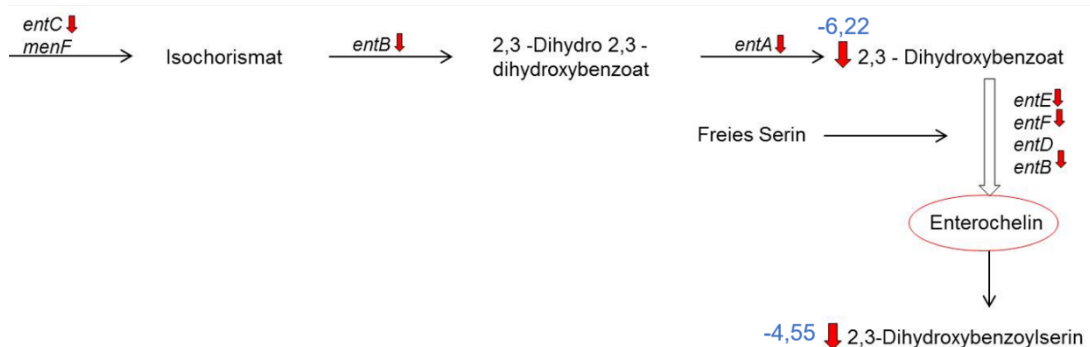


Abbildung 25: Enterochelin/Enterobactin Biosynthese. Aus dem Enterobactinbiosyntheseweg konnte nur das erste Abbauprodukt im Metabolom nachgewiesen werden. Der Einfluss der CsrA Perturbation ist allerdings im Transkriptom durch die Runterregulation des Biosynthese-Operons sichtbar. Fold changes der Metaboliten in blau.

3.4.5 Einfluss auf verschiedene Aminosäurespiegel

Neben den aromatischen Aminosäuren gab es starke Schwankungen in den Metabolitenkonzentrationen der übrigen Aminosäuren. Von den 20 proteinogenen Aminosäuren konnten 14 Aminosäuren mittels GC-MS und/oder LC-MS (positiv/negativ Modus) detektiert werden. Interessanterweise wiesen die Aminosäuren Methionin, Leucin/Isoleucin, Valin einen negativen „Fold Change“ im Vergleich Deletionsmutante gegen Wildtyp, jedoch einen positiven „Fold Change“ im Vergleich Überexpressionsmutante gegen Wildtyp auf (**Anhang III**). Die Metabolitenkonzentrationen der Aminosäuren Glutamat, Prolin, Lysin, Glycin, Aspartat und Alanin waren jedoch in keiner der getesteten Bedingungen signifikant verändert. Die Biosynthese von Leucin/Isoleucin und Valin ist über das zentrale Stoffwechselintermediat Pyruvat an die Glykolyse gekoppelt. Wie in **3.4.1** beschrieben, führt eine *csrA* Deletion zu einer Verschiebung des Kohlenstoffabbaus via Glykolyse in Richtung Glykogensynthese, sodass anzunehmen ist, dass nicht genügend Pyruvat bereitgestellt werden kann, um die Aminosäurepools der genannten Aminosäure aufrecht zu erhalten.

3.4.6 Zellhülle und Lipidstoffwechsel

Im Metabolom war eine weitere Stoffgruppe, die der Lipide bzw. Lysolipide, auffällig, die einer starken Regulation im Vergleich Deletionsmutante bzw. Überexpressionsmutante gegen Wildtyp unterlag. Wie in **2.7.3** beschrieben, wurde eine polare Extraktion für die Analyse mittels GC-MS/LC-MS genutzt, um eine Übersicht über das Metabolom zu bekommen, was zu einer Limitierung der Lipidauftrennung und Isolation führte. Dennoch konnten Lysolipide als Intermediate des Lipidstoffwechsels detektiert werden. Interessanterweise waren die detektierten Lysolipide durchgängig in der $\Delta csrA$ Mutante runter-reguliert (**Abbildung 26**), wohingegen die Lysolipid-Spezies im Vergleich Überexpression gegen Wildtyp einen positiven „Fold Change“ aufwiesen (**Anhang VII + VIII**). Die beiden cyclopropanierten Lysolipide LPE (17:0) cyc und LPG (17:0) cyc wiesen dabei im Metabolom den mit Abstand größten „Fold Change“ auf ($fc > 7-10$). Im Transkriptom lässt sich dies mit der Veränderung im Transkriptlevel der Cyclopropan-Fettsäure-Synthase erklären (*cfa*), die im Vergleich Deletionsmutante gegen Wildtyp negativ reguliert war. Im Gegensatz dazu scheint eine CsrA

Überproduktion keinen Einfluss auf den Transkriptlevel von *cfa* zu haben (**Anhang I+II**).

Um einen Einfluss von CsrA auf die Lipidkomposition und den Lipidmetabolismus zu untersuchen, wurde zusätzlich eine unpolare Extraktion und Analyse via LC-MS mit einer C8- Säule zur Auftrennung durchgeführt.

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der polaren Extraktion und HPLC-MS Analyse wurde eine schwächere Regulation der Lysolipide gemessen werden (**Anhang VI, VII, VIII**). Die bestimmten „Fold Changes“ zwischen $\Delta csrA$ Mutante und Wildtyp bzw. Überexpression und Wildtyp der Lysolipide sowie der Lipide waren bis auf wenige Ausnahmen sowohl im negativ-Modus wie auch im positiv-Modus mit einem $fc < -1,5$ reguliert. Als Ausnahme war LysoPE (17:0)_{cyc} leicht negativ reguliert im Vergleich Wildtyp gegen Mutante ($fc -2,14$, $pval 1,44 E-05$).

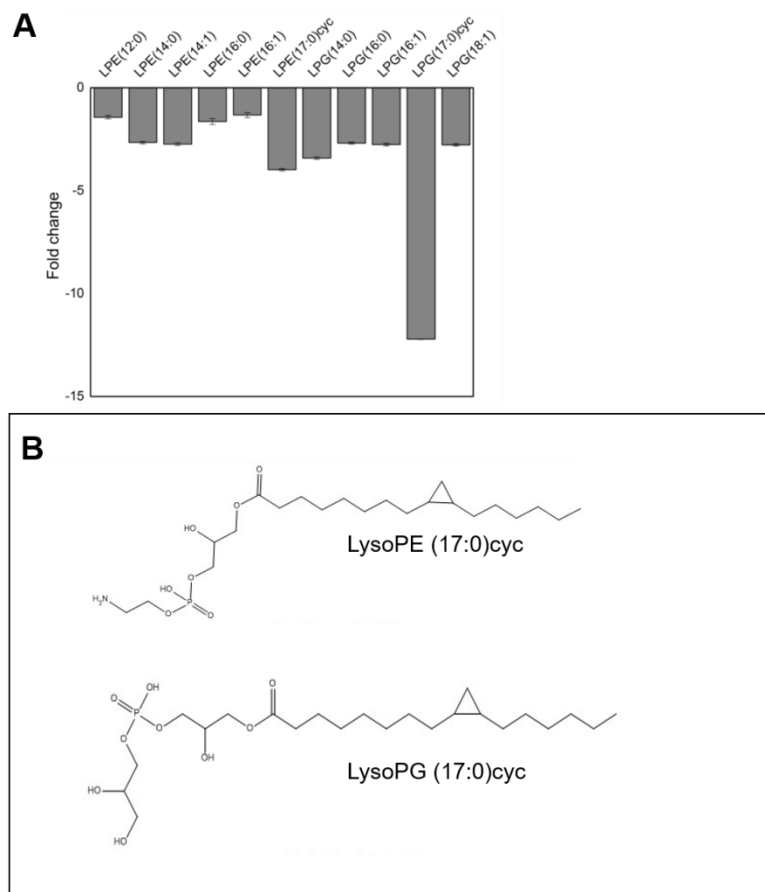


Abbildung 26: A Säulendiagramm der Lysolipidlevels von EPEC aus der polaren Extraktion. Die „Fold Changes“ geben die Abundanz der LysoPE und LysoPG Spezies in der $\Delta csrA$ Mutante gegen den Wildtyp an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus den positiv- und negativ- Modus-Daten. Die Fehlerbalken geben den relativen Fehler des „Fold Changes“ an. B: Strukturformeln der beiden cyclopropanierten Lysolipide (LPE 17:0cyc und LPG 17:0cyc)

3.4.7 Fettsäureprofil des $\Delta csrA$ Stammes sowie der *csrA* Überexpressionsmutante

Aufgrund der Veränderung der Lipidzusammensetzung, die während der unpolaren Extraktion gemessen werden konnte (siehe 3.4.6), sollten die Ergebnisse mittels einer unpolaren Extraktion via HPLC-MS und via FAME Analytik validiert werden. Mit einer FAME Derivatisierung werden alle Fettsäuren, das heißt sowohl die freien als auch die in Fetten gebundenen Fettsäuren, mit einer starken Säure als Katalysator zu Fettsäuremethylestern (eng. FAME „fatty acid methyl ester“) derivatisiert. Es konnten alle prominenten Fettsäuren in *E. coli* bestimmt werden, jedoch war keine Veränderung in der Gesamtheit der einzelnen Fettsäuren zwischen $\Delta csrA$ Mutante und Wildtyp bzw. Überexpression und Wildtyp festzustellen. Einzig Tetradecansäure Methylester wies einen erhöhten fold change auf (C14:1 fc 2,15). **Abbildung 27** zeigt die Verteilung der FAMES zwischen $\Delta csrA$ Mutante und Wildtyp anhand der integrierten Peakfläche. Die FAMES wurden mittels GC-MS und anschließendem Abgleich mit der internen CBIO-FAME Bibliothek identifiziert. Der Abgleich der Fettsäuremethylester wurde zusätzlich anhand der beiden kommerziellen BAME und FAME Mischungen abgeglichen (siehe 2.7.7). C12:0 wurde zwecks Normalisierung als interner Standard zugesetzt.

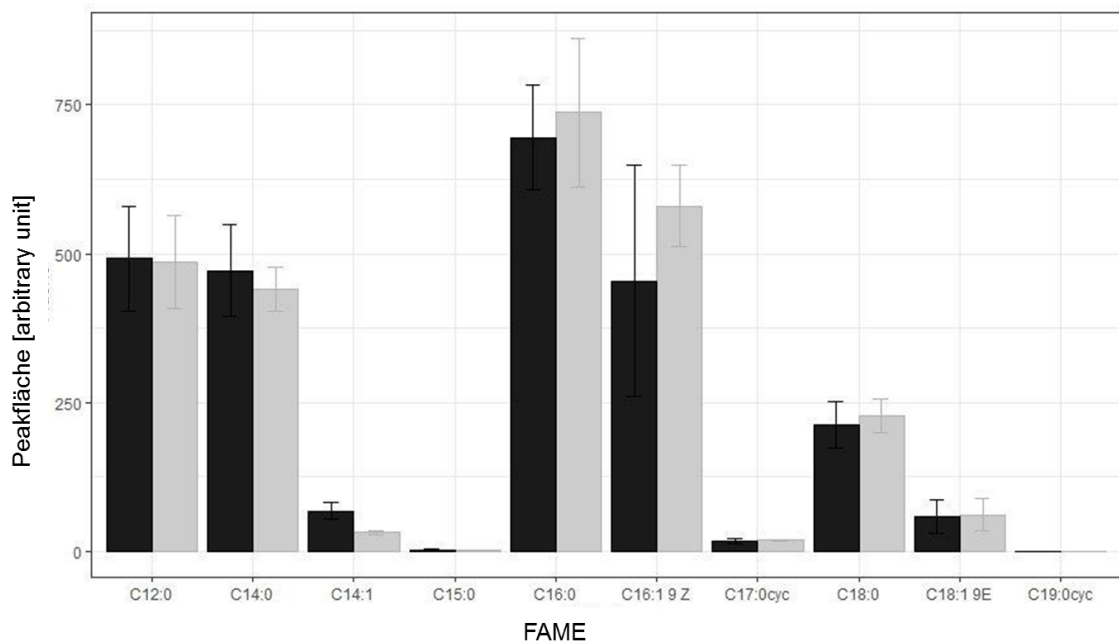


Abbildung 27: Verteilung der FAMES. Es ist die Peakfläche in „arbitrary units“ der einzelnen detektierten FAMES gezeigt. Die abundanteesten Fettsäuren in *E. coli* sind C16:0, C16:1 und C14:0. Schwarz: $\Delta csrA$ Mutante, grau: Wildtyp. C12:0 wurde zwecks Normalisierung als interner Standard zugesetzt.

Tabelle 25: Ergebnisse der FAME Analyse. Es konnten die in *E. coli* vorkommenden prominenten Fettsäureketten mittels FAME Derivatisierung und anschließender GC-MS Analytik bestimmt werden. Es konnte keine signifikante Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung zwischen Mutante bzw. Überexpression und Wildtyp gemessen werden. C17:0 wurde als interner Standard zu den Proben zugegeben und ist kein Teil der in *E. coli* natürlich vorkommenden Fettsäuren.

FAME (Bezeichnung aus der Bibliothek)	C-Kette	RI	FC $\Delta csrA$ /WT	FC OE/WT	Pval $\Delta csrA$ /WT	Pval OE/WT
Dodecansäure Methylester	C 12:0	1506,13	-1,01	-1,21	6,99E-01	2,27E-02
Tetradecansäure Methylester	C 14:1	1695,09	2,15	-1,12	4,72E-05	6,10E-02
Tetradecansäure Methylester	C14:0	1718,62	-1,07	-1,22	3,65E-01	4,73E-05
Pentadecansäure Methylester	C15:0	1820,70	-1,18	-1,50	9,71E-01	4,16E-01
Hexadecansäure Methylester	C16:1	1905,91	1,22	-1,74	9,13E-01	2,82E-01
Hexadecansäure Methylester	C16:0	1930,05	1,10	-1,20	6,14E-01	7,31E-01
Heptadecansäure Methylester	C17:0 _{cyc}	2029,94	1,04	1,04	8,27E-01	7,42E-01
Octadecansäure Methylester	C18:1	2109,86	1,06	1,01	9,69E-01	2,55E-01
Octadecansäure Methylester	C18:0	2127,49	1,07	1,17	5,13E-01	1,51E-02
Nonadecansäure Methylester	C19:0 _{cyc}	2210,72	1,66	-1,65	2,73E-04	2,16E-06

3.5 Globale Effekte von CsrA auf das Transkriptom und Strukturkomponenten

Ein globales Abbild der Vorgänge, die durch CsrA direkt reguliert oder beeinflusst werden, lässt sich nicht alleine durch eine Metabolomstudie abdecken. Viele durch CsrA regulierte Prozesse finden auf Proteinebene statt und lassen sich nicht auf der Metabolitenebene feststellen. Dazu gehören in etwa Effekte auf regulatorische Proteine, Strukturkomponenten wie das Flagellensystem oder das Typ III Sekretionssystem und zelluläre Transport- und Aufnahmesysteme. Um solche Effekte zu studieren, wurde zusätzlich aus dem gleichen Kultivierungsexperiment eine Transkriptomstudie mittels RNA-Seq. durchgeführt, die die Ergebnisse aus der Metabolomstudie ergänzt und komplementiert.

3.5.1 Effekte auf die Kolansäure-Biosynthese und Export

Im Transkriptom war eine starke Überexpression des Kolansäure-Biosynthese-Operons sowie der entsprechenden Membran-Transport-Proteine im $\Delta csrA$ Deletionsstamm sichtbar. Kolansäure, auch als M-Antigen bezeichnet, ist ein negativ geladenes Polymer aus Glucose, Galactose, Fucose und Glucuronsäure (Hanna *et al.*, 2003). Dabei bildet das Polymer eine schützende Schicht um die Zelle, das die Überlebenswahrscheinlichkeit in saurer Umgebung verbessert, welches eine Anpassung an die Bedingungen im menschlichen Gastrointestinaltrakt darstellt (Mao *et al.*, 2006). Der komplette, putative Biosyntheseweg der Kolansäure, *wcaABCDEFGHIJKLM*, (*gmd*, *gmm*, *manC*, *manB*) wies einen „Fold Change“ > 20 im Vergleich zur Deletionsmutante gegen den Wildtyp auf (**Tabelle 26**). Ebenso waren die Gene für die putativen korrespondierenden Membran-Transportproteine, die den Transport über die innere Membran und die Sekretion ins äußere Medium kontrollieren (*wza*, *wzb*, *wzc*, *wzx*C), stark überexprimiert. Die Überexpression der Kolansäure ist insofern ungewöhnlich, da das Kolansäure-Operon normalerweise nicht in planktonischer Kultur exprimiert wird (Hanna *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu gibt es keine Unterschiede im Transkriptlevel der Kolansäure-Synthesegene bzw. -Exportgene in der Überexpressionsmutante. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression der Kolansäure-Biosynthesegene positiv von dem Rcs Phosphorelay Signal System reguliert wird (Wang *et al.*, 2007), welches unter anderem auf osmotischen Stress und auf die

Anwesenheit von Glucose und Zink reagiert. Die Transkriptlevels dieses Zwei-Komponentensystems sind ebenfalls in der $\Delta csrA$ Deletionsmutante erhöht (**Tabelle 26**), welches die starke Überproduktion der Kolansäure erklärt. Konsistent damit ist, dass das „Rcs Phosphorelay Signal“ System in der Überexpression nicht exprimiert ist. In Abschnitt **3.6.3** konnte keine direkte Regulation der *wza* mRNA (erstes Gen im Kolansäuresynthese Operon) via CsrA gezeigt werden. Dahingegen wäre eine indirekte Einflussnahme von CsrA via Aktivierung des Rcs Systems auf die Kolansäure-Biosynthese möglich.

Tabelle 26: Regulation der Kolansäuresynthese- und Exportgene.

Transkript	Funktion/Enzym	FC $\Delta csrA$ / WT	FC OE/ WT
<i>wcaA</i>	Glycosyl Transferase	43,35	-1,41
<i>wcaB</i>	Kolansäure Biosyntheseprotein	43,21	-1,03
<i>wcaC</i>	Glycosyl Transferase	37,45	-1,30
<i>wcaD</i>	Kolansäure Biosyntheseprotein	36,44	-1,43
<i>wcaE</i>	Glycosyl Transferase	32,06	-1,39
<i>wcaF</i>	Acetyltransferase	32,31	-1,43
<i>wcaI</i>	Glycosyl Transferase	33,65	-1,37
<i>wcaJ</i>	UDP-glucose Lipid Carrier Transferase	30,72	-1,04
<i>wcaK</i>	Pyruvyl Transferase	38,26	1,06
<i>wcaL</i>	Glycosyl Transferase	33,96	-1,01
<i>wcaM</i>	Kolansäure Biosyntheseprotein	24,63	-1,19
<i>wza</i>	Lipoprotein zur Translokation von Polysacchariden durch die äußere Membran	49,40	-1,57
<i>wzb</i>	Tyrosin Phosphatase	48,99	-1,35
<i>wzc</i>	Tyrosin Kinase	40,64	-1,31
<i>wzx</i>	O-antigen Flippase	1,94	-1,00
<i>gmd</i>	GDP-D-Mannose Dehydratase	44,15	-1,46
Transkript	Funktion/Enzym	FC $\Delta csrA$ /WT	FC OE/WT
<i>manC</i>	GDP-Mannose Pyrophosphorylase	1,69	-1,11

<i>manB</i>	PTS System Mannose Transporter	1,41	-1,15
<i>rcaA</i>	Co-Regulator des Rcs Phosphorelay Signal Systems	6,12	-1,48
<i>rcaB</i>	Response Regulator des Rcs Phosphorelay Signal Systems	1,05	-1,36

3.5.2 Hochregulation von Virulenzgenen

In der kombinierten Metabolom- und Transkriptomstudie wurde das Wachstumsmedium auf die Expression von Virulenzfaktoren (hier Intimin Rezeptor als Proxy) optimiert. Ziel war es, den Einfluss der CsrA Deletion auf die Virulenzgenexpression zu untersuchen. Unter Standard-Kultivierungsbedingungen, z.B. in M9 Minimalmedium oder LB-Vollmedium, findet keine Expression der Virulenzgene statt. Durch die Anpassung des Wachstumsmediums wie in Abschnitt 3.2 beschrieben war es jedoch möglich, die Expression der Virulenzgene zu induzieren.

Im Transkriptom konnte gezeigt werden, dass die Transkriptlevels der Effektoren und Strukturkomponenten des Typ III Secretionssystems (T3SS) in der Deletionsmutante stark hoch-reguliert waren. Diese Virulenzgene sind auf sieben Pathogenitätsinseln (LEE1-7) organisiert (**Abbildung 28**). Die detektierten Transkripte sind mit „Fold Change“ und Zuordnung zur jeweiligen Pathogenitätsinsel in **Tabelle 27** gelistet. Für die Deletionsmutante konnte eine starke Erhöhung der Transkriptlevels für die LEE-Pathogenitätsinseln LEE1, LEE3, LEE5 und LEE7 nachgewiesen werden. Die Transkripte für die Translokatoren *espA*, *espB* und *espD*, die auf LEE4 codiert sind, waren dagegen nicht erhöht. Wohingegen die Transkriptlevels von *escF* und *espF*, die beide ebenfalls auf LEE4 codiert sind, stark erhöht waren (**Tabelle 27**). Im Gegensatz dazu waren die Transkriptlevels der *csrA* Überexpression für die LEE1 Gene überhaupt nicht reguliert. Die Transkripte der Pathogenitätsinsel von LEE3, LEE5 und LEE7 waren jedoch ähnlich stark hoch-reguliert wie im Vergleich der Deletionsmutante zum Wildtyp (**Tabelle 27**). Erstaunlicherweise waren die LEE4 Transkripte in der Überexpressionsmutante, im Gegensatz zur Deletionsmutante, ebenfalls stark erhöht (*espA*, *espB*, *espD*, *escF*, *espF*, *cesD2*). Die Expression der LEE Pathogenitätsinseln hängt von vielen Faktoren, z.B. den Umweltbedingungen, „Quorum Sensing“ sowie der transkriptionellen und der post-translationalen Kontrolle ab (Connolly *et al.*, 2015).

Zusätzlich ist der Master-Regulator der LEE-Pathogenitätsinseln, *ler*, auf LEE1 sowie zwei weitere wichtige transkriptionelle Regulatoren der LEE Gene, *grlA* und *grlR* auf LEE7 codiert. Im Deletionsstamm ist der Transkriptlevel von *ler* erhöht (fc 3,90), was die Hauptursache der stärkeren Expression der LEE Gene sein könnte. Im Gegensatz dazu ist in der Überexpressionsmutante der Transkriptlevel von *ler* nur mäßig erhöht (fc 1,64), aber dennoch sind die LEE Pathogenitätsinseln, bis auf LEE1, stark hoch-reguliert. Das Transkript des positiven Regulators der *ler* Expression GrlA war dahingehend in beiden Testbedingungen gleich stark hoch-reguliert (**Tabelle 27**). Die Expression von *ler* wird neben der Aktivierung durch GrlA und seiner eigenen Autoregulation zusätzlich von einer Vielzahl von weiteren transkriptionellen Regulatoren außerhalb der LEE-Gene gesteuert (Furniss and Clements, 2018; Gaytan *et al.*, 2016). Das Transkript von LeuO, ein pleiotropher DNA-bindender transkriptioneller Aktivator, war in der Deletionsmutante erhöht (fc 4,54), wohingegen der Transkriptlevel im Vergleich zur Überexpressionsmutante nur moderat erhöht war (fc 2,24). Ein weiterer Regulator, der nachweislich die Expression von *ler* beeinflusst, ist der transkriptionelle Aktivator des *gadABC* Operons GadE. Das *gadABC* Operon ist Teil der Stressadaptation von *E. coli* unter stark sauren Bedingungen. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *gadE* unter anderem die Expression von *ler* und den LEE-Pathogenitätsinseln signifikant erhöht (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Eine ähnliche Situation ist unter unseren Bedingungen sichtbar. Das Transkript von GadE ist sowohl in der Deletionsmutante (fc -4,96) sowie in der Überexpressionsmutante (fc - 12,02) stark runter-reguliert, was ebenfalls ein möglicher Grund für die Erhöhung des *ler* und der LEE Transkript-Level sein könnte.

Neben den LEE Virulenzgenen für das T3SS spielen die Gene für den „**bundle forming pilus**“ (BFP) eine entscheidende Rolle für die Virulenz von EPEC (Cleary *et al.*, 2004; Hicks *et al.*, 1998). Dabei ist der BFP wahrscheinlich an der initialen Anheftung an die Wirtszelle und später für die Bildung von Mikrokolonien an der Zelloberfläche nötig. Die BFP-Gene sind im Gegensatz zu den LEE-Pathogenitätsinseln nicht auf dem Hauptchromosom, sondern auf einem ca. 80 kbp großen EPEC Adhärenz-Faktor-Plasmid (engl. **EPEC adherence factor plasmid** – EAF) codiert. Die Expression des *bfp* Operons wird durch den transkriptionellen Regulator *perA* aktiviert. Die Transkriptlevels von *perA* sowie des ersten Gens des *bfp* Operons, *bfpA*, waren sowohl

in der Deletionsmutante wie auch in der Überexpressionsmutante im Vergleich zum EPEC E2348/69 Wildtyp stark erhöht (**Tabelle 27**).

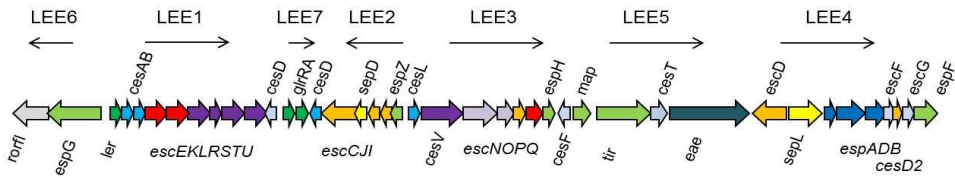


Abbildung 28: LEE Pathogenitätsinseln. Farbcode: unbekannte Funktion, Effektoren, Transkriptionelle Regulatoren, Chaperone, Export Apparat, Lytisches Enzym, Nadel Komplex, Sekretion Regulator, ATPase Komplex, Intimin, Translokator. Adaptiert aus Gaytan et al., 2016

Tabelle 27: Regulation der LEE Pathogenitätsinseln und weiterer wichtiger Virulenzfaktoren in EPEC (PI = Pathogenitätsinsel)

Transkript	PI	Funktion	FC $\Delta csrA$ /WT	FC OE/WT
<i>ler</i>	LEE1	Transkriptioneller Regulator	3,90	1,64
<i>escR</i>	LEE1	Export Apparat	5,40	1,65
<i>escS</i>	LEE1	Export Apparat	5,33	1,73
<i>escT</i>	LEE1	Export Apparat	5,47	1,85
<i>escU</i>	LEE1	Export Apparat	6,07	2,08
<i>cesD2</i>	LEE4	Chaperone	2,21	4,36
<i>glrR</i>	LEE7	Transkriptioneller Regulator	3,74	4,57
<i>glrA</i>	LEE7	Transkriptioneller Regulator	5,15	4,67
<i>escN</i>	LEE3	ATPase Komplex	7,30	7,15
<i>espH</i>	LEE3	Effektor	12,23	4,38
<i>Map</i>	-	Effektor	14,77	10,12
<i>Tir</i>	LEE5	Effektor	7,66	6,67
<i>cesT</i>	LEE5	Chaperone	11,52	9,85
<i>eaeA</i>	LEE5	Intimin	6,14	6,56
<i>espA</i>	LEE4	Translokator	1,60	4,51
<i>espD</i>	LEE4	Translokator	1,49	4,35
<i>espB</i>	LEE4	Translokator	1,24	3,45
<i>escF</i>	LEE4	Nadelkomplex	3,98	5,83
<i>espF</i>	LEE4	Effektor	3,54	4,90

<i>bfpA</i>	-	Strukturprotein „Bundle forming Pilus“	3,04	4,73
<i>perA</i>	-	Transkriptioneller Regulator (<i>bfp</i> operon)	5,07	2,11
<i>sepQ</i>	LEE3	ATPase assoziiert	8,27	5,78
<i>escV</i>	LEE3	Export Apparat	9,16	8,37

3.5.3 Effekte auf die Eisenaufnahmesysteme

In Kapitel 3.4.4 wurde auf den Einfluss der CsrA Perturbation auf das Enterobactin-Biosynthese-Operon *entABCDE* sowie auf die sichtbaren Effekte im Metabolom eingegangen. Im Transkriptom waren dazu zusätzlich zahlreiche Transkripte reguliert, die in Verbindung mit verschiedenen Eisenaufnahmesystemen in *E. coli* stehen.

Die Eisenaufnahme von *E. coli* findet hauptsächlich durch „Siderophore“ (z.B. Enterobactin/Enterochelin) statt, welche eine hohe Affinität zu dem unter sauerstoffreichen Bedingungen hauptsächlich vorliegenden Fe (III) haben. Die Energie für den aktiven Transport der Eisen-Siderophore-Komplexe wird durch den TonB-ExbB-ExbD-Komplex bereitgestellt. Im Transkriptom waren die Transkripte für den TonB-ExbB-ExbD (*tonB*, *exbD*, *exbB*) in der Deletionsmutante nur leicht negativ reguliert ($\Delta csrA$ *tonB* fc - 1,51, *exbB* fc -1,72, *exbD* fc - 2,05), wohingegen eine starke negative Regulation in der Überexpressionsmutante sichtbar war (Überexpressionsmutante *tonB* fc - 3,22, *exbB* fc -4,86, *exbD* fc - 5,80). Eisen, welches durch Enterobactin gebunden ist, wird mittels des FepABCDE Systems ins Cytoplasma transportiert. Die Transkripte des Fep-Systems waren in der Deletionsmutante nur sehr leicht runter-reguliert (*febABCDE* fc < - 2), jedoch in der Überexpressionsmutante stark reduziert (**Tabelle 28**). Die stärkste negative Regulation zeigte das Transkript für den Enterobactin-Rezeptor auf der äußeren Membran *febA* (fc -18,40) in der Überexpressionsmutante. Auch die zytoplasmatische Enterobactin-Esterase *fes* (fc - 12,53), welche die Spaltung von Enterobactin und damit die Freisetzung von Eisen katalysiert, war in der Überexpressionsmutante negativ reguliert, wohingegen keine Regulation in der Deletionsmutante sichtbar war. Trotz der starken negativen Regulation von *fes* ließ sich im Metabolom keine Regulation von 2,3-

Dihydroxybenzoylserin detektieren (siehe auch **3.4.4**). Neben dem Enterobactin Biosynthese-Operon und den entsprechenden Transportern waren zusätzlich die Transkripte von anderen Eisenaufnahmesystemen negativ reguliert. Dazu zählen in der Deletionsmutante sowie der Überexpressionsmutante die Transkripte des Hämin-Aufnahme-Systems (*chuASTU*) sowie des Colicin-Rezeptors *cirA* (**Tabelle 28**). Erstaunlicherweise konnte jedoch keine Regulation des Eisen-Aufnahme-Regulators *fur* im Transkriptom der Überexpressionsmutante oder des Deletionsstammes nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Regulation verschiedener Eisenaufnahmesysteme sowie des TonB-ExbB-ExbD Systems.

Transkript	Funktion	FC $\Delta csrA$ /WT	FC OE/WT
<i>chuA</i>	Hämin Membran Rezeptor	-8,13	-20,91
<i>chuS</i>	Hämin Transporter	-6,60	-17,16
<i>chuT</i>	Häming Bindeprotein	-2,81	-3,65
<i>chuU</i>	Hämin Permease	-1,43	-1,29
<i>cirA</i>	Colicin I Rezeptor (auch Eisenaufnahme)	-3,05	-15,79
<i>exbB</i>	TonB Komplex, Energietransfer für Eisenaufnahme Systeme	-1,72	-4,86
<i>exbD</i>	TonB Komplex, Energietransfer für Eisenaufnahme Systeme	-2,05	-5,80
<i>tonB</i>	TonB Komplex, Energietransfer für Eisenaufnahme Systeme	-1,51	-3,22
<i>fepA</i>	Ferrienterobactin Rezeptor (äußere Membran)	-1,87	-18,40
<i>fepB</i>	Ferrienterobactin-Bindeprotein (Periplasma)	-1,67	-5,78
<i>fepC</i>	ATP-Bindeprotein	-1,01	-4,83
<i>fepD</i>	Permease	-1,50	-5,49
<i>fepE</i>	Genaue Funktion unbekannt	-1,27	-2,85

<i>fepG</i>	Ferrienterobactin Rezeptor (innere Membran)	1,12	-3,42
<i>fur</i>	Negativer Regulator der Eisenaufnahme	-1,34	-1,56

3.5.4 Stress-Antwort

Eine weitere Auffälligkeit im Transkriptom der Deletions- bzw. der *csrA* Überexpressionmutante war die Hochregulation von Transkripten, die mit der allgemeinen Stressantwort, aber vor allem mit der Adaptation gegen Säurestress stehen. Im Kapitel 3.5.1 wurde schon auf die Regulation des Kolansäure-Operons eingegangen, welches ebenfalls unter sauren Bedingungen das Überleben der Zellen verbessert. Dies ist ebenfalls wichtig für die Virulenz von pathogenen *E. coli* Stämmen, da der Infektionsweg über die Magenpassage mit einem niedrigen pH-Wert verläuft.

Neben der Kolansäuresynthese, die auf eine Induzierung der Säurestressantwort hindeutet, waren besonders die Transkripte des *hdeAB* Systems, sowie das Transkript für das Membranprotein *hdeD* stark negativ reguliert (Überexpression *hdeABD* fc > -14, Δ *csrA* fc > -13). HdeA und HdeB sind Chaperone, die essentiell für das Überleben von pathogenen Enterobakterien bei niedrigen pH-Werten sind und unter Säurestress vermehrt gebildet werden (Kern *et al.*, 2007). Ein weiteres System zur Regulierung des intrazellulären pH-Wertes unter Säurestress ist das *gadABC* System. Die Transkripte der Glutamat-Decarboxylasen GadA und GadB sowie das Transkript des putativen Glutamat/ γ -aminobutyrat-Antiporter GadC waren ebenfalls in der Deletionsmutante wie auch in der *csrA* Überexpressionsmutante stark negativ reguliert (Überexpression fc > -10, Δ *csrA* fc -11). Die generelle Stressantwort in *E. coli* in stark saurer Umgebung wird über den Sigma Faktor RpoS reguliert. Erstaunlicherweise konnte in keiner Bedingung eine Regulation des *rpoS* Transkriptes nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass CsrA über einen anderen Regulationsweg auf die Säurestressantwort wirkt. Auch Transkripte, die im Zusammenhang mit „Hungerstress“, Osmosestress oder Kälteschockstress stehen, waren in den getesteten Bedingungen nicht reguliert.

3.6 Einfluss auf den Phänotyp

Aufgrund der pleiotropen Effekte von CsrA, vor allem auf die Zellhülle und Biofilmbildung (Potts *et al.*, 2017, Vakulskas *et al.*, 2015), wurde der Phänotyp der $\Delta csrA$ Mutante mit dem EPEC E2348/69 Wildtyp verglichen. Dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mutante bzw. des Wildtyps aufgenommen sowie mittels photometrischer Verfahren die relative Menge an Exopolysaccharid-Matrix und Kolansäure bestimmt.

3.6.1 Mikroskopie

Es ist bekannt, dass CsrA starke Effekte auf den Phänotyp hat (Romeo *et al.*, 1993). Im Transkriptom waren viele Gene für die Synthese und den Export der Kolansäure reguliert. Auch im Metabolom konnten verschiedene Intermediate, die in Verbindung mit der Zellwandsynthese und dem Lipidstoffwechsel stehen, identifiziert werden. Aus diesem Gründen wurden die Phänotypen der E2348/69 $\Delta csrA$ Mutante sowie des Wildtyps elektronenmikroskopisch verglichen (**Abbildung 29**).

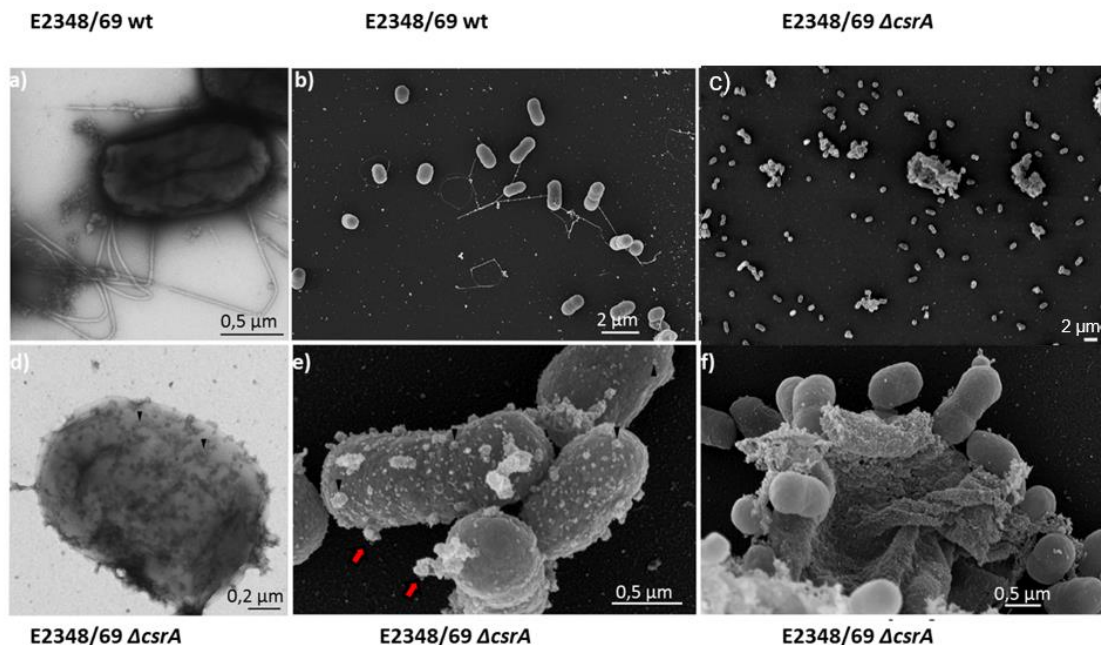


Abbildung 29: Einfluss der *csrA* Perturbation auf den Phänotyp. „negativ-stain“ Transmissionselektronenmikroskopie von EPEC E2348/69 Wildtyp (a) bzw. $\Delta csrA$ (d) Mutante. Rasterelektronenmikroskopie Aufnahme des EPEC E2348/69 Wildtyps (b) bzw. der $\Delta csrA$ Mutante (c, e, f). Die Aufnahmen wurden von M. Rohde (HZI) erstellt.

In der Negativfärbung (**Abbildung 29, a, d**) lies sich im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erkennen, dass die $\Delta csrA$ Mutante ihre typische stäbchenförmige Zellform verliert. Die $\Delta csrA$ Mutante hat eine diffuse Oberfläche und besitzt keine Flagellen mehr. Im Durchschnitt ist die $\Delta csrA$ Mutante $\sim 1,18 \mu\text{M}$ lang und somit signifikant kleiner als der EPEC E2348/69 Wildtyp ($1,45 \pm 0,07 \mu\text{M}$, $p\text{val } 1,40\text{E-}11$, **Anhang VI**). Unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wird nochmals der unterschiedliche Phänotyp der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp sichtbar. Während der Wildtyp einzelne, stäbchenförmige, flagellierte Zellen aufzeigt (**Abbildung 29, b**) bildet die $\Delta csrA$ Mutante traubenförmige Zellcluster und nimmt eine zum Teil kokkoide Zellform an (**Abbildung 29, c**). Besonders auffällig ist die blasenartige Struktur auf der Oberfläche der Zellen, die sich in der Negativfärbung als diffus und unter dem REM als vesikelartige Membranausstülpungen darstellt (**Abbildung 29, e**). Auch lässt sich eine verstärkte Biofilmbildung der $\Delta csrA$ Mutante (**Abbildung 29, f**) beobachten, die für die genutzten Wachstumsbedingungen untypisch sind und eine direkte Folge der CsrA-Perturbation darstellen könnten.

3.6.2 Einfluss auf die Biofilmbildung

Die verstärkte Bildung von Biofilm der $\Delta csrA$ Mutante war deutlich unter dem Mikroskop sichtbar. Zusätzlich war aus den Transkriptomdaten ersichtlich, dass das komplette Operon der Kolansäuresynthese- und des -exportes in der Mutante stark hochreguliert war. Dies ließ vermuten, dass es sich bei den Exportvesikeln um Kolansäure bzw. M-Antigen, welches typisch für *E. coli* ist, handeln könnte. Zudem ist aus der *E. coli* K12 *csrA:kan* Mutante bekannt, dass die Biofilmbildung durch Repression des *pga* Operons, bei Anwesenheit von CsrA reprimiert ist. Das Exopolysaccharid Poly- β -1,6-N-acetyl-D-Glucosamin (*pga*) ist ein wichtiger Bestandteil der Exopolysaccharidmatrix (EPS) in K-12 Stämmen (Wang *et al.*, 2004), fehlt allerdings in enteropathogenen *E. coli*. Die Differenzierung von Zuckern, welche für die Synthese von Kolansäure benötigt werden, ist mittels MS2 Spektren kaum möglich, sodass der Metabolomikansatz hier keinen Erkenntnisgewinn brachte. Um dennoch zu überprüfen, ob die Hochregulation des *wza* Operons zu einer gesteigerten Produktion und einen Export von Kolansäure führt, wurden zwei photometrische Assays zur Bestimmung der Glucose bzw. zur Bestimmung der Fucose aus der EPS durchgeführt (**Tabelle 29**).

Tabelle 29: CsrA hat Einfluss auf die Produktion der Exopolysaccharidmatrix und der Kolansäureproduktion.

Effekt auf die Exopolysaccharid Synthese (EPS)	E2348/69 Wildtyp	E2348/69 $\Delta csrA$
Totale EPS (Glucoseäquivalent)	10,66 ± 1,84 µg/ml	70,19 ± 11,49 µg/ml
Kolansäuresynthese (Fucose-Bestimmung)	311,32 ± 184,84 µg/ml	1016,10 ± 362,40 µg/ml

Zur Isolation der EPS wurde eine über Nachtkultur des Wildtyps bzw. der $\Delta csrA$ Mutante von einer LB-Platte verwendet. Enzymaktivitäten wurden durch Hitzeinaktivierung unterbunden. Durch Zugabe von Anthron und Schwefelsäure bildet sich ein blau-grüner Farbstoff der durch die Reaktion von Anthron mit den durch Schwefelsäure dehydratisierten Glucosemolekülen entsteht. Diese Farbreaktion lässt sich photometrisch gegen eine Glucosekalibrationskurve vergleichen (siehe **2.8.12**). Für die stationär angezogene Kultur konnte gezeigt werden, dass der EPS Gehalt in der $\Delta csrA$ Mutante circa siebenfach erhöht war, gemessen am Glucosegehalt, der als Proxy für die Gesamtheit der EPS genutzt wurde.

Zusätzlich wurde die Kolansäure von planktonisch wachsenden Zellen isoliert und die Fucose mittels eines photometrischen Assays bestimmt (siehe **2.8.10** und **2.8.11**). Nach der Isolation der Kolansäure (**2.8.10**), wurde gegen ddH₂O dialysiert, da Fucose nicht durch Dialyse entfernt werden kann. Der quantitative Nachweis basiert auf der spezifischen Farbreaktion von Cystein-Hydrochlorid mit unterschiedlichen Zuckern, der photometrisch bestimmt und anhand einer Fucose-Kalibrationskurve quantifiziert werden kann.

Fucose ist ein zentraler Bestandteil der Kolansäure und kommt sonst nicht im Stoffwechsel von Enterobakterien vor. Die photometrische Bestimmung der Fucose ergab eine siebenfach höhere Konzentration in der $\Delta csrA$ Mutante verglichen mit dem Wildtyp (**Tabelle 29**).

3.6.3 Keine direkte Regulation des Kolansäureoperons

Die Auswirkungen der CsrA Perturbation auf den Phänotyp, insbesondere auf die Biofilmbildung, waren deutlich unter dem Elektronenmikroskop sichtbar. Durch photometrische Assays konnte gezeigt werden, dass der Anteil der EPS bzw. der Kolansäure in der $\Delta csrA$ Mutante stark erhöht war. Im Transkriptom war eine extreme Hochregulation des *wza* Operons sichtbar, was die Frage aufbrachte, ob CsrA direkt an der Regulation der Kolansäuresynthese beteiligt ist, oder ob indirekte Effekte zu einer Überproduktion führen. Um dies zu überprüfen wurden EMSAs (electro mobility shift assays) mit His₆-getaggttem CsrA gegen *wza*-UTR's durchgeführt (**Abbildung 30**).

Der CsrA-EMSA ist in Abschnitt **2.8.6** beschrieben. Zu aufgereinigtem CsrA-Protein wird RNA zugegeben und für 20 min inkubiert. Die potentielle Bindung von CsrA lässt sich anhand der elektrophoretischen Trennung in einem TBE Gel bewerten (**2.8.1-2.8.7**). Es konnte keine direkte Bindung anhand eines Bandshifts durch Bindung von CsrA an die 5'UTR von *wza*, im getesteten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Es wurden zwei unterschiedlich lange Bereiche der *wza* 5' UTR getestet (A: 240 nt, B: 181 nt), die jeweils über 3 putative GGA Bindestellen verfügen. Die putativen Bindestellen GGA Motive sind in der Sequenz gezeigt (**Abbildung 30** grün). Als positiv Kontrolle wurde *rovC* (77 nt) RNA verwendet. Als Kontrolle wurde *hns* RNA (52 nt), in jeder Tasche mit aufgetragen, um unspezifische Shifts detektieren zu können. Der Shift der positiv-Kontrolle ist im „Kasten“ gezeigt (**Abbildung 30**).

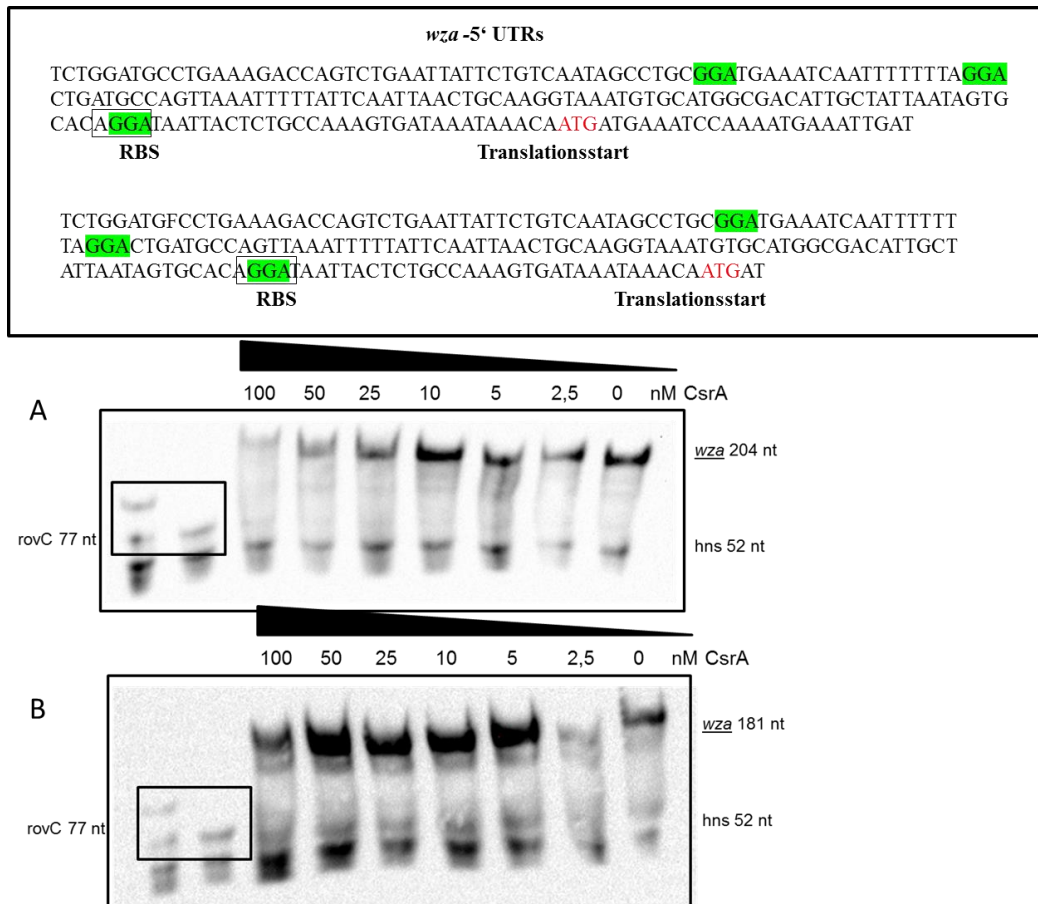


Abbildung 30: “Elektro Mobility Shift Assay” (EMSA) der 5'-UTR von *wza* (Kolansäuresynthese-Operon). Die biotinylierte *wza* RNA wurde mit CsrA-His6 in einer Konzentrationsreihe von 0-100 nM inkubiert. Biotinylierte *hns*-RNA fungierte als Negativkontrolle. *rovC*-biotinylierte RNA (schwarzer Kasten) wurde als Positivkontrolle mit einer CsrA Konzentration von 0 bzw. 100 nM inkubiert. Es konnte keine direkte Bindung bzw. ein Bandenshift durch CsrA für die beiden getesteten Fragmente beobachtet werden (A *wza*-UTR 204 bp, B *wza*-UTR 181 Bp, *hns* RNA 52 Bp, *rovC* RNA).

3.6.4 EMSAs der *cfa* und *entC* mRNA

Im Metabolom konnten Auswirkungen auf die cyclopropanierten Fettsäuren (3.4.6) und die Enterobactinbiosynthese-Metaboliten nachgewiesen werden. Eine starke Regulation der Gene der Enterobactinbiosynthese war ebenfalls im Transkriptom sichtbar. Um zu überprüfen, ob CsrA direkt an der Regulation dieser Gene beteiligt ist, wurden die 5'UTRs von *cfa* und *entC* mittels Bandshift getestet. Aufgrund der besseren Signalstärke und der besseren Reproduzierbarkeit wurden für die folgenden CsrA EMSAs radioaktiv gelabelte RNAs verwendet (siehe 2.3.7). Für die *cfa* 5' UTR wurden zwei Fragmente unterschiedlicher Länge im Bandshift untersucht (**Abbildung 31 A** 166 nt, **B** 125 nt). Die putativen Bindemotive (GGA-Motive) sind in der Sequenz grün markiert. Es konnte keine direkte Bindung von CsrA an die beiden 5'UTRs festgestellt

werden. Eine direkte Regulation von CsrA der mRNA, die für die „Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid Synthase (Cfa)“ kodiert, ist damit unwahrscheinlich. Für die Regulation im Lipidom und Transkriptom sind wahrscheinlich sekundäre Effekte einer CsrA Perturbation verantwortlich. Als Negativkontrolle wurde *hns* RNA (52 nt) verwendet.

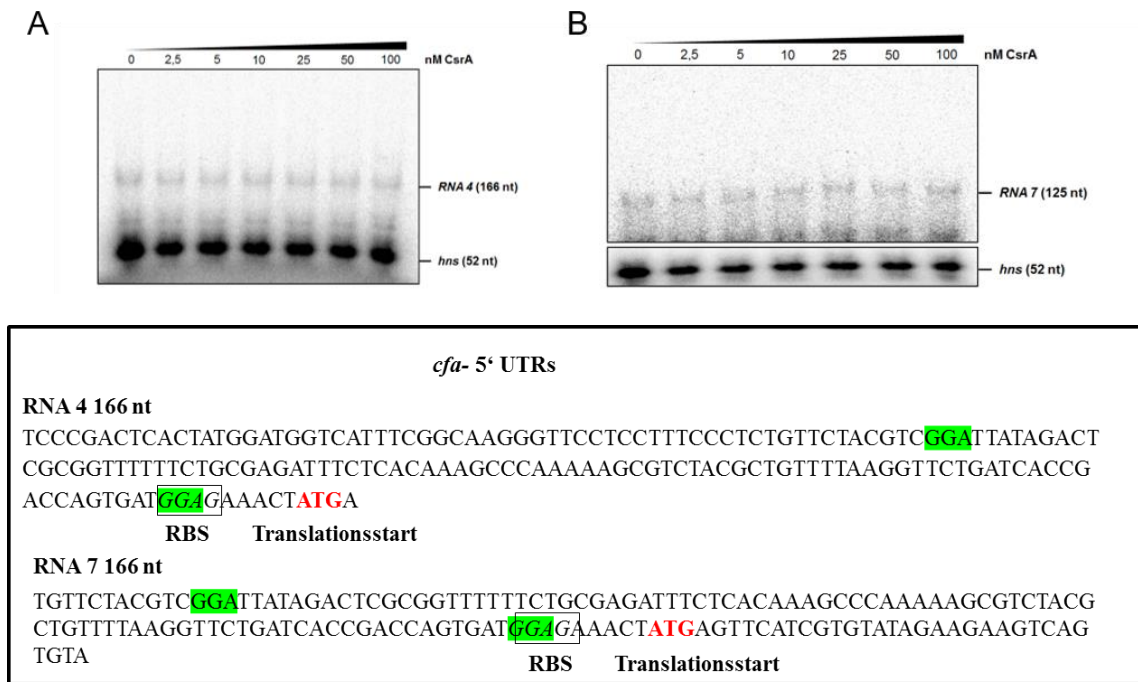


Abbildung 31: EMSAs der *cfa* 5'UTRs. Es wurden zwei unterschiedliche Fragmente im Bandshift untersucht (A: RNA4 166 nt, B: RNA7 125 nt). Es konnte kein Shift der 5'UTR festgestellt werden. Die Versuche wurden mittels Radioaktiv-Labelling von Marcel Volk (MIBI Department, Leitung Prof. Dr. Petra Dersch durchgeführt). In der Nukleotidsequenz der beiden Fragmente sind die putativen Bindestellen von CsrA (GGA-Motive - grün), die Ribosomenbindestelle (RBS), sowie das Initiations-ATG (rot) gezeigt.

Der Bandshift für die *entC* mRNAs zeigt einen leichten Shift bei der höchsten CsrA Konzentration von 100 nM CsrA (**Abbildung 32 B ***). Es konnte kein Shift in den niedrigen Konzentrationsbereichen detektiert werden. Die Negativkontrolle zeigte keinen Shift bei einer Konzentration von 100 nM CsrA, was für ein spezifisches Binden von CsrA an die *entC* RNA spricht. Die zwei putativen Bindemotive für CsrA liegen in der Shine Dalgano Sequenz und 17 Bp vom Translationsstart entfernt innerhalb der codierenden Sequenz von *entC*.

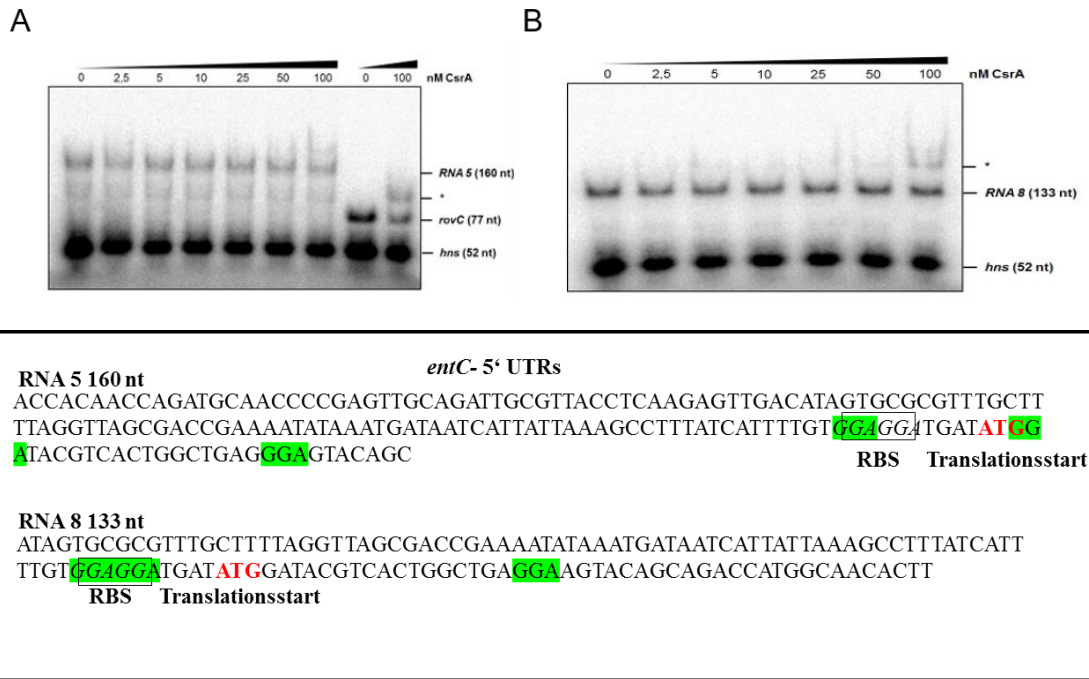


Abbildung 32: EMSAs der *entC* 5'UTRs. Es wurden zwei unterschiedliche Fragmente im Bandshift untersucht (A: RNA5 160 nt, B: RNA7 133 nt). Es konnte ein Shift für RNA8 bei der höchsten CsrA Konzentration festgestellt werden. Die Versuche wurden mittels Radioaktiv-Labelling von Marcel Volk (MIBI Department, Leitung Prof. Dr. Petra Dersch durchgeführt). In der Nukleotidsequenz der beiden Fragmente sind die putativen Bindestellen von CsrA (GGA-Motive - grün), die Ribosomenbindestelle (RBS), sowie das Initiations-ATG (rot) gezeigt. Der Shift von RNA 7 ist als * angegeben.

3.6.5 Nachweis der Glykogenüberproduktion der $\Delta csrA$ Mutante

Ein typischer Effekt einer CsrA Perturbation ist die Hochregulation des *glg* Operons, das die Glykogensynthese steuert. Der klassische Nachweis einer Überproduktion an Glykogen oder Stärke ist die Färbung mittels Jod. Jod interkaliert in die Helixstruktur des Glykogens und bildet einen tiefblauen (lila bis schwarzen) Komplex. Wie in **Abbildung 33** dargestellt ist die $\Delta csrA$ Mutante stärker gefärbt als der Wildtyp, was auf einer Hochregulation der Glykogensynthese hindeutet (**Abbildung 33 A und B**). Die stärkere Färbung der $\Delta csrA$ Mutante ist im Verdünnungsaustich in **Abbildung 33 D** noch deutlicher zu erkennen. Es ist bekannt, dass eine Perturbation von CsrA sehr schnell zu Suppressormutationen im Bereich der Glykogensynthese führt (Timmermans and Van Melderens, 2009). Zellen, die solche Mutationen aufweisen, wären schwächer gefärbt. Die Morphologie und Färbung der $\Delta csrA$ Mutante ist jedoch homogen, was eine Mischkultur aus Suppressormutanten unwahrscheinlich macht.

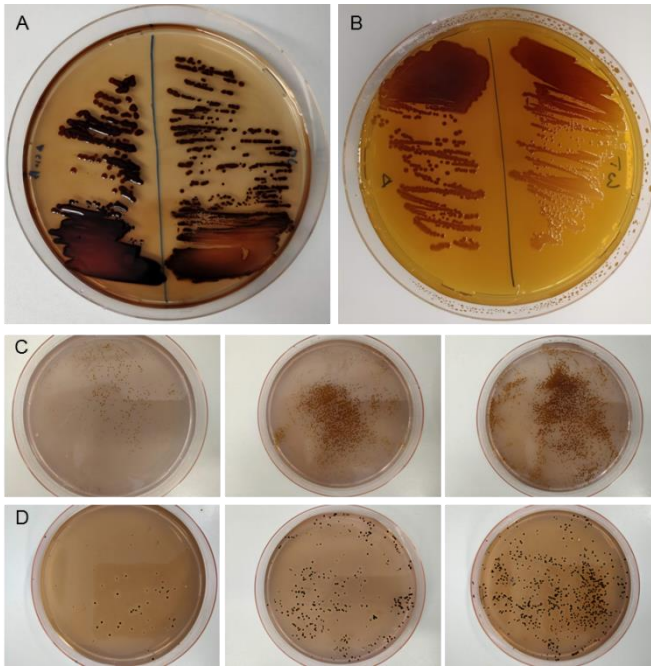


Abbildung 33: Jod Stärke Test der $\Delta csrA$ Mutante. A: Inkubation der Platte mit Jod-Dampf (links $\Delta csrA$ Mutante, rechts Wildtyp). B: Inkubation mit Lugolscher-Lösung (links $\Delta csrA$ Mutante, rechts Wildtyp). C: Verdünnungen des EPEC E2348/69 Wildtyp und D: der $\Delta csrA$ Mutante. Die Platten in Abbildung C und D wurden mit Jod bedampft. Die Akkumulation von Glykogen ist durch die dunklere Färbung der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp sichtbar.

3.7 CsrA als putatives Ziel für Antibiotika

3.7.1 Etablierung eines Screenings nach CsrA Inhibitoren

Im Zuge dieser Arbeit sollte eine „Screening-Assay“ entwickelt werden, um gezielt Inhibitoren für CsrA zu finden. Die Idee des Assays basiert auf einer CsrA-Zielsequenz, die auf einem Reportergenvektor an eine Lux-Kassette fusioniert ist. Durch das Binden von CsrA an die Ziel mRNA wird die Translation des Lux-Reporters unterdrückt. Durch einen potentiellen Inhibitor, der das Binden von CsrA an die Ziel mRNA inhibiert (Regulationsbeispiel: Blockierung der RBS), kann die Translation der Lux-Fusion stattfinden. Da es keinen bekannten Inhibitor für CsrA gibt, sollte eine Überexpression der kleinen regulativen RNAs CsrB und CsrC als Positivkontrolle fungieren (siehe 1.6, 2.2.12).

Als Zielsequenzen zur Etablierung des „Screening Assays“ wurde die Sequenz von *sepL* (EPEC) sowie *hild* (*S. Typhimurium*) in den pFU53 Vektor kloniert (siehe: 2.2.12, 0). Die Lumineszenzmessung ergab ein starkes Signal im Wildtyp Hintergrund (Abbildung 34, blau) sowie für die beiden Positivkontrollen (Abbildung 34, grün),

Überexpression von CsrB und CsrC). Im $\Delta csrA$ Hintergrund konnte keine Lumineszenz gemessen werden (**Abbildung 34, rot**). *sepL* ist Teil des LEE4 in EPEC und wird positiv von CsrA reguliert. In der Deletionsmutante findet aufgrund der Abwesenheit von CsrA keine Aktivierung von *sepL* statt, sodass auch keine Luciferase translatiert wird.

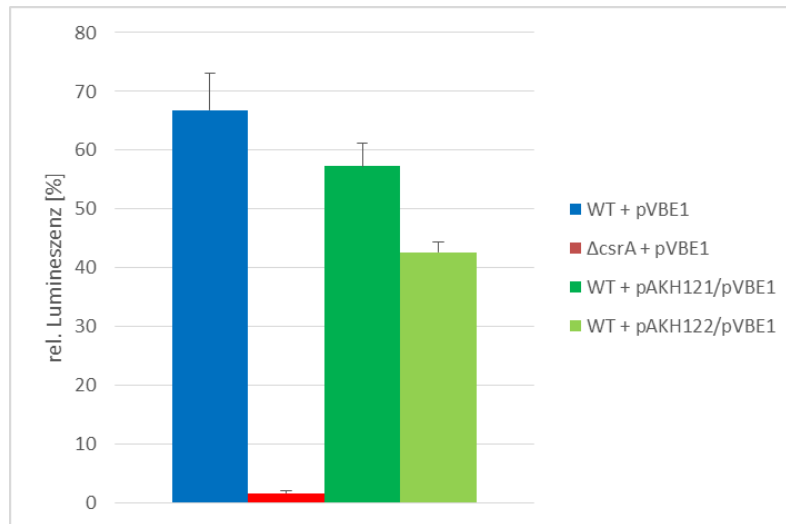


Abbildung 34: Screening System mit *sepL* als Zielsequenz. Es wurde die relative Stärke der Lumineszenz des Lux-Fusionskonstrukts (hier *sepL* als Zielsequenz) gemessen. Blau: Wildtyp, rot $\Delta csrA$, dunkelgrün: Wildtyp mit Fusionskonstrukt und Überexpression von CsrB, hellgrün Wildtyp mit Fusionskonstrukt und Überexpression von CsrC. Die Überexpression von CsrB oder CsrC sollte als Positivkontrolle fungieren. Als Qualitätsparameter wurde der Z-Faktor bestimmt. Z-Faktor = 0,4. CsrA ist ein Aktivator der Translation von *sepL*.

HilD ist ein transkriptioneller Regulator, der wichtige Funktionen für die Invasion von *S. Typhimurium* in die Wirtszelle übernimmt. Eine direkte Regulation von *hilD* durch CsrA ist in der Literatur beschrieben. Anders als *sepL* wird die *hilD* mRNA negativ durch CsrA reguliert. Das Signal im Deletionshintergrund ist dadurch deutlich stärker als im Wildtyp-Hintergrund (**Abbildung 35, blau und rot**). Für beide Testscreens konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CsrB und CsrC nicht ausreicht, um CsrA aktiv an der Bindung an die Zielsequenzen zu hindern. Der Z-Faktor für *hilD* als „Readout“ liegt bei $Z = 0,5$, für *sepL* $Z = 0,4$. Damit sind beide „Readouts“ als nicht bis wenig geeignet, um in einem Hochdurchsatz-Screen angewendet zu werden. Eine andere Möglichkeit ist das Verwenden der $\Delta csrA$ Mutante als Positivkontrolle. Allerdings weist die $\Delta csrA$ Mutante ein stark eingeschränktes Wachstumsphänotyp im Vergleich zum Wildtyp auf, was die Auswertung und Verlässlichkeit dieses Screenings-Systems erheblich einschränkt.

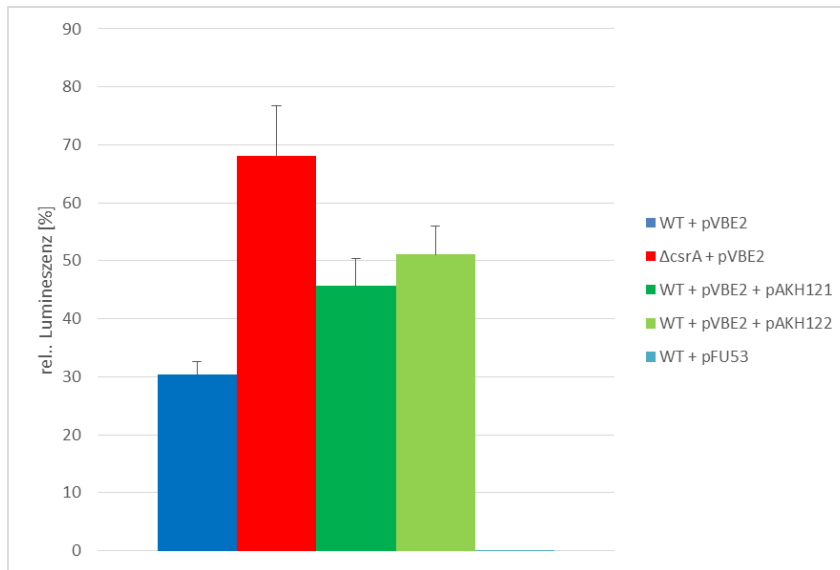


Abbildung 35: Screening System mit *hilD* als Zielsequenz. Es wurde die relative Stärke der Lumineszenz des Lux-Fusionskonstrukts (hier *hilD* als Zielsequenz) gemessen. Blau: Wildtyp, rot $\Delta csrA$, dunkelgrün: Wildtyp mit Fusionskonstrukt und Überexpression von CsrB, hellgrün Wildtyp mit Fusionskonstrukt und Überexpression von CsrC. Die Überexpression von CsrB oder CsrC sollte als Positivkontrolle fungieren. Als Qualitätsparameter wurde der Z-Faktor bestimmt. Z-Faktor = 0,5. CsrA ist ein negativer Regulator der *hilD* Translation.

3.7.2 Synergismus mit anderen Antibiotika

CsrA hat pleiotrope Effekte auf den Metabolismus und die Transkriptomlandschaft von EPEC und vielen weiteren pathogenen Organismen. Aus diesem Grund wird CsrA als ein mögliches Angriffsziel für Antibiotika diskutiert. Um zu testen, ob eine Deletion von *csrA* Einfluss auf die Resistenz gegen Antibiotika hat, wurden einige Vorversuche zur Bestimmung der MIC von Cirpofloxacin und zwei Sulfonamiden (Sulfamethazine und Sulfamethoxazol), durchgeführt. EPEC E2348/69 weist eine natürliche Resistenz gegen einige Sulfonamide auf. Es wurden keine biologischen Replikate vermessen und jeweils nur ein technisches Replikat, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt. Für den E2348/69 Wildtyp konnte eine vorläufige MIC von 0,014 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt werden. Die $\Delta csrA$ Deletionsmutante zeigte eine MIC von 0,0513 $\text{ng}/\mu\text{l}$ und damit eine stark erhöhte Sensibilität gegen Ciprofloxacin. Für die beiden Sulfonamide konnte keine erhöhte Sensibilität der $\Delta csrA$ Mutante gegen das entsprechende Antibiotikum festgestellt werden. Für Sulfamethazine wurde eine MIC von 29-30 $\mu\text{g/ml}$ und für Sulfamethoxazol eine MIC von ca. 44 $\mu\text{g/ml}$ für beide Stämme gemessen. Da es sich nur um vorläufige Ergebnisse handelt, lässt sich

nur ein Trend vorhersagen. Somit scheint CsrA nicht regulativ Einfluss auf den Resistenzmechanismus gegen Sulfonamide zu wirken.

4 Diskussion

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf einer umfassenden, kombinierten Analyse von Metabolom und Transkriptom der EPEC E2348/69 $\Delta csrA$ Deletion bzw. der *csrA* Überexpression im Vergleich zum Wildtyp, um die Funktion des Csr-Systems in EPEC zu charakterisieren. Dabei wurde eine „untargeted“ Metabolomanalyse mit Hilfe einer polaren sowie einer unpolaren Extraktion der entsprechenden Bakterienstämme durchgeführt und die identifizierten Metaboliten zusammen mit den Daten aus der RNA-Seq. verglichen, um ein umfassendes Bild über die Funktion von CsrA im bakteriellen Stoffwechsel darzustellen. Zusätzlich wurden biochemische Assays und Mikroskopie ergänzend zu den Messdaten durchgeführt, um die Effekte auf die Metabolit- und Transkriptlevels in einem biologischen Kontext zu erklären. Neben dem Hauptaugenmerk auf den Zentralstoffwechsel wurde besondere Rücksicht auf die Expression der Virulenzfaktoren genommen, um die Wichtigkeit von CsrA für die Virulenz des humanpathogenen Keims zu betonen. Da die meisten Studien zu CsrA in nicht-pathogenen *E. coli* K-12 Stämmen durchgeführt wurden und sich oftmals auf Transkriptomanalysen beschränken, wurde im Zuge dieser Studie ein kombinierter Ansatz von Metabolomik und Transkriptomik an dem human-pathogenen EPEC Stamm E2348/69 durchgeführt. Die Deletion des zentralen, post-transkriptionellen Regulators CsrA führt zu pleiotropen Effekten auf das Metabolom und das Transkriptom der Zelle. Die starken Einflüsse von CsrA auf den Zentralstoffwechsel zeigen sich in der Hochregulation von 30 Metaboliten bzw. der Runterregulation von 67 Metaboliten, hauptsächlich aus dem Zentralstoffwechsel wie der Glykolyse, dem TCA-Zyklus und der Aminosäurebiosynthese. Insgesamt konnten 159 Metabolite mit GC-MS und LC-MS identifiziert werden. Dem gegenüber stehen 2162 gefilterte „features“ aus der positiv- und negativ-Modus LC-MS Messung. Die Identifikation von unbekanntem „features“, ist grundsätzlich der Flaschenhals in der Metabolomforschung. Es ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der detektierten „features“ nicht der Anzahl der potentiellen Metaboliten entspricht, da unterschiedliche Spezies eines Metaboliten (Isotope, Addukte, Neutralverluste) verschiedene m/z Werte aufzeigen. Ein weiteres generelles Problem bei der Identifikation ist, dass im Vergleich zu Transkriptomik, Genomik oder Proteomik für Metaboliten keine Referenzdatenbanken aufgrund von Sequenzidentitäten (Genomsequenz, Aminosäuresequenz) existieren. Auch werden nur die abundantesten Features im MS fragmentiert, sodass nur für einen Bruchteil der

„features“ MS2 Spektren zur Identifikation zur Verfügung stehen. Ebenfalls entspricht ein Teil der detektierten Features Kontaminaten aus dem Extraktionsprozess, die zum Teil in abundanter Menge vorliegen können. Die Information aus dem MS2 Spektren ist in vielen Fällen zwingend notwendig, da ein m/z Wert in vielen Fällen unterschiedlichsten Metaboliten oder kleinen Molekülen zugeordnet werden kann. Existierende Datenbanken mit „in silico“ Spektren wie Metlin oder der ECMDB können die Identifikation von Metaboliten unterstützen, dennoch ist eine Validierung mittels MS2 und Retentionszeit eines gemessenen Standards nach wie vor in den meisten Fällen für eine eindeutige Identifikation erforderlich.

Zusätzlich konnten starke Effekte im Transkriptom auf Strukturkomponenten und Virulenz registriert werden (**Ergebnisse Abschnitt 3.4, Volcano Plots Abbildung 21**). Die Effekte im Transkriptom und Metabolom decken sich dabei mit Ergebnissen aus der Literatur zu Effekten einer CsrA Perturbation in *E. coli* und weiteren Organismen wie *Yersinia pseudotuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Erwinia amylovora* und *Pseudomonas aeruginosa* (Ancona *et al.*, 2016; Bucker *et al.*, 2014; LeGrand *et al.*, 2015; Potts *et al.*, 2017; Sahr *et al.*, 2017; Vakulskas *et al.*, 2015). Die Veränderungen in den spezifischen Stoffwechselwegen werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Einfluss auf den Wachstumsphänotyp

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine *csrA* Deletion starke Effekte auf den Phänotyp in *E. coli* und andere Enterobakterien sowie weiter entfernte Bakterien wie *Pseudomonaden* hat (Vakulskas *et al.*, 2015). Während in einer früheren Studie mit *E. coli* K-12 gezeigt wurde, dass CsrA für das Wachstum auf Glucose essentiell ist (Timmermans and Van Melder, 2009), wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass CsrA nicht essentiell für das Wachstum des enteropathogenen *E. coli* Stammes EPEC E2348/69 ist und eine Deletion keinen Wachstumsphänotyp hervorruft (Bhatt *et al.*, 2009). Im Widerspruch zu Bhatt *et al.* ist der Wachstumsphänotyp der $\Delta csrA$ Mutante unter den getesteten Bedingungen stark reprimiert (**Abschnitt 3.1**), was höchstwahrscheinlich auf den Mangel an Energieintermediaten und der starken negativen Regulation innerhalb der Glykolyse zurückzuführen ist, die in verschiedenen Studien schon im Metabolom und Transkriptom beschrieben wurden (Morin *et al.*,

2016; Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995). Während Bhatt *et al.* in seiner Studie mit DMEM unter mikroaeroben Bedingungen gearbeitet hat, wurden unsere Metabolom- und Transkriptomstudien unter aeroben Bedingungen in modifiziertem M9 Medium (Absatz 2.1.3) durchgeführt. Da es unter mikroaeroben Bedingungen schon zu einem deutlich verlangsamten Wachstum kommt, ist die Auswirkung auf den Wachstumsphänotyp mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht sichtbar. Ebenso, ist das Wachstum in Flüssigkultur stark von der Verfügbarkeit von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor abhängig, weshalb ein direkter Vergleich von mikroaeroben Kulturbedingungen wie in der Studie von Bhatt *et al.*, zu der in dieser Studie durchgeführten Kulturbedingung schwierig ist. Ähnliche Versuche unter aeroben Bedingungen in weiteren pathogenen Enterobakterien wie *Yersinia enterocolitica* (LeGrand *et al.*, 2015) *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia pestis* (Martinez-Chavarria and Vadyvaloo, 2015) sowie des nicht-pathogenen *E. coli* Stammes Nissle 1977 (Revelles *et al.*, 2013) und weiteren weiter entfernten Bakterienspezies, wie z.B. *Erwinia amylovora* (Ancona *et al.*, 2016) bestärken diese Vermutung, da die jeweiligen *csrA* Deletionsmutanten einen starken Wachstumsphänotyp aufwiesen. Im Gegensatz dazu hat eine Deletion von *csrA* keinerlei Effekt auf das Wachstum von *Helicobacter pylori* (Barnard *et al.*, 2004) führt aber dennoch zu ähnlichen Effekten in Bezug auf die Motilität und Virulenz dieses Pathogens, was auf eine ähnliche Funktion in diesen Stoffwechselwegen schließen lässt.

4.1.1 Abhängigkeit der Virulenzexpression von der Medienzusammensetzung

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Wachstumsmedium auf die Expression von Virulenzfaktoren optimiert, um einen Einfluss von CsrA auf die Virulenz im Metabolom und Transkriptom zu untersuchen. Als Proxy für die Expression der Virulenzgene wurde der EPEC Stamm E2348/69 mit einer genomischen Fusion von *tir-blaM* verwendet (Mills *et al.* 2007). Die Expression der *tir-blaM* Fusion ist direkt unter Kontrolle des Masterregulators des T3SS *ler* und somit ein geeigneter Proxy für die Expression der LEE-PAI. und der Virulenzgene in EPEC.

Unter Standard-Kultivierungsbedingungen etwa in LB-Vollmedium oder M9 Minimalmedium findet keine Expression von Virulenzfaktoren in EPEC statt (**Abbildung 16**), jedoch kann die Expression von Virulenzgenen in dem zur Zellkultur

genutzten Medium DMEM induziert werden (Abe *et al.*, 2002; Mellies *et al.*, 2007). Da das DMEM-Medium aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung ungeeignet für Metabolomanalysen ist, wurde versucht die Virulenzgenexpression in einem Kompromiss aus definierten Minimalmedium und gleichzeitiger Expression der Virulenzgene zu induzieren. Von dem EPEC nahe verwandten enterohämorrhagischen *E. coli* Stamm O157Sakai ist bekannt, dass die Zugabe von Bicarbonat zu M9 oder LB-Medium die Expression der Virulenzfaktoren für EPEC induzieren kann. Eine alleinige Zugabe von Bicarbonat war jedoch nicht ausreichend um den gleichen Effekt in EPEC E2348/69 hervorzurufen (Abe *et al.*, 2002). In EPEC wie auch in EHEC wird die Expression der LEE-Pathogenitätsinseln hauptsächlich über den Master-Regulator *ler* stimuliert, jedoch ist die induzierende Wirkung von HCO_3^- auf die Induktion von *ler* in EHEC weiterhin unklar. Ausgehend davon, dass eine Expression der Virulenzgene von EPEC in DMEM beobachtet werden kann, wurden die Konzentrationen von NH_4Cl , CaCl_2 , FeNO_3 und HCO_3^- entsprechend angepasst, um die verantwortlichen Komponenten zu finden, die die Virulenzgenexpression induzierten. Dies konnte durch eine Verringerung der Ammonium-Konzentration, bei gleichzeitiger Anwesenheit von FeNO_3 und einer hohen CaCl_2 Konzentration, erreicht werden (**Abbildung 16**). Dabei scheint die niedrige Konzentration von NH_4Cl hauptverantwortlich für die Induktion der Expression des Tir-Bla Fusionskonstruktes zu sein. Die gewählten Bedingungen spiegeln dabei höchstwahrscheinlich ähnliche Bedingungen, wie das natürliche Habitat von EPEC wieder, da die primäre Stickstoffquelle nach der Magenpassage die aminosäurehaltige Umgebung im Dünndarm darstellt. Ebenfalls ist aus früheren Studien bekannt, dass CaCl_2 in vielen pathogenen Organismen einen positiven Effekt auf die Expression von Virulenzgenen hat (Mellies *et al.*, 2007; Sarkisova *et al.*, 2005). Eine komplette Eliminierung von anorganischem Ammonium aus dem Wachstumsmedium führt ebenfalls zu einer starken Expression der Virulenzgene (**Abbildung 16**), allerdings auch zu extrem geringen Wachstumsraten (**siehe Abschnitt 3.2**). Dies ist damit zu erklären, dass Glutamin kein Bestandteil der zugesetzten Casaminosäuren war und für die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin via des Enzyms Glutamin-Synthetase, Ammonium benötigt wird. Dennoch bleiben die genauen Mechanismen und Unterschiede, die zu einer verstärkten Virulenzgenexpression führen, unklar.

4.2 Einfluss von CsrA auf den Zentralstoffwechsel

Eine Deletion von *csrA* hat pleiotrope Effekte auf das Metabolom und das Transkriptom des humanpathogenen *E. coli* Stamm EPEC E2348/69 (Bhatt *et al.*, 2011; Bhatt *et al.*, 2009; Vakulskas *et al.*, 2015). Im Folgenden werden die Änderungen der Metabolit- und Transkriptlevels der einzelnen Stoffwechselwege diskutiert.

4.2.1 Glykolyse und Citratzyklus

CsrA ist ein Repressor der Glykogensynthese in *E. coli* K12. In Einklang mit diesen Ergebnissen, zeigten sowohl die Transkriptom- als auch die Metabolomanalyse eine starke Verschiebung der Kohlenstoffflüsse in der EPEC $\Delta csrA$ Mutante in Richtung Glykogensynthese zu Lasten der Glykolyse. Diese gegensätzliche Regulation innerhalb des zentralen Stoffwechsels ist hauptverantwortlich für weitere Effekte auf den folgenden Citratzyklus und alle angrenzenden und abzweigenden Stoffwechselwege wie die Biosynthese von Aminosäuren und insbesondere des Shikimat-Weges. Die gegensätzliche Regulation der Glykolyse lässt sich durch den Effekt der *csrA* Deletion auf die Phosphofruktokinase bzw. aus dem konträren Schritt der Fructose-1,6-bisphosphatase erklären (**Abschnitt 3.4.1**), welche in den Transkriptomdaten ersichtlich ist. Diese beiden enzymatischen Schritte sind die wichtigsten Regulationsschritte der Glykolyse/Gluconeogenese und regulieren den Kohlenstofffluss und damit den kompletten Energiemetabolismus. Als zentrales Regulationsenzym verfügt die Phosphofruktokinase *pfk* neben einer hochaffinen Substratbindestelle auch über eine regulatorische Bindestelle für ATP. So wirkt ATP neben seiner Funktion als Substrat für die Phosphorylierung zu F1,6P auch als allosterischer Inhibitor. Bei hohen ATP Konzentrationen in der Zelle wird der K_m -Wert erhöht und die Glykolyse wird verlangsamt. Auch das Intermediat Citrat aus dem Citrat-Zyklus wirkt inhibierend auf die *pfk*. Im Gegensatz zu ATP, sind ADP und AMP nicht kovalent bindende Aktivatoren der *pfk*. Dies konträre Regulation der *fbp* und *pfk* führt zu einem dazu, dass es einen massiven Anstieg an Mehrfachzuckern (**Abschnitt 3.4.1**) gibt, die als Intermediaten der Glykogensynthese genutzt werden. Wie auch, dass der untere Teil der Glykolyse sowie der folgende Citratzyklus auf Metabolitenebene runterreguliert wird. Dieser Effekt auf die Metabolitenkonzentration der Glykolyse und des Citratzyklus konnte auch in dem nicht-pathogenen *E. coli* K-12 Stamm MG1655, der über eine

Teildeletion von CsrA in den letzten zehn Aminosäuren verfügt, beobachtet werden (Morin *et al.*, 2016) sowie in dem kommensalen *E. coli* Stamm Nissle 1917 (Revelles *et al.*, 2013). Auf Transkriptomebene konnten mittels CLIP-seq Analyse ebenfalls vergleichbare Effekte auf die Transkriptlevels der glycolytischen Enzyme in der *E. coli* MG1655 *csrA*: kan (Tn-mini Transposon) Mutante nachgewiesen werden wie sie auch in denen in dieser Arbeit gezeigten Transkriptomdaten ersichtlich sind. Zudem konnte von Potts *et al.* gezeigt werden, dass CsrA höchstwahrscheinlich die Glykolyse reguliert, indem CsrA die *pfkA* mRNA stabilisiert. Dies führt im Umkehrschluss dazu, dass in Abwesenheit des post-transkriptionellen Regulators CsrA die Glykolyse an dieser Stelle negativ reguliert wird, da nicht genügend Phosphofruktokinase gebildet werden kann und nicht genug Edukte für den Stoffwechselweg vorhanden sind (Potts *et al.*, 2017). Ob die negative Regulation der Glykolyse-Metaboliten in den darauffolgenden Schritten (DHAP, BGP, P3G, P2G, PEP, **Abbildung 22 A**) ein passiver Effekt der übergeschalteten Regulation ist oder auch weitere Schritte in der Glykolyse direkt von CsrA reguliert werden, ist jedoch weiterhin unklar und muss für die einzelnen enzymatischen Reaktionen überprüft werden. Im *E. coli* Stamm Nissle 1917 hingegen konnte via einer Kohlenstoffflux-Analyse gezeigt werden, dass der reduzierte Flux in der Glykolyse und im Citratzyklus, der auch in dieser Metabolomstudie sichtbar ist, hauptsächlich über den Pentosephosphatweg als Alternative zur Generation von Redoxäquivalenten zur Energiebereitstellung verschoben ist (Revelles *et al.*, 2013) und nicht hauptsächlich in Richtung Glykogensynthese dirigiert wird. Ob dies auch für den in dieser Studie verwendeten EPEC Stamm E2348/69 O127:H6 der Fall ist, ist aufgrund des fehlenden Nachweises der Metaboliten aus dem Pentose-Phosphat-Weg nicht ersichtlich. Es konnten lediglich Erythrose-4-Phosphat (fc -3,19, pval 9,02E-06) und ein Vorläuferintermediat Sedoheptulose 1,7- Bisphosphat (fc -2,62, pval 1,77E-05) aus diesem Stoffwechselweg nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass es in EPEC zu einer ähnlichen Verschiebung in Richtung Pentose- Phosphat-Weg kam und somit diese beiden Intermediate am Anfang des Stoffwechselweges nahezu aufgebraucht wurden. Dennoch ist eine starke Verschiebung in Richtung Glykogensynthese anhand der Intermediate (siehe **Tabelle 24**) sichtbar, die auch in Nissle 1917 gezeigt werden konnte. Jedoch scheint dieser Effekt in Richtung Glykogensynthese in EPEC weitaus stärker, da in EPEC im Gegensatz zur Nissle 1917 alle detektierten Metaboliten der unteren Glykolyse und des Citratcycluses in der $\Delta csrA$ Mutante reduziert waren. Dies könnte

zusätzlich zu stammspezifischen Unterschieden auch vom genutzten Wachstumsmedium abhängig sein. Zudem ist die Regulation der Glykogensynthese in *E. coli* anhand der direkten Interaktion von CsrA mit der 5'UTR der *glgCAP* mRNA im Bereich der RBS (Baker *et al.*, 2002) bekannt, was zusätzlich zu einer verstärkten Glykogensynthese in der $\Delta csrA$ Mutante führt. Dies ist auch in unseren Transkriptomdaten anhand einer Hochregulation der entsprechenden Transkripte in der $\Delta csrA$ Mutante sichtbar (siehe **Abbildung 23**).

Im Allgemeinen sind die Ergebnisse unserer Metabolomstudie in Bezug auf die Glykolyse, den Citratzyklus, die Glykogensynthese und die Gluconeogenese sehr ähnlich zu den Ergebnissen aus weiteren Studien zu nicht-pathogenen und industriell genutzten *E. coli* Stämmen (McKee *et al.*, 2012; Morin *et al.*, 2016; Revelles *et al.*, 2013; Sabnis *et al.*, 1995) sowie zu weiteren enteropathogenen Organismen wie *Yersinia pseudotuberculosis* (Bucker *et al.*, 2014). Dies impliziert die Wichtigkeit von CsrA in der Regulation der Verstoffwechslung von Glucose und des Energiemetabolismus in EPEC. Zusätzlich ist die Funktion von CsrA im Bereich des glykolytischen Fluxes innerhalb der Familie der pathogenen und nichtpathogenen Enterobakterien stark konserviert und somit hauptverantwortlich für den starken Phänotyp von $\Delta csrA$ Mutanten im Allgemeinen. Über die Effekte einer Überexpression von *csrA* ist weitaus weniger bekannt als über eine Deletion des globalen Regulators. Interessanterweise ist auf Transkriptebene kein signifikanter Effekt auf die Glykolyse und den Citratzyklus sichtbar, jedoch sind die Intermediate auf Metabolomebene ebenso negativ reguliert wie in der $\Delta csrA$ Mutante. Eine Ausnahme bilden die Polyzucker, die die Intermediate der Glykogensynthese darstellen und konträr zur $\Delta csrA$ Mutante durchweg negativ reguliert waren. Auf Transkriptebene lässt sich dies jedoch nicht eindeutig erklären, da sich keine signifikante Regulation der *glgCAP* Transkripte beobachten ließ. Es ist bekannt, dass die Regulation von CsrA stark dosisabhängig ist (Vakulskas *et al.*, 2015) und wahrscheinlich für die meisten Stoffwechselwege keine einfache gegensätzliche Regulation auf Transkriptebene und Metabolomebene zu erwarten ist. Zumal viele Effekte von CsrA im Metabolom nicht durch direkte Bindung an die entsprechende mRNA oder die Stabilisierung bzw. den Abbau der mRNA zu Stande kommen, sondern indirekte Effekte auf vorgeschaltete Stoffwechselwege darstellen (Potts *et al.*, 2017; Vakulskas *et al.*, 2015).

Zudem wurde ebenfalls in früheren Studien gezeigt, dass das Csr-System die Fitness von *E. coli* in Bezug auf die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoffquellen erhöht. Für die *csrA: kan* Transposon Mutante des *E. coli* Stammes MG1655 wurde beschrieben, dass CsrA für das Wachstum auf dem Komplexmedium LB essentiell ist (Timmermans and Van Melder, 2009). Durch eine Deletion des *glgCAP* Operons konnte jedoch die Mutante wieder auf LB wachsen, was darauf schließen lässt, dass die Ursache für die Wachstumsinhibition durch den reduzierten glykolytischen Flux verursacht wird (Timmermans and Van Melder, 2009). In EPEC ist CsrA nicht essentiell, führt aber zu einer starken Repression des Wachstums (**Tabelle 21**), was ebenfalls für andere Vertreter der Spezies *E. coli* gilt (Revelles *et al.*, 2013). Zusätzlich zu dem gestörten glykolytischen Flux in der EPEC $\Delta csrA$ Mutante lassen sich weitere Effekte auf die Metabolitenkonzentration im Vergleich Mutante gegen Wildtyp aufzeigen, die ebenfalls den Wachstumsphänotyp negativ beeinflussen, wie etwa in den „Nucleotid-Salvage-Pathways“, der Aminosäuresynthese und des Shikimat-Stoffwechselwegs.

4.2.2 Nucleotid-Salvage-Stoffwechselwege

Bei der Analyse der Metabolomdaten war eine starke Änderung des Metabolitenpools der Nukleoside/Nukleotide, der Redoxäquivalente sowie der Co-Faktoren (siehe **3.4.2**) auffällig. Es ist wahrscheinlich, dass diese Effekte ebenfalls, wenn man die Wichtigkeit dieser Intermediate für die DNA Replikation, mRNA Synthese und Energiebereitstellung bzw. -transfer miteinbezieht, zu einer Minderung der Teilungsgeschwindigkeit der $\Delta csrA$ Deletionsmutante beitragen. Die Metabolitenkonzentrationen der Energieintermediate bzw. Redoxäquivalente ADP, NAD, FAD und NADP waren in der $\Delta csrA$ Mutante sowie der Überexpressionsmutante signifikant reduziert. Dies kann zum einen eine generelle Folge des gestörten Energiemetabolismus durch die dosisabhängigen Effekte von CsrA sein (Glykolyse, Citratzyklus) und zum anderen durch veränderte Transkriptspiegel für wichtige Enzyme aus dem Nukleotid/Nukleosid Abbauwegen. (siehe **Abschnitt 3.4.2**). Der Effekt von CsrA auf diese Stoffwechselwege wurde bis jetzt noch nicht beschrieben, allerdings konnten durch umfassende Transkriptom-Untersuchungen ähnliche Veränderungen auf die Transkriptspiegel der entsprechenden Enzyme festgestellt werden (Potts *et al.*, 2017). Ob es sich hierbei um sekundäre Effekte oder eine direkte Regulation von CsrA

handelt, ist weiterhin unklar. Zusätzlich ließ sich eine Akkumulation von Nucleosiden und Basen (Uridin, Guanosin, Adenosin, Cytidine bzw. Guanin, Cytosin und Xanthin) und eine Verringerung der Nucleotide UMP, AMP und ADP in der $\Delta csrA$ Mutante wie auch in der Überexpressionsmutante feststellen. Der Effekt auf diese Metaboliten, die aus dem Abbau- und Recyclingstoffwechselwegen für DNA- und RNA-Molekülen stammen, ist wahrscheinlich auf die generelle Dysregulation, die eine CsrA Deletion mit sich bringt, zurückzuführen und nicht durch die Regulation auf Enzyme der Abbauwege.

4.2.3 Aminosäuren und Shikimat-Stoffwechselweg

Die Synthese von aromatischen Aminosäuren über den Shikimat-Stoffwechselweg ist ein zentraler Stoffwechselweg, der unter anderem neben den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan wichtige Vorläufer wie etwa Chorismat zur Synthese von Enterobactin liefert. CsrA als globaler Regulator des Zentralstoffwechsels hat starken Einfluss auf die Synthese der essentiellen Vorläufermetaboliten Erythrose-4-Phosphat (Pentose-Phosphat-Zyklus) und Phosphoenolpyruvat (Embden Meyerhoff Parnas Stoffwechselweg, Entner Doudoroff Stoffwechselweg) und somit auch auf die Synthese der aromatischen Aminosäuren. In dieser Studie konnte eine starke negative Regulation dieser beiden Vorläufermetaboliten in der CsrA Deletionsmutante festgestellt werden, was eine direkte Folge des gestörten Kohlenstoffflusses, vornehmlich aus der Runterregulation des unteren Teils der Glykolyse, ist (Ergebnisse **Abschnitt 3.4.1**). Interessanterweise kam es jedoch gleichzeitig zu einer Akkumulation von 3-Dehydroshikimat und Shikimat in der Deletionsmutante. Diese Akkumulation auf Metabolitenebene lässt sich mit Hilfe des Transkriptoms erklären. In der Deletionsmutante war das Transkript, welches für die Shikimat-Kinase kodiert, negativ reguliert, was ein niedrigeres Enzymlevel bewirken könnte. Dies würde im Umkehrschluss dazu führen, dass wie in unseren Metabolomergebnissen, die aufwärts gelegenen Metaboliten im Pathway akkumulieren. Gleichzeitig wird weniger Shikimat-3-Phosphat für den weiteren Stoffwechsel bereitgestellt. Dies könnte auch eine Erklärung für die negative Regulation von Phenylpyruvat und 4-Hydroxyphenylpyruvat sein, die die direkten Vorläufermoleküle für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin darstellen. Dennoch wurde keine Veränderung in den Metabolitenkonzentrationen der eigentlichen

aromatischen Aminosäuren gefunden. Da in dem benutzten Kulturmedium jedoch Casaminosäuren zugesetzt waren, könnten eventuell auftretende Engpässe in der Aminosäuresynthese durch Aufnahme aus dem Wachstumsmedium ausgeglichen werden, was die gleichbleibenden Metabolitenspiegel in Wildtyp und Deletionsmutante erklären würde. Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur beschrieben, dass eine CsrA Perturbation (Tatarko and Romeo, 2001) oder eine Manipulation des CsrA Systems durch Überexpression von CsrB (Yakandawala *et al.*, 2008) zu einer Erhöhung des zellulären Phenylalaninspiegels in industriell genutzten *E. coli* Stämmen führt. Dies wird hauptsächlich mit der höheren Bereitstellung des wichtigen Vorläuferintermediats Phosphoenolpyruvat (PEP) der entsprechenden *E. coli* K-12 Mutanten begründet (Tatarko and Romeo, 2001). Dies widerspricht den Ergebnissen dieser Studie, da weder eine signifikante Erhöhung von PEP noch von Phenylalanin in der EPEC $\Delta csrA$ Mutante gemessen wurde. Wie schon in **Abschnitt 3.4.1** angesprochen, ist die Ursache in *E. coli* K-12 eine Verschiebung des Kohlenstoffflusses in Richtung der Gluconeogenese und der Glykogensynthese, die auch durch Analyse des Metaboloms und Transkriptoms bestätigt wurde (Morin *et al.*, 2016). Zusätzlich wurde eine Verschiebung in Richtung des Pentosephosphatweg (Revelles *et al.*, 2013) beschrieben, die sich anhand unserer Ergebnisse nicht eindeutig nachweisen lässt. Es ist viel mehr wahrscheinlich, dass in dem humanpathogenen Stamm EPEC E2348/69, die Verschiebung viel stärker in Richtung Glykogensynthese verläuft und sekundär in die Produktion von Kolansäure, die auch die starke Ausprägung der $\Delta csrA$ Mutante in der Elektronenmikroskopie erklären würde (**Abschnitt 3.6.1**). Ein direkter Vergleich mit Literaturquellen ist zudem schwierig, da neben einer Vielzahl von unterschiedlichen *E. coli* K-12 Stämmen sich die verwendeten Wachstumsmedien (LB-Medium, MOPS, Medium, Kornberg Medium) sowie die Kultivierungsbedingungen (stationäre Phase, exponentielle Phase) stark unterscheiden und CsrA als globaler Regulator eine Vielzahl von weiteren Regulatoren reguliert, die wiederum abhängig von den Umweltbedingungen sind und so zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen (Dubey *et al.*, 2003).

Weiterhin ließ sich eine signifikante Erniedrigung der Metabolitenspiegel der Aminosäuren der Pyruvat-Familie (Valin, Leucin, Isoleucin) sowie von Methionin in der CsrA Mutante feststellen (**Absatz 3.4.5**). Da diese Aminosäuren auf den Vorläufer Pyruvat bzw. Oxalaspirtat (Vorläufer von Methionin) basieren, ist dies wahrscheinlich

eine direkte Folge des *fbp/pfkA* Regulationsschritts in der Glykolyse, da es dadurch zu einer Reduzierung der Metabolitenlevels im gesamten unteren Teil der Glykolyse und des angrenzenden Citratzyklus kommt und die benötigten Vorläufermetaboliten in nicht ausreichender Konzentration vorliegen (**Abbildung 22**). Die Überexpressionsmutante zeigte eine komplett gegensätzliche Regulation auf Metabolitenebene in Bezug auf die genannten Aminosäuren, obwohl die Glykolyse und der Citratzyklus auf Metabolomebene ähnlich reguliert waren. Es ist wahrscheinlich, dass die Ursache in der Dosisabhängigkeit von CsrA liegt und es sich hierbei nicht um eine direkte Regulation von CsrA durch bestimmte Transkripte handelt.

4.2.4 Lipidstoffwechsel und FAME Profil

Im Zuge dieser Arbeit wurde neben der Identifikation von Lipiden aus der polaren Extraktion (hauptsächlich Lysolipid-Spezies) eine Lipidomanalyse mittels unpolarer Extraktion durchgeführt. Eine starke Reduzierung der Lysolipidlevel, die in der polaren Extraktion mittels Chromatographie und MS Analytik über die C18 Säule detektiert wurde, konnte in der unpolaren Extraktion mittels C8-Chromatographie und MS Analytik in dem Ausmaß nicht bestätigt werden. Zusätzliche konnte auch in der Analyse des Fettsäureprofils mittels GC-FAME Analyse kein Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden (**Tabelle 25**). Lediglich Myristoleinsäure (C14:1) zeigte im Vergleich $\Delta csrA$ /Wildtyp eine signifikante Veränderung ($f_c = -2,15$, $p_{val} 6,10 \cdot 10^{-5}$). Die prozentuale Verteilung der FAMES entspricht den Angaben aus der Literatur zu *E. coli* K-12 bei einem Wachstum in LB-Vollmedium bei 37 °C, wobei C16:0 und C16:1 ca. 50 % der Masse ausmachen (Morein *et al.*, 1996). Dies lässt sich grob auch an den Ergebnissen in **Abbildung 26** erkennen. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um eine absolute Quantifizierung. Um eine präzise Aussage machen zu können, müsste jedes einzelne FAME gegen einen entsprechenden internen Standard quantifiziert werden. Es ist somit wahrscheinlich, dass CsrA keinen oder kaum einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel bzw. die Konzentration der einzelnen Lipide innerhalb der Zelle oder der Zellmembran hat. Dies ist insofern verwunderlich, da in einer integrativen Transkriptomstudie mittels „Clip-Seq“ der Fettsäure-Metabolismus (Fettsäureabbau) auf Transkriptomebene als stark von CsrA beeinflusst, ermittelt wurde (Potts *et al.*, 2017). Dennoch wurden putative Effekte von CsrA auf den Lipidmetabolismus bis jetzt noch nicht in der Literatur genauer

diskutiert. Auch der CsrA EMSA gegen die 5'-UTR von *cfa* zeigte keinen Shift an, was eine direkte Bindung von CsrA ausschließt. Sekundäre Effekte der CsrA Perturbation sind wahrscheinlich für die Veränderungen im Transkriptom für die differentielle Regulation der *cfa* mRNA verantwortlich.

4.3 Globale Effekte auf das Transkriptom und Strukturkomponenten

Neben den Einflüssen auf das Metabolom sind viele Stoffwechselwege betroffen, die sich nicht oder nur sehr vage anhand des Metabolismus ablesen lassen. Dazu gehören vor allem Strukturkomponenten wie etwa Transportproteine oder auch die Virulenzfaktoren von EPEC, da diese proteinbasiert sind und nicht auf Metabolitenebene verifiziert werden können. Um ein möglichst genaues Bild von dem Einfluss von CsrA zu erhalten, wurde dazu ergänzend zu dem Metabolomikansatz eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Da die Proben für das Metabolom (GC- und LC-MS) sowie für das Transkriptom dabei aus dem gleichen Kultivierungsbatch isoliert wurden, konnte eine gute Deckung zwischen Metabolom und Transkriptom erreicht werden.

4.3.1 Kolansäure-Biosynthese und Export

Der stärkste Effekt im Transkriptom betraf die Transkripte des Syntheseclusters sowie die beteiligten Exportgene für die Kolansäure, auch als M-Antigen bezeichnet. Dies ist ein Bestandteil der Biofilmmatrix bestehend aus den Zuckern Galactose, Fucose und Glucuronsäure (Hanna *et al.*, 2003). Im Transkriptom wurde dabei eine starke Überexpression dieser Transkripte in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp registriert, während das Synthese- und Exportcluster in der Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nicht reguliert war. Das Kolansäuresynthesecluster ist in der Familie der *Enterobacteriaceae* weit verbreitet und steht im Zusammenhang mit Pathogenität und Fitness während der Besiedlung des Wirts (Hanna *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu pathogenen Enterobakterien wie *Salmonella*, uropathogenen *E. coli* sowie enteropathogenen *E. coli* verfügen die gängigen K-12 Stämme nicht über die Kolansäuresynthese- und Exportgene (Jackson *et al.*, 2002; Miajlovic *et al.*, 2014; Mika and Hengge, 2013). Die starke Expression der Gene, die an dem Export und der

Synthese der Kolansäure beteiligt sind, ist insofern interessant, da Kolansäure normalerweise als Bestandteil des bakteriellen Biofilms nicht unter planktonischen Bedingungen exprimiert wird (Hanna *et al.*, 2003), sondern über die Anheftung an eine Oberfläche induziert wird (Danese *et al.*, 2000). Die komplexe Exopolysaccharidmatrix-Struktur ist im Metabolom als solche nicht einfach zu identifizieren, da die Zuckerbausteine nicht mit den genutzten analytischen Methoden zu unterscheiden sind. Der Syntheseweg der Kolansäure ist ausgehend von dem Zuckerabbau via Glykolyse über Glucose-6-Phosphat als Vorläufer gekoppelt und somit indirekt zwangsläufig von CsrA abhängig. Die Regulation in der Glykolyse und den angrenzenden Stoffwechselwegen wurde zuvor schon diskutiert und hat dementsprechend starken Einfluss auf die für die Kolansäuresynthese benötigten Vorläufermoleküle (siehe **Diskussion 3.4.1**). Eine Dysregulation in dem zentralen Kohlenstofffluss, der durch CsrA beeinflusst wird, beeinflusst somit die Verfügbarkeit der Precursormoleküle. Dies alleine kann allerdings nicht die starke Induktion der beteiligten Gene auf den Synthese und Export der Kolansäure erklären. Eine direkte Regulation von CsrA auf die Biofilmbildung ist in vielen Organismen beschrieben und betrifft vor allem die Synthese von Poly- β -1,6-N-Acetyl-D-Glucosamin (PGA) in *E. coli* Spezies (Mika and Hengge, 2013; Wang *et al.*, 2004). In dem für die kombinierte Metabolom- und Transkriptomstudie verwendeten EPEC Stamm E2348/69 fehlt das Synthese-Operon für PGA allerdings, was die Frage aufgeworfen hat, ob CsrA ebenfalls direkt an der Regulation der Kolansäuresynthese beteiligt ist. Dennoch konnte eine direkte Regulation des Syntheseoperons durch das Binden von CsrA an die 5'UTR der *wza* mRNA durch einen CsrA Bandshift Assay nicht gezeigt werden, obwohl das *wzABC* Operon im Transkriptom stark reguliert war (siehe **Ergebnisse Abbildung 30**). Die Expression der Biofilmgene ist, ähnlich wie die Regulation der Virulenzfaktoren, von vielen Sigma-Faktoren und Transkriptionsfaktoren sowie von mehreren Nukleotid-Signalmolekülen wie zyklischem di-GMP in hierarchischen Regulationskaskaden organisiert und somit hochkomplex, und die genauen Regulationsprozesse sind bis heute nicht verstanden worden (Mika and Hengge, 2013). Ein positiver Regulator der Biofilmbildung, und auch der Kolansäuresynthese ist das Phosphorelay Signal System (*rcsABCD*) (Ma *et al.*, 2018). Eine mögliche Erklärung wäre die direkte oder indirekte Einflussnahme von CsrA auf die Kolansäuresynthese durch Beeinflussung der Transkriptlevels des Rcs Systems, welches auch im Transkriptom der Δ *csrA* Mutante ein höheres Level aufwies als im Wildtyp und der *csrA* Überexpressionsmutante (siehe

Ergebnisse **2.8.11**). Neben der Aktivierung der Kolansäuresynthese ist das Rcs System an weiteren Biosyntheseclustern wie der K-Kapsel (Navasa *et al.*, 2013), dem Yjb Exopolysaccharid (Ferrieres *et al.*, 2007) und der Peptidoglykansynthese und der Zellteilung (Carballes *et al.*, 1999) beteiligt.

Neben der Rolle in der Biofilmbildung ist die Bildung von Kolansäure Teil der Stressantwort. So konnte in Studien gezeigt werden, dass Kolansäure an die äußere Membran bindet und die bioenergetischen Eigenschaften und Stabilität wie auch die protonenmotorische Kraft (engl. proton motif force; pmf) speziell unter Zellhüllstress und Mikronährstoffmangel unterstützt (Karlinsky *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2018; Pando *et al.*, 2017). Diese zellulären Vorgänge werden durch die Phagen-Schock-Antwort (engl. phage shock response (Psp)) via des *pspABC* Operons induziert, welches ebenfalls von CsrA abhängig ist und auch in unseren Transkriptomdaten reguliert ist (**Anhang I + II**). Außerdem ist die Anfälligkeit gegenüber Zellhüllstress genau wie die Biofilmbildung selbst bekannt dafür, die Virulenz von pathogenen Enterobakterien zu beeinflussen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Pando *et al.*, 2017; Rutherford and Bassler, 2012). Da Kolansäure insbesondere die Säureresistenz erhöht (Nwodo *et al.*, 2012), könnte die Überproduktion der Kolansäure in der Δ *csrA* Mutante indirekt Einfluss auf weitere säureassoziierte Zellsysteme nehmen. Dies würde im Umkehrschluss die starke negative Regulation der Säurestress-Proteine in der Δ *csrA* Mutante erklären, die sich im Transkriptom erkennen ließen (**siehe Ergebnisse 3.5.4**).

4.3.2 Type III Sekretionssystem und Virulenz

Ein wichtiger Aspekt der kombinierten Metabolom- und Transkriptomstudie war es, den Fokus auf die Expression der Virulenzgene in EPEC zu legen. Da es sich bei den Virulenzfaktoren der enteropathogenen *E. coli* ausschließlich um proteinbasierte Strukturen wie das LEE-codierte T3SS und die zugehörigen Effektorproteine handelt, sind Effekte einer CsrA Perturbation oder Überexpression im Metabolom nicht direkt sichtbar, im Gegensatz zu etwa den an der Virulenz beteiligten Rhamnolipide und Alkylquinolonen in *Pseudomonas aeruginosa*. Zudem musste das Wachstumsmedium wie in **3.2** beschrieben entsprechend modifiziert werden, um eine Expression der Virulenzgene zu induzieren, da die Expression der LEE-Pathogenitätsinseln abhängig von der Bindung an die Wirtszelle induziert wird und normalerweise nicht in

planktonischer Kultur aktiv ist. Die Gene für die Strukturkomponenten des T3SS sowie Gene für wichtige Effektoren, Regulatoren und Chaparone sind in EPEC auf der LEE-Pathogenitätsinsel (LEE1-7; siehe **Abbildung 28**) organisiert (Bustamante *et al.*, 2001). Im Transkriptom war eine starke Expression der LEE assoziierten Gene in der $\Delta csrA$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Dies ließ sich auch z.T. schwächer in der *csrA* Überexpressionsmutante beobachten (siehe Ergebnisse **3.5.2**). Die Regulation der LEE Expression ist hochkomplex und von einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie Ler, PerC, GrlA, GrlR, QseA, IHF, FIS, HNS (Bhatt *et al.*, 2009; Darby *et al.*, 2002; Faleev *et al.*, 1988; Forsbach-Birk *et al.*, 2004; Swimm *et al.*, 2004; Yanofsky *et al.*, 1991) abhängig, die wiederum in Abhängigkeit von Umweltbedingungen wie pH-Wert, Osmolarität, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, Ca^{2+} , Temperatur, „Quorum Sensing“ sowie HCO_3 Einfluss nehmen (Aballay and Ausubel, 2002; Tan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2001). In den meisten Fällen regulieren diese Transkriptionsfaktoren den LEE-codierten transkriptionellen Master-Regulator *ler*, der wiederum positiv die Expression von LEE1-LEE5, der monocistronischen Gene *escG*, *map*, *grlA* sowie die Expression des positiven Regulators *grlRA* reguliert (Bhatt *et al.*, 2009; Vakulskas *et al.*, 2015). In der $\Delta csrA$ Mutante konnte eine starke Expression von *ler* beobachtet werden, welche die Hochregulation der LEE-Gene erklären könnte. Zusätzlich waren die Transkriptlevels von GrlA erhöht. GrlA wiederum reguliert in einer positiven Rückkopplungsschleife die Expression von *ler* (Alikhani *et al.*, 2007). Ein weiterer Aktivator von *ler* ist LeuO, welcher ebenfalls in der $\Delta csrA$ Mutante stark erhöht war und somit über *ler* die Expression der Typ III Gene aktiviert. In früheren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von *ler* durch den Aktivator GadE des GadABC Operons beeinflusst wird (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Dieses Operon ist Teil der Säure-Stress-Antwort in *E. coli* und war negativ in der $\Delta csrA$ Mutante reguliert. Dies könnte sich positiv auf die Expression von *ler* auswirken, da eine Deletion von GadE zu einer Erhöhung der *ler* Expression und damit der LEE Pathogenitätsinseln führt (Kailasan Vanaja *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu dieser Studie wurde von Bhatt *et al.* ein gegenteiliger Effekt einer Deletion von *csrA* auf die von LEE4-kodierten Transkripte beschrieben (Bhatt *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *csrA* einen negativen Effekt auf die Transkriptlevels der LEE4 Gene sowie auf die positiven Regulatoren *ler* und *grlA* hatten, und die EPEC Zellen keine funktionellen „Actin Pedastals“ mehr auf den Wirtszellen bilden konnten. Darüber hinaus konnte die direkte Bindung von CsrA an die *espADB* mRNA gezeigt

werden (Bhatt *et al.*, 2009). Es ist wahrscheinlich, dass durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen die Effekte auf die *ler* Expression und damit die positive Aktivierung der LEE-Pathogenitätsinseln stark variieren können und somit die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studie und der Studie von Bhatt *et al.*, erklären könnten. Dabei ist unklar, in wie weit CsrA direkt auf die Regulatoren LeuO und GadE wirkt, die in dieser Studie stark exprimiert waren und wahrscheinlich für die Hochregulation von *ler* verantwortlich waren. In weiteren vergleichbaren Studien wurde zudem gezeigt, dass CsrA ebenfalls die Expression in weiteren enteropathogenen Bakterien wie *Y. pseudotuberculosis*, *Shigella flexneri* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium beeinflusst (Altier *et al.*, 2000; Gore and Payne, 2010; Heroven *et al.*, 2012; Heroven *et al.*, 2008). Die genaue Rolle von CsrA bei der Virulenzgenexpression ist somit weiterhin nicht völlig verstanden. Durch die hohe Komplexität der Regulation der LEE-Pathogenitätsinseln (**Abbildung 36**) ist die Wechselwirkung von CsrA mit der Virulenz stark von dem Wachstumsmedium abhängig. Als Masterregulator des Stoffwechsels und der Stressantwort beeinflusst somit CsrA die Virulenz indirekt über die Expression verschiedener Regelkreise, die je nach Bedingung die Expression von *ler* und damit die Expression der Virulenzgene, beeinflusst.

Neben dem T3SS waren auch die Transkriptlevels des *bfp* Operons und dessen Regulator *perA* in der $\Delta csrA$ Mutante sowie der Überexpressionsmutante hochreguliert. Das *bfp* Operon codiert für den „Bundle forming pilus“, welcher wahrscheinlich für die initiale Anheftung an die Wirtszelle benötigt wird (Cleary *et al.*, 2004; Hicks *et al.*, 1998). Die Expression *perA* ist genauso wie die Expression von *ler* stark von den Umwelteinflüssen abhängig. Es ist wahrscheinlich, dass ähnliche Effekte die Hochregulation dieses Operons erklären, welche auch schon für den Masterregulator *ler* diskutiert wurden. Zudem ist bekannt, dass bei Anwesenheit von Ammonium im Medium die Expression von *perA* gehemmt wird (Ibarra *et al.*, 2003). Das verwendete modifizierte M9 Medium verfügte nur über eine geringe Ammonium-Konzentration (1 mM), sodass der regulative Effekt auf das *bfa* Operon wahrscheinlich eine direkte Folge auf die Zusammensetzung des Wachstumsmediums ist und nicht direkt durch die CsrA Perturbation beeinflusst wird. Dennoch ist aus früheren Studien bekannt, dass die Regulation von *perA* mit der Säurestressantwort in *E. coli* wechselwirkt, welche ebenfalls mit CsrA mit reguliert wird (Ibarra *et al.*, 2003; Vakulskas *et al.*, 2015).

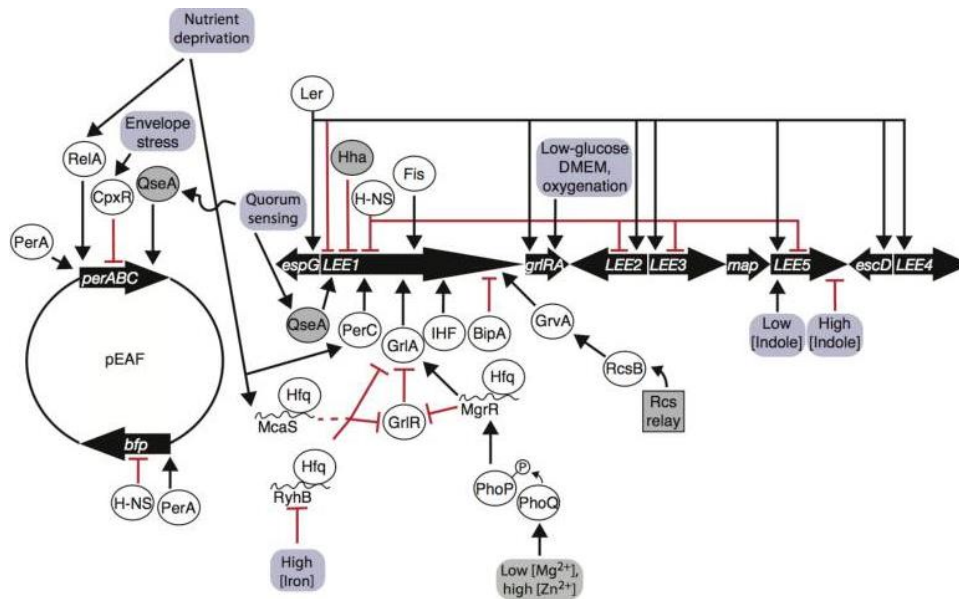


Abbildung 36: Regulation der LEE-Pathogenitätsinsel und des Virulenz-Plasmids pEAF in EPEC. Die Regulation der LEE-PAI ist stark abhängig von den Umweltbedingungen wie Eisenkonzentration, Sauerstoff- und Glucose Verfügbarkeit, Zellhüllstress sowie die Mikronährstoffdichte im Medium. Die Regulation läuft in der Regel über den Masterregulator Ler oder das GrlR/A System. Diese Abbildung wurde aus Platenkamp and Mellies, 2018⁵ entnommen.

4.3.3 Eisenaufnahmesysteme und Enterobactin Biosynthese

Im Zuge dieser Arbeit konnte ebenfalls der Einfluss der *csrA* Deletion auf die Eisenaufnahmesysteme (Transkriptom) gezeigt werden (Abschnitt 3.4.4.). Eisen ist als essentieller Mikronährstoff für die Biosynthese von Enzymen überaus wichtig und aufgrund der Limitierung im Wirt stark mit der Virulenz von EPEC bzw. Enterobakterien im Allgemeinen assoziiert (Litwin and Calderwood, 1993). Aufgrund der starken Regulation der *entABCDEF* mRNA in der *CsrA* Deletionsmutante lässt sich annehmen, dass die Expression der Enterochelin/Enterobactin und anderer Siderophore von *CsrA* beeinflusst wird. Dies könnte direkt über die Stabilität der mRNA erfolgen oder indirekt über die Regulierung eines Transkriptionsfaktors durch *CsrA*. Bis jetzt wurde in der Literatur noch kein direkter Effekt von *CsrA* auf die Eisenaufnahme beschrieben. Es ist allerdings bekannt, dass *CsrA* den Kohlenstoff- und Glucosestoffwechsel in vielen Pathogenen stark beeinflusst. Die Expression vieler Gene, die im Zusammenhang mit Virulenz und Biosynthese stehen sind unter Kontrolle des cAMP-

⁵ Die Abbildung wurde Erst-Veröffentlicht in "Frontiers of Microbiology"

Platenkamp, A., and Mellies, J.L. (2018). Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 9, 1694. © Frontiers of Microbiology.

Rezeptorprotein CRP. CRP ist ein globaler Regulator für alternative Kohlenstoffquellen, in der Abwesenheit von Glucose, und wird ebenfalls von dem Eisenaufnahmeregulator Fur beeinflusst (Potts *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2014; Shimada *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden viele Eisenaufnahmesysteme und Kontrollproteine für die Eisen-Homöostase in Transkriptom-Analysen identifiziert, die Teil des CsrA Regulons sind (Brencic and Lory, 2009; Hering *et al.*, 2016; Sahr *et al.*, 2017) und sich mit unseren Transkriptomergebnissen decken. Dies lässt vermuten, dass CsrA die Verbindung zwischen Kohlenstoffwechsel und Eisenhomöostase darstellt und somit direkten Einfluss auf die Fitness im Wirt und die damit assoziierte Virulenz von EPEC nimmt. Eine Überproduktion von CsrA führt ebenfalls zu einer Störung der Enterobactin- Biosynthese und hat somit einen ähnlichen Effekt wie eine Deletion von CsrA. Dies bestärkt die Vermutung, dass CsrA nicht direkt Einfluss auf die *entABCDEF* mRNA nimmt, sondern die negative Regulation eine Folge des gestörten Kohlenstoffflusses ist, welcher weitreichende Effekte auf weitere Regulatoren wie Crp und Fur hat. Mittels EMSA gegen die *entC* 5'UTR konnte ein leichter Shift bei einer Konzentration von 100 nM CsrA festgestellt werden (**Abbildung 32**). Ein Shift bei einer solch hohen CsrA Konzentration könnte durch unspezifisches Binden von CsrA an die mRNA zustande kommen, oder eine direkte Bindung an die „leader“ mRNA aufzeigen. Da es jedoch zu keinem Shift der Kontrollbande (*hns*) gekommen ist, ist eine direkte Bindung von CsrA wahrscheinlicher. Weiterführende Experimente sind nötig, um eine direkte Regulation des Enterobactin-Synthese-Operons von CsrA nachzuweisen, bzw. eine direkte Bindung von CsrA an die *entC* 5'UTR nachzuweisen. Als alternative Bindungsassays wären RNA „Pulldown Assays“, „Fluoreszenz in situ-hybridization co-localization“ oder „Oligonukleotide-targeted RNase H protection assays“ denkbar.

Die zusätzliche Regulation im Metabolom auf die aromatische Aminosäurebiosynthese, insbesondere auf Shikimat und dem Vorläufer 3-Dehydroshikimat, wirkt wahrscheinlich ebenfalls auf die Enterobactinbiosynthese, da das spätere Intermediat Chorismat als Vorläufer für das Siderophore essentiell ist. Die negative Regulation des Enzyms AroL ist wahrscheinlich für die Akkumulation von Shikimat verantwortlich und führt im Umkehrschluss mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer verminderten Bildung von Chorismat.

Neben der Enterobactinsynthese waren ebenfalls Transkripte verschiedener Eisenaufnahmesysteme betroffen. Hauptsächlich in der Überexpressionsmutante unterlagen die Transkripte des TonB-ExbB-ExbD Transporters sowie des FepABCDE Komplexes starker negativer Regulation (**Tabelle 28**). Interessanterweise war der negative Master-Regulator für die Eisenaufnahme *fur* nur moderat negativ in der Überexpressionsmutante reguliert. Generell waren die Effekte in der Überexpressionsmutante stärker als in der $\Delta csrA$ Deletionsmutante, wohingegen die Effekte in Bezug auf den Kohlenstofffluss in der Überexpressionsmutante deutlich schwächer waren als in der Deletionsmutante.

4.3.4 Generelle Stressantwort

Wie schon in den Abschnitten **4.3.2** und **4.3.2** der Diskussion erwähnt, war im Transkriptom eine starke Regulation von Transkripten verschiedener Stressantworten, im Besonderen der Stressantwort gegen Säurestress, auffällig. Die Transkripte des *hdeAB* Systems wie auch die Transkripte der Glutamat Decarboxylasen GadA und GadB sowie das Transkript des putativen Glutamat- γ -Aminobutyrat Antiporter GadC waren in der *csrA* Deletionsmutante wie auch in der Überexpressionsmutante stark negativ reguliert. Diese Gene werden unter sauren Bedingungen exprimiert und sichern das Überleben z.B. bei der Magenpassage bei enteropathogenen *E. coli* Stämmen. In früheren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Chaperone HdeA und HdeB essentiell für das Überleben im sauren Milieu sind (Kern *et al.*, 2007). Interessanterweise waren die Transkripte, die in Verbindung mit Hunger-, Kälte- oder Osmosestress stehen, jedoch weder in der Überexpressionsmutante noch in der Deletionsmutante, reguliert. Auch der generelle Regulator der Säurestressantwort RpoS wies keine Regulation auf, was darauf hindeutet, dass CsrA nicht direkt oder über die Regulation von RpoS auf die Säurestressantwort reguliert wird, sondern andere Effekte für die starke negative Regulation der Transkripte verantwortlich sind. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen war eine starke Produktion von Biofilm durch die $\Delta csrA$ Mutante sichtbar. Die Befunde dieser Arbeit führen zu der Hypothese, dass dieser Biofilm zu einem Großteil aus Kolansäure besteht (**Abschnitt 4.4**). Auch konnte mittels eines photometrischen Assays eine starke Produktion von Kolansäure in der Deletionsmutante bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die negative Regulation der Transkripte für die Säurestressantwort wäre demzufolge die schützende

Schicht der Kolansäure, welche eine natürliche Barriere darstellt und die Expression dieser Gene in der $\Delta csrA$ Mutante nicht benötigt wird.

4.4 Phänotyp und Mikroskopie

4.4.1 Elektronenmikroskopie und Biofilmbildung

CsrA hat eine globale Rolle in der Regulation des Metabolismus und auch eine starke Auswirkung auf den Phänotyp. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass die $\Delta csrA$ Mutante ihre stäbchenförmige Zellform verliert und stark zur Bildung von „Zellclustern“ tendiert (**Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2**). Auffällig war auch die Bildung von „Exportclustern“, bei denen es sich um den Export von Kolansäure handeln könnte. Das Operon für die Kolansäuresynthese war ebenfalls im Transkriptom stark hochreguliert und wie im **Abschnitt 2.8.11** und **Abschnitt 2.8.12** beschrieben, konnte über zwei photometrische Assays gezeigt werden, dass die $\Delta csrA$ Mutante deutlich mehr Kolansäure und Exopolysaccharidmatrix bildet, was diese Annahme bekräftigt. Dass CsrA Einfluss auf die Biofilmbildung hat, ist in der Literatur beschrieben, betrifft aber in *E. coli* Stämmen das Polysaccharid PGA, welches nicht in EPEC vorkommt (Iguchi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005). Während gezeigt werden konnte, dass CsrA direkt die Transkription von *pga* in *E. coli* reguliert, konnte in einem CsrA EMSA keine direkte Interaktion von CsrA mit der 5'UTR der Kolansäure gezeigt werden. Eine Ursache für die starke Hochregulation der Kolansäure könnte Folge des veränderten Kohlenstoffflusses über die gesteigerte Gluconeogenese sein. Das zentrale Vorläuferintermediat für die Kolansäuresynthese, Glucose-6-Phosphat, war allerdings im Metabolom nicht verändert. Die weiteren Intermediate der Kolansäuresynthese sind als Zucker nicht mit den genutzten analytischen Methoden zu identifizieren, was eine genaue Aussage erschwert. Wie schon in **Abschnitt 4.3.1** diskutiert, ist es wahrscheinlich, dass die gesteigerte Produktion von EPS eine Folge der starken Regulation auf das *rcs*-System darstellt und es sich nicht wie bei der Regulation des *pga* Operons um eine direkte Interaktion von CsrA mit dem Kolansäurebiosynthese-Operon handelt. Weiterhin ist auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen, dass die $\Delta csrA$ Mutante keine Flagellen mehr bildet, was konsistent mit vergleichbaren Studien in *E. coli* (Wei *et al.*, 2001; Yakhnin *et al.*, 2013) und anderen Organismen wie

Y. pseudotuberculosis (Heroven *et al.*, 2008) und *S. Typhimurium* (Lawhon *et al.*, 2003) ist. Dabei wurde gezeigt, dass CsrA direkt das *flhDC* Operon positiv reguliert und essentiell für die Motilität ist. Dementsprechend bildet die $\Delta csrA$ Mutante keine Flagellen aus und ist nicht motil. Die geringere Zellgröße der $\Delta csrA$ Mutante, die auf den REM Aufnahmen zu sehen ist, wird ebenfalls in der Literatur für *Yersinia* und *Escherichia* $\Delta csrA$ Mutanten bestätigt (Heroven *et al.*, 2012; Romeo *et al.*, 1993). Im Metabolom konnte ebenfalls eine leichte Runterregulation von Metaboliten der Zellwandsynthese in der $\Delta csrA$ Mutante gezeigt werden, was darauf schließen lässt, dass CsrA direkt oder indirekt Einfluss auf die Zellteilung hat (**Anhang III**). Da die Synthese von Peptidoglycan sich aus Vorläufermetaboliten des zentralen Kohlenstoffwechsels ableitet, handelt es sich hierbei aber wahrscheinlich um sekundäre Effekte aus der Regulation von CsrA der Glykolyse.

4.5 CsrA als Ziel für Antibiotika

CsrA ist ein geeignetes Ziel für mögliche Inhibitoren, da dieser posttranskriptionelle Regulator eine Vielzahl von zellulären Vorgängen steuert. Im Besonderen ist es in vielen Enterobakterien essentiell für die Ausbildung der Virulenz (Vakulskas *et al.*, 2015). Zusätzlich ist CsrA in vielen Bakterien hochkonserviert, was es zu einem ausgezeichneten Angriffspunkt für antibiotische Substanzen macht. Dies ermöglicht Virulenz und metabolische Stoffwechselwege bzw. deren Regulation gezielt zu stören und so das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Aus diesem Grund sollte ein Screening-System etabliert werden, um mögliche Inhibitoren für CsrA zu finden.

Für den „in vivo“ Screen wurden zwei CsrA Zielsequenzen (*hilD* und *sepL*) auf ihre Anwendbarkeit getestet (**Abschnitt 3.7.1**). Die grundlegende Idee des Screening Assays (**Abschnitt 1.6 und 2.2.12**) basiert auf der Bindung von CsrA an Zielsequenzen die auf einem Readout-Vektor an eine Lux-Kassette fusioniert sind. Wird die Bindung von CsrA an die Zielsequenz mittels eines Inhibitors blockiert, lässt sich dies anhand der Lumineszenz ablesen. Grundlegend funktioniert dieser Ansatz, jedoch sind die beiden getesteten Zielsequenzen (*sepL* und *hilD*) nicht geeignet, um als „Readout“ verwendet zu werden (**3.7.1**). Dies lässt sich anhand der Z-Faktor Werte von 0,4 (*sepL*) und 0,5 (*hilD*) erkennen. Der Z-Faktor (**Abschnitt 2.2.12, Formel 1**) gibt dabei die Verlässlichkeit des Screeningsystems und die Reproduzierbarkeit an, und sollte für

einen validierten Assay $> 0,5$ sein. Des Weiteren fehlt eine verlässliche Positivkontrolle, die den Assay absichert. Eine Überexpression der regulativen RNAs CsrB und CsrC ist nicht ausreichend, um CsrA effektiv zu sequestrieren, was zu den niedrigen Z-Faktor-Werten (**3.7.1**) führt. Die $\Delta csrA$ Deletionsmutante selbst als Positivkontrolle zu verwenden hat den großen Nachteil, dass diese Mutante einen starken Wachstumsphänotyp aufweist, was eine spätere Validierung und Auswertung der Messergebnisse stark einschränkt. Ideale Zielsequenzen für einen „Readout“ sollten eine direkte Interaktion von CsrA mit der mRNA (EMSAs) aufzeigen. Zudem sollte die Affinität von CsrA an die Zielsequenz nicht zu hoch sein, damit ein sequestrieren durch CsrB/CsrC überhaupt erst effektiv ermöglicht wird. Ein weiteres Problem bei der Umsetzung des „Screenings“ ist, dass CsrA-regulierte Sequenzen oftmals von vielen weiteren Transkriptionsfaktoren und Regulatoren reguliert werden. Als genereller Vorteil für ein „Screening System“, dass auf einen in „vivo Test“ basiert ist, dass die Testmoleküle zuerst die Zellhülle penetrieren müssen, um eine inhibitorische Wirkung auf CsrA auszuwirken. Ein direktes Wirken einer antibiotischen Substanz gegen CsrA wäre demnach eine sehr gute Möglichkeit bakterielle Infektionen zu behandeln. Dennoch wäre ein „Prä-Screening“ auf in „vitro Ebene“ wie vorher beschrieben sinnvoller als ein direktes „screenen in vivo“, da die Reproduzierbarkeit des Assays stark eingeschränkt ist. Eine Kombination des „in vivo“ Systems mit einer idealen Zielsequenz von CsrA mit einem „Prä-Screening“ wie von Maurer *et al.*, 2016 publiziert, wäre somit eine gute Möglichkeit um die Vor- und Nachteile beider Screeningsysteme komplementär zu nutzen.

In einigen Vorversuchen wurde der Einfluss von Antibiotika auf den EPEC E2348/69 Wildtyp bzw. die $\Delta csrA$ Mutante untersucht (siehe **Abschnitt 4.5**). Es handelt sich hier um vorläufige Ergebnisse, die mit entsprechenden Kontrollen und Replikaten verifiziert werden müssen. Die bestimmte MIC für Ciprofloxacin (0,014 $\mu\text{g/ml}$) für den EPEC Wildtyp, stimmt mit den Werten in der Literatur überein (*E. coli* MIC 0,004-0,064 $\mu\text{g/ml}$; <https://mic.eucast.org>). Die $\Delta csrA$ Mutante zeigte eine stark erhöhte Sensibilität für Ciprofloxacin, jedoch konnten keine Unterschiede im Bezug auf die Resistenz gegen die Sulfonamide Sulfamethazine und Sulfamethoxazol zwischen dem Wildtyp und der $\Delta csrA$ Mutant bestimmt werden. In der Literatur wird die MIC für die beiden Sulfonamide in einem Konzentrationsbereich von 2-64 $\mu\text{g/ml}$ angegeben (Sulfamethazine: 20-40 $\mu\text{g/ml}$, Sulfamethoxazol: 2-64 $\mu\text{g/ml}$; <https://mic.eucast.org>).

Diskussion

Es ist daher anzunehmen, dass CsrA keinen Einfluss auf den Resistenzmechanismus gegen Sulfonamide hat. Die beiden Sulfonamide hemmen kompetitiv ein wichtiges Enzym der Folsäuresynthese (Dihydropteroat-Synthase). EPEC E2348/69 verfügt über die Gene *sul1/sul2*, die für eine Dihydropteroat-Synthase codieren, die nicht durch die beiden Sulfonamide gehemmt wird (Ferdous *et al.*, 2016). Die erhöhte Sensibilität gegen Ciprofloxacin, ist wahrscheinlich ein sekundärerer Effekt der CsrA Deletion, da die Deletion dieses zentralen Regulators alleine schon zu einem hohen Stress für den Organismus führt.

5 Ausblick

Diese Studie lieferte neue Erkenntnisse für die komplexe Regulation des Csr-Systems in dem enteropathogenen *Escherichia coli* Stamm EPEC E2348/69. Der dabei genutzte „multi’omics“ Ansatz, eine Kombination aus verschiedenen Chromatographie-Techniken, gekoppelt an hochauflösende Massenspektrometrie und RNA-Sequenzierung, erweiterte das Spektrum an beeinflussbaren metabolischen Stoffwechselwegen und Regulationskreisläufen des Csr-Systems. Besonders die Funktion in der Regulation der Virulenz konnte auf Transkriptomebene durch Kultivierung in einem speziellen Wachstumsmedium rekonstruiert werden. Dennoch ist es schwierig, bei einem solch komplexen Regulationsnetzwerk wie dem Csr-System, detaillierte Informationen über die direkte Regulation von CsrA zu gewinnen. Die putativen Ziele, die mittels Metabolom- und Transkriptomanalyse gefunden wurden, müssen einzeln über CsrA EMSAs in weiteren Experimenten validiert werden. Alternativ wäre eine CLIP-Seq. für EPEC, als Hochdurchsatzverfahren geeignet um direkt RNAs zu identifizieren, die putativ von CsrA reguliert werden, wie sie von Potts *et al.* in *E. coli* K-12 durchgeführt wurde.

Auch ist die Anwendung von „untargeted metabolomics“ insofern beschränkt, da nicht alle Metaboliten eines spezifischen Pathways in einer Messung erfasst werden können. „Targeted Metabolomstudien“ zur Regulation des Csr-Systems in der aromatischen Aminosäuresynthese, des „Nukleoid-Salvage-Stoffwechselwegs“ sowie in der Enterobactin Biosynthese können dieses Bild vervollständigen. Auch die detaillierte Abbildung des Kohlenstoffflusses sollte über „targeted metabolomics“ und Fluxome-Analyse weiter untersucht werden, um die Nutzung der verschiedenen Glykolyse-Wege in der *E. coli* $\Delta csrA$ Mutante (Emden Meyerhoff Parnas Pathway und Endner Douderoff Pathway) zu untersuchen. Interessant wäre zudem eine Kopplung mit Exometabolomanalysen und Zellfraktionierungsassays, um zu klären, inwiefern eine CsrA Perturbation die Aufnahme von verschiedenen Kohlenstoffquellen beeinflusst, da im Transkriptom starke Effekte auf die Zuckertransportsysteme festgestellt werden konnten. Auch die Verwendung von alternativen Chromatographietechniken wie der Kapillarelektrophorese gekoppelt an ein hochauflösendes Massenspektrometer können bei der Trennung hochpolarer Metaboliten (z.B. Zucker) angewendet werden, sodass eine Unterscheidung über die Retentionszeit ermöglicht wird.

Der in dieser Studie teiletablierte „Screening Assay“, stellt eine Möglichkeit dar, nach CsrA Inhibitoren in „vivo“ zu „screenen.“ Die getesteten Zielsequenzen sind hierfür allerdings nur sehr bedingt geeignet. Bindungsstudien von CsrA an spezifische Zielsequenzen (z.B. *glgC*) sollten zuvor validiert werden, bevor sie in einem Testscreen auf Reproduzierbarkeit getestet werden. Das Nutzen der $\Delta csrA$ als Positivkontrolle stellt einen Kompromiss zu der Überexpression von CsrB/CsrC da. Allerdings erschwert dies erheblich die Auswertung des „Screening Systems“, da die Mutante einen starken Wachstumsdefekt aufweist. Alternativ könnte das System mit einer partiellen Deletion von CsrA wie von (Bhatt *et al.*, 2009; Timmermans and Van Melderen, 2009) beschrieben, getestet werden, da diese Mutante keinen Wachstumsphänotyp aufwies. In diesem Ansatz wäre die Verwendung der partiellen Deletionsmutante eine geeignetere Positivkontrolle. Aus den vorläufigen MIC Ergebnissen konnte kein Zusammenhang zwischen *csrA* Deletion und Resistenz gegen Sulfonamide festgestellt werden. Anstelle des verwendeten EPEC Stammes E2348/69 wäre die Verwendung eines ESBL-Stammes (z.B. EPEC O25:H4, DSM 22664) interessanter, um die Effekte einer CsrA Deletion auf die entsprechenden Resistenzmechanismen zu untersuchen.

6 Quellenverzeichnis

- Aballay, A., and Ausubel, F.M. (2002). *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 5, 97-101.
- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A., and Sasakawa, C. (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70, 3500-3509.
- Alikhani, M.Y., Mirsalehian, A., Fatollahzadeh, B., Pourshafie, M.R., and Aslani, M.M. (2007). Prevalence of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children with and without diarrhoea in Iran. *J Health Popul Nutr* 25, 88-93.
- Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S.D. (2000). Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* 68, 6790-6797.
- Ancona, V., Lee, J.H., and Zhao, Y. (2016). The RNA-binding protein CsrA plays a central role in positively regulating virulence factors in *Erwinia amylovora*. *Sci Rep* 6, 37195.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* 10, 156-163.
- Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44, 1599-1610.
- Bantscheff, M. (2012). Mass spectrometry-based chemoproteomic approaches. *Methods Mol Biol* 803, 3-13.
- Barnard, F.M., Loughlin, M.F., Fainberg, H.P., Messenger, M.P., Ussery, D.W., Williams, P., and Jenks, P.J. (2004). Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 51, 15-32.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 57.
- Berg, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.

- Bergmaier, D., Lacroix, C., Guadalupe Macedo, M., and Champagne, C.P. (2001). New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 401-406.
- Bhatt, S., Anyanful, A., and Kalman, D. (2011). CsrA and TnaB coregulate tryptophanase activity to promote exotoxin-induced killing of *Caenorhabditis elegans* by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193, 4516-4522.
- Bhatt, S., Edwards, A.N., Nguyen, H.T., Merlin, D., Romeo, T., and Kalman, D. (2009). The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 77, 3552-3568.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3027-3030.
- Bolin, I., Norlander, L., and Wolf-Watz, H. (1982). Temperature-inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid. *Infect Immun* 37, 506-512.
- Bolten, C.J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J.C., and Wittmann, C. (2007). Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal Chem* 79, 3843-3849.
- Bonett, D.G., and Price, R.M. (2002). Statistical inference for a linear function of medians: confidence intervals, hypothesis testing, and sample size requirements. *Psychol Methods* 7, 370-383.
- Borner, J., Buchinger, S., and Schomburg, D. (2007). A high-throughput method for microbial metabolome analysis using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 367, 143-151.
- Brencic, A., and Lory, S. (2009). Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* 72, 612-632.
- Bucker, R., Heroven, A.K., Becker, J., Dersch, P., and Wittmann, C. (2014). The pyruvate-tricarboxylic acid cycle node: a focal point of virulence control in the enteric pathogen *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Biol Chem* 289, 30114-30132.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39, 664-678.
- Bustamante, V.H., Villalba, M.I., Garcia-Angulo, V.A., Vazquez, A., Martinez, L.C., Jimenez, R., and Puente, J.L. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82, 398-415.

- Cajka, T., and Fiehn, O. (2014). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Analyt Chem* *61*, 192-206.
- Chaleckis, R., Meister, I., Zhang, P., and Wheelock, C.E. (2018). Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* *55*, 44-50.
- Carballes, F., Bertrand, C., Bouche, J.P., and Cam, K. (1999). Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system rcsC-rscB. *Mol Microbiol* *34*, 442-450.
- Chang, A.C., and Cohen, S.N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* *134*, 1141-1156.
- Chong, Y., Shimoda, S., and Shimono, N. (2018). Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol* *61*, 185-188.
- Clark, D.P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* *5*, 223-234.
- Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* *16*, 365-378.
- Cleary, J., Lai, L.C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., and Knutton, S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* *150*, 527-538.
- Connolly, J.P., Finlay, B.B., and Roe, A.J. (2015). From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* *6*, 568.
- Cui, L., Lu, H., and Lee, Y.H. (2018). Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases. *Mass Spectrom Rev*.
- Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* *182*, 3593-3596.
- Darby, C., Hsu, J.W., Ghori, N., and Falkow, S. (2002). *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* *417*, 243-244.
- 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*, 6640-6645.
- de Koning, W., and van Dam, K. (1992). A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem* *204*, 118-123.

- Defraigne, V., Fauvart, M., and Michiels, J. (2018). Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat* 38, 12-26.
- Dehio, C., and Meyer, M. (1997). Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 538-540.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., *et al.* (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3597-3602.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., and Hammock, B.D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 26, 51-78.
- Dische, Z., and Shettles, L.B. (1951). A new spectrophotometric test for the detection of methylpentose. *J Biol Chem* 192, 579-582.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Suzuki, K., Jones, A.D., Pandit, P., Romeo, T., and Babitzke, P. (2003). CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript. *J Bacteriol* 185, 4450-4460.
- Duss, O., Michel, E., Diarra dit Konte, N., Schubert, M., and Allain, F.H. (2014). Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res* 42, 5332-5346.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68, 6115-6126.
- Faleev, N.G., Ruvinov, S.B., Demidkina, T.V., Myagkikh, I.V., Gololobov, M., Bakhmutov, V.I., and Belikov, V.M. (1988). Tyrosine phenol-lyase from *Citrobacter intermedius*. Factors controlling substrate specificity. *Eur J Biochem* 177, 395-401.
- Ferdous, M., Kooistra-Smid, A.M., Zhou, K., Rossen, J.W., and Friedrich, A.W. (2016). Virulence, Antimicrobial Resistance Properties and Phylogenetic Background of Non-H7 Enteropathogenic *Escherichia coli* O157. *Front Microbiol* 7, 1540.
- Ferrieres, L., Aslam, S.N., Cooper, R.M., and Clarke, D.J. (2007). The *yjbEFGH* locus in *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production. *Microbiology* 153, 1070-1080.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48, 155-171.

- Forsbach-Birk, V., McNealy, T., Shi, C., Lynch, D., and Marre, R. (2004). Reduced expression of the global regulator protein CsrA in *Legionella pneumophila* affects virulence-associated regulators and growth in *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Med Microbiol* 294, 15-25.
- Franceschi, P., Mylonas, R., Shahaf, N., Scholz, M., Arapitsas, P., Masuero, D., Weingart, G., Carlin, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F., *et al.* (2014). MetaDB a Data Processing Workflow in Untargeted MS-Based Metabolomics Experiments. *Front Bioeng Biotechnol* 2, 72.
- Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., and Feng, P. (2016). Advances in Molecular Serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 7, 644.
- Furniss, R.C.D., and Clements, A. (2018). Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement in Attaching and Effacing Pathogens. *J Bacteriol* 200.
- Gaytan, M.O., Martinez-Santos, V.I., Soto, E., and Gonzalez-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 129.
- Ghosh, P. (2004). Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 771-795.
- Goodwin, S., McPherson, J.D., and McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17, 333-351.
- Gordon, D.M., and Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* 149, 3575-3586.
- Gore, A.L., and Payne, S.M. (2010). CsrA and Cra influence *Shigella flexneri* pathogenesis. *Infect Immun* 78, 4674-4682.
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 6017-6027.
- Guell, M., Yus, E., Lluch-Senar, M., and Serrano, L. (2011). Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA hori-ome? *Nat Rev Microbiol* 9, 658-669.
- Guo, A.C., Jewison, T., Wilson, M., Liu, Y., Knox, C., Djoumbou, Y., Lo, P., Mandal, R., Krishnamurthy, R., and Wishart, D.S. (2013). ECMDB: the *E. coli* Metabolome Database. *Nucleic Acids Res* 41, D625-630.
- Gutierrez, P., Li, Y., Osborne, M.J., Pomerantseva, E., Liu, Q., and Gehring, K. (2005). Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 3496-3501.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2, 95-108.
- Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., and Bino, R. (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell* 14, 1437-1440.
- Hall, R.D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol* 169, 453-468.
- Hanna, A., Berg, M., Stout, V., and Razatos, A. (2003). Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69, 4474-4481.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., Camara, M., and Williams, P. (2006). Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Bacteriol* 355, 1026-1036.
- Hering, N.A., Fromm, A., Kikhney, J., Lee, I.F., Moter, A., Schulzke, J.D., and Bucker, R. (2016). *Yersinia enterocolitica* Affects Intestinal Barrier Function in the Colon. *J Infect Dis* 213, 1157-1162.
- Heroven, A.K., Bohme, K., and Dersch, P. (2012). The Csr/Rsm system of *Yersinia* and related pathogens: a post-transcriptional strategy for managing virulence. *RNA Biol* 9, 379-391.
- Heroven, A.K., Bohme, K., Rohde, M., and Dersch, P. (2008). A Csr-type regulatory system, including small non-coding RNAs, regulates the global virulence regulator RovA of *Yersinia pseudotuberculosis* through RovM. *Mol Microbiol* 68, 1179-1195.
- Herren, C.D., Mitra, A., Palaniyandi, S.K., Coleman, A., Elankumaran, S., and Mukhopadhyay, S. (2006). The BarA-UvrY two-component system regulates virulence in avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80:H9. *Infect Immun* 74, 4900-4909.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172, 6557-6567.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., and Phillips, A.D. (1998). Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 66, 1570-1578.
- Hiller, K., Hangebrauk, J., Jager, C., Spura, J., Schreiber, K., and Schomburg, D. (2009). MetaboliteDetector: comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis. *Anal Chem* 81, 3429-3439.
- Hobson, N., Price, N.L., Ward, J.D., and Raivio, T.L. (2008). Generation of a restriction minus enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 strain that is efficiently transformed with large, low copy plasmids. *BMC Microbiol* 8, 134.

- Hrdlickova, R., Toloue, M., and Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8.
- Ibarra, J.A., Villalba, M.I., and Puente, J.L. (2003). Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 2835-2847.
- Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., *et al.* (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 191, 347-354.
- Issaq, H.J., Abbott, E., and Veenstra, T.D. (2008). Utility of separation science in metabolomic studies. *J Sep Sci* 31, 1936-1947.
- Ivanisevic, J., Zhu, Z.J., Plate, L., Tautenhahn, R., Chen, S., O'Brien, P.J., Johnson, C.H., Marletta, M.A., Patti, G.J., and Siuzdak, G. (2013). Toward 'omic scale metabolite profiling: a dual separation-mass spectrometry approach for coverage of lipid and central carbon metabolism. *Anal Chem* 85, 6876-6884.
- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., and Romeo, T. (2002). Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 290-301.
- Jang, J., Hur, H.G., Sadowsky, M.J., Byappanahalli, M.N., Yan, T., and Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol* 123, 570-581.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7839-7843.
- Jojima, T., Omumasaba, C.A., Inui, M., and Yukawa, H. (2010). Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 471-480.
- Jones, S.A., Gibson, T., Maltby, R.C., Chowdhury, F.Z., Stewart, V., Cohen, P.S., and Conway, T. (2011). Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun* 79, 4218-4226.
- Kailasan Vanaja, S., Bergholz, T.M., and Whittam, T.S. (2009). Characterization of the *Escherichia coli* O157:H7 Sakai GadE regulon. *J Bacteriol* 191, 1868-1877.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 45, D353-D361.
- Kaper, J.B. (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 295, 355-356.

- Karlinsey, J.E., Maguire, M.E., Becker, L.A., Crouch, M.L., and Fang, F.C. (2010). The phage shock protein PspA facilitates divalent metal transport and is required for virulence of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Mol Microbiol* 78, 669-685.
- Kell, D.B. (2004). Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 7, 296-307.
- Kell, D.B. (2006). Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development. *Drug Discov Today* 11, 1085-1092.
- Kell, D.B., Brown, M., Davey, H.M., Dunn, W.B., Spasic, I., and Oliver, S.G. (2005). Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. *Nat Rev Microbiol* 3, 557-565.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 65, 2606-2612.
- Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourti, J., and Richarme, G. (2007). *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol* 189, 603-610.
- Kim, S.J., Kim, S.H., Kim, J.H., Hwang, S., and Yoo, H.J. (2016). Understanding Metabolomics in Biomedical Research. *Endocrinol Metab (Seoul)* 31, 7-16.
- Kind, T., and Fiehn, O. (2006). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* 7, 234.
- Kroger, C., Dillon, S.C., Cameron, A.D., Papenfort, K., Sivasankaran, S.K., Hokamp, K., Chao, Y., Sittka, A., Hebrard, M., Handler, K., *et al.* (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1277-1286.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357-359.
- Lawhon, S.D., Frye, J.G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., and Altier, C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 48, 1633-1645.
- LeGrand, K., Petersen, S., Zheng, Y., Liu, K.K., Ozturk, G., Chen, J.Y., and Young, G.M. (2015). CsrA impacts survival of *Yersinia enterocolitica* by affecting a myriad of physiological activities. *BMC Microbiol* 15, 31.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078-2079.

- Li, D.X., Gan, L., Bronja, A., and Schmitz, O.J. (2015). Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): review. *Anal Chim Acta* 891, 43-61.
- Liang, W.J., Liu, H.Y., Duan, G.C., Zhao, Y.X., Chen, S.Y., Yang, H.Y., and Xi, Y.L. (2018). Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. *J Infect Public Health* 11, 347-351.
- Lin-Chao, S., Chen, W.T., and Wong, T.T. (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol* 6, 3385-3393.
- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6, 137-149.
- Liu, M.Y., Yang, H., and Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol* 177, 2663-2672.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 13, e1005457.
- Ma, J., An, C., Jiang, F., Yao, H., Logue, C., Nolan, L.K., and Li, G. (2018). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Increase Extracellular Polysaccharide Biosynthesis for Serum Resistance in Response to Bloodstream Signals. *Mol Microbiol*.
- Mahieu, N.G., and Patti, G.J. (2017). Systems-Level Annotation of a Metabolomics Data Set Reduces 25000 Features to Fewer than 1000 Unique Metabolites. *Analytical chemistry* 89, 10397-10406.
- Majdalani, N., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 93-113.
- Mao, Y., Doyle, M.P., and Chen, J. (2006). Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol* 42, 642-647.
- Mardinoglu, A., Bjornson, E., Zhang, C., Klevstig, M., Soderlund, S., Stahlman, M., Adiels, M., Hakkarainen, A., Lundbom, N., Kilicarslan, M., *et al.* (2017). Personal model-assisted identification of NAD(+) and glutathione metabolism as intervention target in NAFLD. *Mol Syst Biol* 13, 916.
- Martinez-Chavarria, L.C., and Vadyvaloo, V. (2015). *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* infection: a regulatory RNA perspective. *Front Microbiol* 6, 956.
- Mashego, M.R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., and Heijnen, J.J. (2007a). Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett* 29, 1-16.

- Mashego, M.R., van Gulik, W.M., and Heijnen, J.J. (2007b). Metabolome dynamic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to simultaneous rapid perturbations in external electron acceptor and electron donor. *FEMS Yeast Res* 7, 48-66.
- Maurer, C.K., Fruth, M., Empting, M., Avrutina, O., Hossmann, J., Nadmid, S., Gorges, J., Herrmann, J., Kazmaier, U., Dersch, P., *et al.* (2016). Discovery of the first small-molecule CsrA-RNA interaction inhibitors using biophysical screening technologies. *Future Med Chem* 8, 931-947.
- McKee, A.E., Rutherford, B.J., Chivian, D.C., Baidoo, E.K., Juminaga, D., Kuo, D., Benke, P.I., Dietrich, J.A., Ma, S.M., Arkin, A.P., *et al.* (2012). Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 11, 79.
- Mellies, J.L., Barron, A.M., and Carmona, A.M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* 75, 4199-4210.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33, 296-306.
- Mendrygal, K.E., and Gonzalez, J.E. (2000). Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 182, 599-606.
- Mercante, J., Edwards, A.N., Dubey, A.K., Babitzke, P., and Romeo, T. (2009). Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* 392, 511-528.
- Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2006). Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *J Biol Chem* 281, 31832-31842.
- Miajlovic, H., Cooke, N.M., Moran, G.P., Rogers, T.R., and Smith, S.G. (2014). Response of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* to human serum reveals a protective role for Rcs-regulated exopolysaccharide colanic acid. *Infect Immun* 82, 298-305.
- Mika, F., and Hengge, R. (2013). Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int J Mol Sci* 14, 4560-4579.
- Miller, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Morein, S., Andersson, A., Rilfors, L., and Lindblom, G. (1996). Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a "window" between gel and non-lamellar structures. *J Biol Chem* 271, 6801-6809.

- Morin, M., Ropers, D., Letisse, F., Laguerre, S., Portais, J.C., Coccagn-Bousquet, M., and Enjalbert, B. (2016). The post-transcriptional regulatory system CSR controls the balance of metabolic pools in upper glycolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 100, 686-700.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Navasa, N., Rodriguez-Aparicio, L., Ferrero, M.A., Monteagudo-Mera, A., and Martinez-Blanco, H. (2013). Polysialic and colanic acids metabolism in *Escherichia coli* K92 is regulated by RcsA and RcsB. *Biosci Rep* 33.
- Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., *et al.* (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9, 311-326.
- Nicholson, J.K., and Lindon, J.C. (2008). Systems biology: Metabonomics. *Nature* 455, 1054-1056.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E. (1999). 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181-1189.
- Nwodo, U.U., Green, E., and Okoh, A.I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int J Mol Sci* 13, 14002-14015.
- Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V., and Lange, C.M. (2007). Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 1721-1728.
- Palaniyandi, S., Mitra, A., Herren, C.D., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Zhu, X., and Mukhopadhyay, S. (2012). BarA-UvrY two-component system regulates virulence of uropathogenic *E. coli* CFT073. *PLoS One* 7, e31348.
- Pando, J.M., Karlinsey, J.E., Lara, J.C., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2017). The Rcs-Regulated Colanic Acid Capsule Maintains Membrane Potential in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio* 8.
- Passariello, C., Forleo, C., Micheli, V., Schippa, S., Leone, R., Mangani, S., Thaller, M.C., and Rossolini, G.M. (2006). Biochemical characterization of the class B acid phosphatase (AphA) of *Escherichia coli* MG1655. *Biochim Biophys Acta* 1764, 13-19.
- Patel, D.J., Kozlowski, S.A., Ikuta, S., and Itakura, K. (1984). Deoxyadenosine-deoxycytidine pairing in the d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-A-C-G) duplex: conformation and dynamics at and adjacent to the dA X dC mismatch site. *Biochemistry* 23, 3218-3226.

- Picozzi, S.C., Casellato, S., Rossini, M., Paola, G., Tejada, M., Costa, E., and Carmignani, L. (2014). Extended-spectrum beta-lactamase-positive *Escherichia coli* causing complicated upper urinary tract infection: Urologist should act in time. *Urol Ann* 6, 107-112.
- Platenkamp, A., and Mellies, J.L. (2018). Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 9, 1694.
- Platt, R., Drescher, C., Park, S.K., and Phillips, G.J. (2000). Genetic system for reversible integration of DNA constructs and lacZ gene fusions into the *Escherichia coli* chromosome. *Plasmid* 43, 12-23.
- Potts, A.H., Vakulskas, C.A., Pannuri, A., Yakhnin, H., Babitzke, P., and Romeo, T. (2017). Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. *Nat Commun* 8, 1596.
- Quehenberger, O., Armando, A.M., and Dennis, E.A. (2011). High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1811, 648-656.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., and Swerdlow, D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 11, 603-609.
- Revelles, O., Millard, P., Nougayrede, J.P., Dobrindt, U., Oswald, E., Letisse, F., and Portais, J.C. (2013). The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *PLoS One* 8, e66386.
- Righetti, P.G., Camprostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M., and Astner, H. (2004). Quantitative proteomics: a review of different methodologies. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 10, 335-348.
- Rochfort, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J Nat Prod* 68, 1813-1820.
- Rojas-Lopez, M., Monterio, R., Pizza, M., Desvaux, M., and Rosini, R. (2018). Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. *Front Microbiol* 9, 440.
- Romeo, T., and Gong, M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* 175, 5740-5741.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175, 4744-4755.

- Romeo, T., Vakulskas, C.A., and Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ Microbiol* 15, 313-324.
- Rothbaum, R., McAdams, A.J., Giannella, R., and Partin, J.C. (1982). A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology* 83, 441-454.
- Rothbaum, R.J., Partin, J.C., Saalfield, K., and McAdams, A.J. (1983). An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in human infants. *Ultrastruct Pathol* 4, 291-304.
- Rubert, J., Righetti, L., Stranska-Zachariasova, M., Dzuman, Z., Chrpova, J., Dall'Asta, C., and Hajslova, J. (2017). Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins. *Food Chem* 224, 423-431.
- Ruiz-Matute, A.I., Hernandez-Hernandez, O., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M.L., and Martinez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 1226-1240.
- Rutherford, S.T., and Bassler, B.L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Ruttkies, C., Schymanski, E.L., Wolf, S., Hollender, J., and Neumann, S. (2016). MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J Cheminform* 8, 3.
- Sabnis, N.A., Yang, H., and Romeo, T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* 270, 29096-29104.
- Sahr, T., Rusniok, C., Impens, F., Oliva, G., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., and Buchrieser, C. (2017). The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system. *PLoS Genet* 13, e1006629.
- Salek, R.M., Steinbeck, C., Viant, M.R., Goodacre, R., and Dunn, W.B. (2013). The role of reporting standards for metabolite annotation and identification in metabolomic studies. *Gigascience* 2, 13.
- Sambrook, J., Russell, D.W., and Sambrook, J. (2006). The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarkisova, S., Patrauchan, M.A., Berglund, D., Nivens, D.E., and Franklin, M.J. (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187, 4327-4337.
- Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B.S., van Ommen, B., Pujos-Guillot, E., Verheij, E., Wishart, D., and Wopereis, S. (2009). Mass-

spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5, 435-458.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16-22.

Schirle, M., Bantscheff, M., and Kuster, B. (2012). Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery. *Chem Biol* 19, 72-84.

Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F.C., Jelesarov, I., Haas, D., and Allain, F.H. (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* 14, 807-813.

Seo, S.W., Kim, D., Latif, H., O'Brien, E.J., Szubin, R., and Palsson, B.O. (2014). Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. *Nat Commun* 5, 4910.

Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2011). Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One* 6, e20081.

Smith, C.A., O'Maille, G., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2005). METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit* 27, 747-751.

Snider, T.A., Fabich, A.J., Conway, T., and Clinkenbeard, K.D. (2009). *E. coli* O157:H7 catabolism of intestinal mucin-derived carbohydrates and colonization. *Vet Microbiol* 136, 150-154.

Sorek, R., and Cossart, P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet* 11, 9-16.

Straczynski, G., and Ligor, T. (2018). Comprehensive Gas Chromatography: Food and Metabolomics Applications. *Crit Rev Anal Chem* 48, 176-185.

Su, Q., Guan, T., He, Y., and Lv, H. (2016). Siderophore Biosynthesis Governs the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* by Coordinately Modulating the Differential Metabolism. *J Proteome Res* 15, 1323-1332.

Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R., and Romeo, T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev* 20, 2605-2617.

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 5130-5140.

Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W., and Kalman, D. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* 15, 3520-3529.

- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 715-720.
- Tatarko, M., and Romeo, T. (2001). Disruption of a global regulatory gene to enhance central carbon flux into phenylalanine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 43, 26-32.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 8, 207-217.
- Thaller, M.C., Schippa, S., Bonci, A., Cresti, S., and Rossolini, G.M. (1997). Identification of the gene (*aphA*) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. *FEMS Microbiol Lett* 146, 191-198.
- Timmermans, J., and Van Melderen, L. (2009). Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191, 1722-1724.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Triebel, A., Trotsmuller, M., Hartler, J., Stojakovic, T., and Kofeler, H.C. (2017). Lipidomics by ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and its application to complex biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1053, 72-80.
- Uliczka, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T., and Dersch, P. (2011). Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors. *PloS one* 6, e20425.
- Uden, G., and Bongaerts, J. (1997). Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta* 1320, 217-234.
- Vakulskas, C.A., Potts, A.H., Babitzke, P., Ahmer, B.M., and Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 193-224.
- Valentine, R.C., Shapiro, B.M., and Stadtman, E.R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 7, 2143-2152.
- Vila, J., Saez-Lopez, E., Johnson, J.R., Romling, U., Dobrindt, U., Canton, R., Giske, C.G., Naas, T., Carattoli, A., Martinez-Medina, M., *et al.* (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 40, 437-463.
- Vogel, J. (2009). A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* 71, 1-11.

- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M., and Harshey, R.M. (2007). The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* 189, 8447-8457.
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P., and Romeo, T. (2005). CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 56, 1648-1663.
- Wang, X., Preston, J.F., 3rd, and Romeo, T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* 186, 2724-2734.
- Weckwerth, W. (2003). Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol* 54, 669-689.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Pruss, B.M., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40, 245-256.
- Weibel, K.E., Mor, J.R., and Fiechter, A. (1974). Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal Biochem* 58, 208-216.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48, 657-670.
- Winder, C.L., Dunn, W.B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G.M., and Goodacre, R. (2008). Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem* 80, 2939-2948.
- Wolf, S., Schmidt, S., Muller-Hannemann, M., and Neumann, S. (2010). In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11, 148.
- Xiao, J.F., Zhou, B., and Ressom, H.W. (2012). Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Analyt Chem* 32, 1-14.
- Yakandawala, N., Romeo, T., Friesen, A.D., and Madhyastha, S. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance phenylalanine production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 283-291.
- Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2013). CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol* 87, 851-866.

Yakhnin, H., Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by Esigma(7)(0) and Esigma(S), and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol Microbiol* 81, 689-704.

Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G.J., and Siuzdak, G. (2011). Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* 83, 2152-2161.

Yanofsky, C., Horn, V., and Gollnick, P. (1991). Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 6009-6017.

Zhang, W., Li, F., and Nie, L. (2010). Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology* 156, 287-301.

Zhao, X., Gang, X., Liu, Y., Sun, C., Han, Q., and Wang, G. (2016). Using Metabolomic Profiles as Biomarkers for Insulin Resistance in Childhood Obesity: A Systematic Review. *J Diabetes Res* 2016, 8160545.

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen (Im Review Prozess)

Berndt V., Volk M., Beckstette M., Dersch P., Brönstrup M. () Metabolome and transcriptome-wide effects of the carbon storage regulator A in enteropathogenic *Escherichia coli*. Scientific Reports ()

Posterbeiträge

Berndt V., Dersch P., Brönstrup M.: CsrA-mediated modulation of bacterial metabolism and its effect on pathogenicity, (Poster).
32nd Annual Meeting of NSCMID, Umea (2015)

Berndt V., Beckstette M., Dersch P., Brönstrup M: CsrA-mediated modulation of bacterial metabolism and its effect on pathogenicity (Poster).
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Wolfsburg (2018)

Anhang

I.	Transkriptom WT/KO Cut Off log+/-2	168
II.	Transkriptom WT/OE Cutoff log2 +/-2	174
III.	159 Metabolite (GC-MS/Lc-MS)	179
IV.	HPLC Polar Negative Mode	186
V.	GC Polar	195
VI.	FAME GC	200
VII.	HPLC Lipidome negative	201
VIII.	HPLC Lipidome Positive	203
IX.	Sequenzierung Read Mapping Statistik	205
X.	Chromatogramme	206
XI.	Spektren Identified features:	211
XII.	GC PCA Plot Polare Samples	252
XIII.	PCA Polare Extraktion Positive und Negative Modus	253
XIV.	Transkriptome PCA Plot (Michael Beckstette)	254
XV.	PCA Unpolare Extraktion Positive und Negative Modus	255
XVI.	Zellgröße des Wildtyps und der CsrA Mutante	256
XVII.	Wachstumskurven in MOPS und M9 Medium	258

I. Transkriptom KO/WT Cut Off log \pm 2

Gene ID	Gene Symbol	Definition	log2 FoldChange	Pvalue	Adjusted P-value
E2348C_ncR_67			-4.26	5.55E-77	7.60E-75
E2348C_1619	<i>gadC</i>	glutamate: gamma-aminobutyric acid antiporter	-4.09	8.34E-65	1.02E-62
E2348C_1620	<i>gadB</i>	glutamate decarboxylase	-4.00	1.12E-48	9.33E-47
E2348C_3752	<i>hdeA</i>	acid-resistance protein	-3.84	2.21E-41	1.49E-39
E2348C_3753	<i>hdeD</i>	acid-resistance membrane protein	-3.80	6.36E-46	4.95E-44
E2348C_3751	<i>hdeB</i>	acid-resistance protein	-3.72	8.55E-44	6.44E-42
E2348C_ncR_45			-3.54	5.88E-42	4.02E-40
E2348C_3728	<i>yhiM</i>	hypothetical protein	-3.40	4.79E-68	6.02E-66
E2348C_3759	<i>gadA</i>	glutamate decarboxylase	-3.21	2.11E-26	6.93E-25
E2348C_4578	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase subunit I	-3.13	2.36E-72	3.04E-70
E2348C_3743	<i>chuA</i>	outer membrane heme/hemoglobin receptor	-3.02	2.76E-82	4.02E-80
E2348C_3750	<i>yhiD</i>	Mg(2+) transport ATPase	-2.97	4.44E-47	3.58E-45
E2348C_2959	<i>csrA</i>	carbon storage regulator	-2.95	9.39E-90	1.57E-87
E2348C_1284	<i>yngC</i>	hypothetical protein	-2.80	4.60E-38	2.81E-36
E2348C_2856	<i>yfiD</i>	autonomous glycyl radical cofactor GrcA	-2.74	9.38E-19	1.98E-17
E2348C_0272	<i>ykgH</i>		-2.73	2.19E-40	1.44E-38
E2348C_3742	<i>chuS</i>	heme/hemoglobin transport protein	-2.72	7.47E-61	8.89E-59
E2348C_1348	<i>narG</i>	nitrate reductase 1 subunit alpha	-2.69	1.55E-09	1.42E-08
E2348C_2478	<i>yfcV</i>	fimbrial-protein like protein	-2.50	3.75E-35	2.07E-33
E2348C_4667	<i>yjjZ</i>	hypothetical protein	-2.47	1.03E-36	6.14E-35
E2348C_2926	<i>gabP</i>	gamma-aminobutyrate transporter	-2.42	2.28E-30	9.90E-29
E2348C_0281	<i>yahE</i>	hypothetical protein	-2.42	2.04E-16	3.59E-15
E2348C_0271		hypothetical protein	-2.40	5.89E-12	7.13E-11

E2348C_3670	<i>glpD</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-2.31	4.09E-31	1.94E-29
E2348C_3756	<i>mdtF</i>	multidrug transporter, RpoS-dependent	-2.24	6.24E-32	3.03E-30
E2348C_1680	<i>ynfM</i>	transporter	-2.24	9.63E-35	5.18E-33
E2348C_3755	<i>mdtE</i>	multidrug efflux system protein MdtE	-2.23	2.02E-21	5.13E-20
E2348C_0497	<i>entB</i>	isochorismatase	-2.21	6.08E-31	2.86E-29
E2348C_2944	<i>proX</i>	glycine betaine transporter periplasmic subunit	-2.14	4.81E-36	2.83E-34
E2348C_0498	<i>entA</i>	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase	-2.12	7.32E-27	2.49E-25
E2348C_2584	<i>mntH</i>	manganese transport protein MntH	-2.11	1.63E-42	1.19E-40
E2348C_3754	<i>gadE</i>	DNA-binding transcriptional activator	-2.09	8.00E-12	9.54E-11
E2348C_1347	<i>narK</i>	nitrate/nitrite transporter	-2.07	2.16E-09	1.93E-08
E2348C_1499	<i>pspD</i>	peripheral inner membrane phage-shock protein	-2.06	3.45E-11	3.91E-10
E2348C_1287	<i>ycgH</i>		-2.02	1.05E-13	1.46E-12
E2348C_2990	<i>hycA</i>	formate hydrogenlyase regulatory protein HycA	-2.02	3.29E-08	2.50E-07
E2348C_2627	<i>eutL</i>	carboxysome structural protein with role in ethanolamine utilization	-2.00	2.93E-10	3.00E-09
E2348C_2917		hypothetical protein	2.03	2.59E-17	4.86E-16
E2348C_0784	<i>yliE</i>	hypothetical protein	2.06	9.06E-30	3.82E-28
E2348C_0913	<i>ycbC</i>	hypothetical protein	2.07	5.66E-56	5.95E-54
E2348C_0956	<i>yccA</i>	hypothetical protein	2.07	1.33E-35	7.62E-34
E2348C_1400		hypothetical protein	2.09	1.46E-12	1.87E-11
E2348C_3967		component of T3SS	2.09	6.31E-06	3.29E-05
E2348C_1919	<i>yeaO</i>	hypothetical protein	2.10	9.46E-20	2.16E-18
E2348C_2113		hypothetical protein	2.11	2.01E-19	4.46E-18
E2348C_4007	<i>yidX</i>	hypothetical protein	2.15	5.85E-34	3.07E-32
E2348C_0338	<i>malZ</i>	maltodextrin glucosidase	2.15	3.69E-41	2.46E-39
E2348C_1214	<i>ymfA</i>	hypothetical protein	2.15	1.76E-27	6.30E-26
E2348C_4323		hypothetical protein	2.18	1.92E-19	4.30E-18
E2348C_0081	<i>leuO</i>	leucine transcriptional activator	2.18	7.60E-26	2.45E-24

E2348C_0799		hypothetical protein	2.21	2.25E-19	4.95E-18
E2348C_3300	<i>yqhH</i>	outer membrane lipoprotein	2.23	2.48E-12	3.12E-11
E2348C_3186		HflC-like, SPFC domain-containing protein	2.24	2.52E-42	1.78E-40
E2348C_2103		hypothetical protein	2.26	2.10E-23	5.99E-22
E2348C_3981	<i>uhpT</i>	sugar phosphate antiporter	2.27	1.54E-18	3.15E-17
E2348C_0855	<i>ybjO</i>	hypothetical protein	2.30	1.82E-30	8.23E-29
E2348C_3964		component of T3SS	2.31	1.50E-16	2.68E-15
E2348C_1968	<i>yobB</i>	hypothetical protein	2.33	1.13E-47	9.31E-46
E2348C_3378	<i>ygiQ</i>	thioredoxin-like protein	2.34	6.65E-51	5.89E-49
E2348C_ncR_03			2.34	4.17E-23	1.16E-21
E2348_P1_020	<i>perA</i>	transcriptional activator of the bfp operon	2.34	3.04E-52	2.80E-50
E2348C_3957	<i>grlA</i>	positive regulator GrlA	2.36	1.60E-20	3.80E-19
E2348C_3814	<i>yiaA</i>	hypothetical protein	2.38	3.79E-25	1.18E-23
E2348C_3962	<i>escS</i>	T3SS structure protein EscS	2.41	8.90E-24	2.60E-22
E2348C_3963	<i>escR</i>	type III secretion system protein	2.43	6.07E-18	1.20E-16
E2348C_0800		hypothetical protein	2.43	3.55E-20	8.26E-19
E2348C_3961	<i>escT</i>	T3SS structure protein EscT	2.45	9.44E-15	1.41E-13
E2348C_0973	<i>cspH</i>	stress protein, member of the CspA-family	2.48	2.29E-18	4.64E-17
E2348C_0347	<i>yajI</i>	hypothetical protein	2.49	3.08E-35	1.74E-33
E2348C_3966		component of T3SS	2.49	8.45E-15	1.27E-13
E2348C_0510	<i>uspG</i>	universal stress protein UP12	2.52	6.12E-50	5.32E-48
E2348C_4349	<i>malE</i>	maltose ABC transporter periplasmic protein	2.53	3.18E-35	1.77E-33
E2348C_2916		T3SS secreted effector EspG-like protein	2.54	1.94E-31	9.34E-30
E2348C_2111		hypothetical protein	2.56	3.64E-24	1.08E-22
E2348C_2112		hypothetical protein	2.57	1.35E-21	3.48E-20
E2348C_0899	<i>ycaP</i>	hypothetical protein	2.57	1.62E-44	1.24E-42
E2348C_2215	<i>yegL</i>	hypothetical protein	2.59	1.85E-57	1.99E-55

E2348C_3960	<i>escU</i>	secretion system apparatus protein SsaU	2.60	1.33E-18	2.75E-17
E2348C_2065	<i>rcaA</i>	DNA-binding transcriptional activator, co-regulator with RcsB	2.61	8.53E-29	3.32E-27
E2348C_3939	<i>eaeA</i>	intimin EaeA	2.62	2.33E-39	1.48E-37
E2348C_3965		component of T3SS	2.63	1.32E-17	2.56E-16
E2348C_3725	<i>yhhJ</i>	transporter subunit: membrane component of ABC superfamily	2.63	3.09E-92	5.37E-90
E2348C_ncR_47			2.67	3.09E-06	1.69E-05
E2348C_0801		repressor protein	2.76	1.35E-24	4.11E-23
E2348C_2023	<i>ftnB</i>	ferritin	2.84	8.24E-83	1.24E-80
E2348C_3948	<i>escN</i>	translocator EscN	2.87	4.00E-35	2.18E-33
E2348C_2792		hypothetical protein	2.92	1.43E-121	3.59E-119
E2348C_3941	<i>tir</i>	translocated intimin receptor Tir	2.94	1.24E-86	1.93E-84
E2348C_0460	<i>ybcI</i>	hypothetical protein	2.99	4.73E-51	4.27E-49
E2348C_1353		dehydrogenase	3.01	8.71E-74	1.16E-71
E2348C_3945	<i>sepQ</i>	T3SS structure protein SepQ	3.05	4.28E-42	2.97E-40
E2348C_4350	<i>malK</i>	maltose/maltodextrin transporter ATP-binding protein	3.07	3.25E-54	3.26E-52
E2348C_4118		hypothetical protein	3.12	1.52E-33	7.70E-32
E2348C_3350	<i>bacA</i>	undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	3.18	2.90E-117	6.24E-115
E2348C_3299	<i>yqhG</i>	hypothetical protein	3.18	8.06E-55	8.28E-53
E2348C_3949	<i>escV</i>	translocator EscV	3.20	3.12E-46	2.48E-44
E2348C_1352		hypothetical protein	3.31	3.06E-106	5.53E-104
E2348C_3946		hypothetical protein	3.32	1.45E-39	9.37E-38
E2348C_3947		hypothetical protein	3.36	2.89E-27	1.02E-25
E2348C_3815	<i>yiaB</i>	hypothetical protein	3.39	1.67E-28	6.38E-27
E2348C_3950	<i>mpc</i>	regulator Mpc	3.52	1.37E-30	6.23E-29
E2348C_3940	<i>cesT</i>	chaperone CesT	3.53	5.66E-81	7.99E-79
E2348C_1442		T3SS secreted effector NleA/EspI-like protein	3.53	2.19E-29	8.98E-28
E2348C_2920		hypothetical protein	3.54	3.39E-111	6.38E-109

E2348C_1354		hypothetical protein	3.54	6.10E-53	5.86E-51
E2348C_1207	<i>ycfT</i>	hypothetical protein	3.57	5.42E-49	4.62E-47
E2348C_3944	<i>espH</i>	LEE-encoded effector EspH	3.61	8.69E-87	1.40E-84
E2348C_4341	<i>yjbE</i>	hypothetical protein	3.74	4.66E-58	5.14E-56
E2348C_1355		coenzyme F390 synthetase	3.83	3.13E-123	8.31E-121
E2348C_3942	<i>map</i>	LEE-encoded effector Map	3.88	8.36E-61	9.68E-59
E2348C_0684		SfpA (systemic factor protein A)-like protein	3.89	1.61E-53	1.59E-51
E2348C_1356		hypothetical protein	3.92	4.43E-58	5.01E-56
E2348C_LEE1			4.12	9.71E-137	3.99E-134
E2348C_2169	<i>ugd</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	4.39	5.35E-145	2.69E-142
E2348C_2193	<i>gmm</i>	GDP-mannose mannosyl hydrolase	4.40	1.11E-16	2.00E-15
E2348C_2185	<i>wcaM</i>	colanic acid biosynthesis protein	4.62	1.21E-199	1.82E-196
E2348C_2189	<i>wcaJ</i>	UDP-glucose lipid carrier transferase	4.94	5.16E-118	1.23E-115
E2348C_2197	<i>wcaE</i>	glycosyl transferase family protein	5.00	2.07E-190	2.34E-187
E2348C_2196	<i>wcaF</i>	colanic acid biosynthesis acetyltransferase WcaF	5.01	1.66E-145	9.40E-143
E2348C_2188	<i>wzxC</i>	colanic acid exporter	5.02	8.58E-138	3.88E-135
E2348C_2192	<i>wcaI</i>	glycosyl transferase family protein	5.07	1.10E-133	3.82E-131
E2348C_2191	<i>cpsB</i>	mannose-1-phosphate guanylyltransferase	5.08	1.57E-184	1.42E-181
E2348C_2186	<i>wcaL</i>	glycosyl transferase family protein	5.09	5.10E-170	3.84E-167
E2348C_2198	<i>wcaD</i>	colanic acid biosynthesis protein	5.19	2.67E-245	1.21E-241
E2348C_2199	<i>wcaC</i>	glycosyl transferase family protein	5.23	8.88E-125	2.68E-122
E2348C_2187	<i>wcaK</i>	pyruvyl transferase	5.26	8.07E-135	3.04E-132
E2348C_2190	<i>cpsG</i>	phosphomannomutase	5.26	8.76E-118	1.98E-115
E2348C_2202	<i>wzc</i>	tyrosine kinase	5.34	1.05E-130	3.38E-128
E2348C_2195	<i>gmd</i>	GDP-D-mannose dehydratase	5.38	5.83E-167	3.76E-164
E2348C_2200	<i>wcaB</i>	colanic acid biosynthesis acetyltransferase WcaB	5.43	1.04E-123	2.93E-121
E2348C_2201	<i>wcaA</i>	glycosyl transferase family protein	5.44	3.40E-235	7.68E-232

E2348C_2203	<i>wzb</i>	tyrosine phosphatase	5.61	6.07E-117	1.25E-114
E2348C_2204	<i>wza</i>	lipoprotein required for capsular polysaccharide translocation through the outer membrane	5.63	2.98E-111	5.85E-109

II. Transkriptom OE/WT Cutoff log2 +/-2

Gene ID	Gene Symbol	Definition	log2 FoldChange	Pvalue	Adjusted P-value
E2348C_0496	<i>entE</i>	enterobactin synthase subunit E	-5.54	6.11E-178	2.71E-174
E2348C_0495	<i>entC</i>	isochorismate synthase 1	-5.17	8.31E-172	1.84E-168
E2348C_0497	<i>entB</i>	isochorismatase	-4.99	1.19E-131	1.31E-128
E2348C_0487	<i>ybdZ</i>	hypothetical protein	-4.62	3.08E-105	1.24E-102
E2348C_1620	<i>gadB</i>	glutamate decarboxylase	-4.54	1.70E-61	3.02E-59
E2348C_0498	<i>entA</i>	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase	-4.47	9.40E-98	2.98E-95
E2348C_3751	<i>hdeB</i>	acid-resistance protein	-4.45	1.06E-61	1.95E-59
E2348C_0488	<i>entF</i>	enterobactin synthase subunit F	-4.41	2.11E-114	1.04E-111
E2348C_3743	<i>chuA</i>	outer membrane heme/hemoglobin receptor	-4.39	1.68E-167	2.49E-164
E2348C_1619	<i>gadC</i>	glutamate: gamma-aminobutyric acid antiporter	-4.38	7.25E-74	1.79E-71
E2348C_4667	<i>yjjZ</i>	hypothetical protein	-4.31	1.04E-104	3.83E-102
E2348C_0485	<i>fepA</i>	outer membrane receptor FepA	-4.20	1.93E-104	6.57E-102
E2348C_3742	<i>chuS</i>	heme/hemoglobin transport protein	-4.10	4.70E-127	3.47E-124
E2348C_3752	<i>hdeA</i>	acid-resistance protein	-4.07	3.49E-46	4.18E-44
E2348C_2301	<i>cirA</i>	colicin I receptor	-3.98	1.42E-128	1.25E-125
E2348C_3753	<i>hdeD</i>	acid-resistance membrane protein	-3.83	2.27E-46	2.79E-44
E2348C_1194	<i>fhuE</i>	ferric-rhodotorulic acid outer membrane transporter	-3.73	3.12E-121	1.97E-118
E2348C_0486	<i>fes</i>	enterobactin/ferric enterobactin esterase	-3.65	2.83E-116	1.57E-113
E2348C_3754	<i>gadE</i>	DNA-binding transcriptional activator	-3.59	5.06E-31	3.35E-29
E2348C_ncR_60			-3.57	6.31E-45	6.99E-43
E2348C_3728	<i>yhiM</i>	hypothetical protein	-3.52	6.15E-71	1.36E-68
E2348C_2938	<i>nrdH</i>	glutaredoxin-like protein	-3.38	1.85E-43	1.91E-41
E2348C_3759	<i>gadA</i>	glutamate decarboxylase	-3.35	4.98E-28	2.79E-26
E2348C_1592	<i>yncE</i>	hypothetical protein	-3.32	1.06E-106	4.69E-104

E2348C_2939	<i>nrdI</i>	ribonucleotide reductase stimulatory protein	-3.32	3.51E-55	5.19E-53
E2348C_1056	<i>ymdF</i>	hypothetical protein	-3.27	1.72E-29	1.06E-27
E2348C_3750	<i>yhiD</i>	Mg(2+) transport ATPase	-3.13	3.06E-51	4.37E-49
E2348C_2940	<i>nrdE</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	-2.99	3.05E-59	5.20E-57
E2348C_3323		ABC-type iron-siderophore transport system ATP-binding protein	-2.96	3.31E-57	5.44E-55
E2348C_2941	<i>nrdF</i>	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-2.94	1.55E-42	1.53E-40
E2348C_3755	<i>mdtE</i>	multidrug efflux system protein MdtE	-2.92	3.31E-34	2.53E-32
E2348C_3292	<i>exbD</i>	biopolymer transport protein ExbD	-2.54	6.51E-71	1.37E-68
E2348C_0494	<i>fepB</i>	iron-enterobactin transporter periplasmic binding protein	-2.53	9.18E-83	2.54E-80
E2348C_4578	<i>argI</i>	ornithine carbamoyltransferase subunit I	-2.53	7.76E-48	1.01E-45
E2348C_0492	<i>fepD</i>	iron-enterobactin transporter membrane protein	-2.46	2.46E-37	2.06E-35
E2348C_0757	<i>fiu</i>	catecholate siderophore receptor Fiu	-2.45	2.79E-39	2.48E-37
E2348C_4666	<i>fhuF</i>	ferric hydroximate transport ferric iron reductase	-2.44	1.83E-33	1.38E-31
E2348C_3756	<i>mdtF</i>	multidrug transporter, RpoS-dependent	-2.42	1.00E-36	8.22E-35
E2348C_0484	<i>entD</i>	phosphopantetheinyltransferase component of enterobactin synthase multienzyme complex	-2.40	3.83E-49	5.15E-47
E2348C_4386	<i>soxS</i>	DNA-binding transcriptional regulator SoxS	-2.31	1.13E-16	4.25E-15
E2348C_3293	<i>exbB</i>	biopolymer transport protein ExbB	-2.28	3.59E-42	3.38E-40
E2348C_0490	<i>fepC</i>	iron-enterobactin transporter ATP-binding protein	-2.27	1.49E-30	9.57E-29
E2348C_3322		permease of ferrichrome ABC transporter	-2.25	1.22E-43	1.29E-41
E2348C_1068	<i>ycdO</i>	hypothetical protein	-2.21	1.21E-44	1.31E-42
E2348C_1067	<i>efeU</i>	high-affinity Fe ²⁺ /Pb ²⁺ permease	-2.16	2.01E-29	1.20E-27
E2348C_1766	<i>sufD</i>	cysteine desulfurase activator complex subunit SufD	-2.12	2.30E-26	1.21E-24
E2348C_0493	<i>entS</i>	enterobactin exporter EntS	-2.04	1.03E-30	6.72E-29
E2348C_1283	<i>yngB</i>	hypothetical protein	-2.03	3.60E-16	1.30E-14
E2348C_ncR_24			2.00	3.93E-15	1.33E-13
E2348C_4388	<i>yjcD</i>	permease	2.03	3.81E-23	1.74E-21

E2348C_0669		hypothetical protein	2.04	3.37E-21	1.46E-19
E2348C_2450	<i>argT</i>	lysine/arginine/ornithine transporter subunit	2.07	2.85E-04	2.25E-03
E2348C_1875	<i>astA</i>	arginine succinyltransferase	2.07	8.37E-04	5.70E-03
E2348C_1450	<i>trpA</i>	tryptophan synthase subunit alpha	2.08	2.71E-04	2.16E-03
E2348C_2920		hypothetical protein	2.10	2.65E-39	2.39E-37
E2348C_3935	<i>espD</i>	translocon EspD	2.12	3.83E-18	1.52E-16
E2348C_3933	<i>cesD2</i>	chaperone CesD2	2.12	2.98E-20	1.26E-18
E2348C_3944	<i>espH</i>	LEE-encoded effector EspH	2.13	2.43E-31	1.63E-29
E2348C_1451	<i>trpB</i>	tryptophan synthase subunit beta	2.16	1.94E-04	1.64E-03
E2348C_1348	<i>narG</i>	nitrate reductase 1 subunit alpha	2.17	1.03E-06	1.49E-05
E2348C_3936	<i>espA</i>	translocon EspA	2.17	4.18E-20	1.75E-18
E2348C_0503	<i>ybdL</i>	aminotransferase	2.18	2.40E-04	1.95E-03
E2348C_1452	<i>trpC</i>	bifunctional indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosylanthranilate isomerase	2.19	2.28E-04	1.87E-03
E2348C_0667		single-stranded DNA-binding protein	2.19	1.86E-08	3.69E-07
E2348C_3958	<i>grlR</i>	negative regulator GrlR	2.19	6.24E-24	2.97E-22
E2348C_1876	<i>astC</i>	bifunctional succinylornithine transaminase/acetylornithine transaminase	2.20	3.87E-04	2.93E-03
E2348C_0502	<i>ybdH</i>	hypothetical protein	2.20	1.85E-04	1.57E-03
E2348C_2452	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	2.21	4.62E-29	2.66E-27
E2348C_0297	<i>lacA</i>	galactoside O-acetyltransferase	2.22	1.35E-26	7.19E-25
E2348C_3957	<i>grlA</i>	positive regulator GrlA	2.22	2.53E-18	1.01E-16
E2348C_1350	<i>narJ</i>	molybdenum-cofactor-assembly chaperone subunit (delta subunit) of nitrate reductase 1	2.23	5.98E-25	2.95E-23
E2348_P1_003	<i>bfpA</i>	major pilin structural unit bundlin	2.24	9.61E-15	3.16E-13
E2348C_4176	<i>glnA</i>	glutamine synthetase	2.25	3.20E-29	1.89E-27
E2348C_1060	<i>rutD</i>	hydrolase	2.26	1.97E-04	1.66E-03
E2348C_3930	<i>espF</i>	LEE-encoded effector EspF	2.29	8.86E-23	3.97E-21
E2348C_2725	<i>purN</i>	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	2.30	4.33E-38	3.69E-36

E2348C_2713	<i>purC</i>	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	2.34	1.79E-35	1.44E-33
E2348C_1059	<i>rutE</i>	hypothetical protein	2.34	1.41E-04	1.24E-03
E2348C_0684		SfpA (systemic factor protein A)-like protein	2.35	1.60E-20	6.87E-19
E2348C_1062	<i>rutB</i>	hypothetical protein	2.36	9.21E-05	8.66E-04
E2348C_1061	<i>rutC</i>	hypothetical protein	2.42	6.91E-05	6.69E-04
E2348C_1349	<i>narH</i>	nitrate reductase 1 subunit, beta (Fe-S)	2.45	9.46E-20	3.88E-18
E2348C_3931		component of T3SS	2.46	1.27E-27	6.96E-26
E2348C_4312	<i>purD</i>	phosphoribosylamine--glycine ligase	2.49	8.00E-33	5.72E-31
E2348C_1063	<i>rutA</i>	monooxygenase	2.52	2.69E-05	2.96E-04
E2348C_3945	<i>sepQ</i>	T3SS structure protein SepQ	2.53	1.44E-29	8.99E-28
E2348C_3932	<i>escF</i>	T3SS structure protein EscF	2.54	2.54E-24	1.22E-22
E2348C_3937	<i>speL</i>	secretion switching protein SpeL	2.55	1.63E-25	8.21E-24
E2348C_0455	<i>purK</i>	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	2.62	3.77E-39	3.27E-37
E2348C_1974	<i>purT</i>	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	2.63	1.19E-31	8.14E-30
E2348C_2453	<i>cvpA</i>	colicin V production protein	2.69	1.72E-42	1.66E-40
E2348C_3939	<i>eaeA</i>	intimin EaeA	2.71	3.89E-42	3.59E-40
E2348C_4313	<i>purH</i>	bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	2.72	1.09E-46	1.38E-44
E2348C_3941	<i>tir</i>	translocated intimin receptor Tir	2.75	6.81E-76	1.78E-73
E2348C_3442	<i>mtr</i>	tryptophan permease	2.82	8.61E-10	2.02E-08
E2348C_2834	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase	2.82	1.23E-55	1.88E-53
E2348C_1453	<i>trpD</i>	bifunctional glutamine amidotransferase/antranilate phosphoribosyltransferase	2.83	4.10E-06	5.29E-05
E2348C_3947		hypothetical protein	2.83	9.38E-20	3.88E-18
E2348C_3948	<i>escN</i>	translocator EscN	2.84	2.03E-34	1.61E-32
E2348C_LEE1			2.89	2.45E-68	4.93E-66
E2348C_2122	<i>nac</i>	nitrogen assimilation transcriptional regulator	2.93	1.81E-06	2.48E-05
E2348C_0386	<i>amtB</i>	ammonium transporter	2.96	1.69E-06	2.35E-05

E2348C_2724	<i>purM</i>	phosphoribosylaminoimidazole synthetase	2.99	2.18E-49	3.02E-47
E2348C_0456	<i>purE</i>	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase	3.00	1.27E-32	8.93E-31
E2348C_3946		hypothetical protein	3.04	2.13E-33	1.55E-31
E2348C_1455	<i>trpL</i>	trp operon leader peptide	3.05	7.90E-07	1.17E-05
E2348C_3949	<i>escV</i>	translocator EscV	3.06	1.15E-42	1.16E-40
E2348C_1742	<i>sodB</i>	superoxide dismutase	3.09	3.09E-45	3.51E-43
E2348C_3950	<i>mpc</i>	regulator Mpc	3.14	1.07E-24	5.22E-23
E2348_P2_09		probable plasmid replication initiation protein	3.19	3.07E-34	2.38E-32
E2348C_3940	<i>cesT</i>	chaperone CesT	3.30	3.52E-71	8.22E-69
E2348C_1454	<i>trpE</i>	anthranilate synthase component I	3.34	5.35E-08	9.49E-07
E2348C_3942	<i>map</i>	LEE-encoded effector Map	3.34	2.20E-45	2.57E-43
E2348C_3918	<i>yicE</i>	transporter	3.47	1.30E-56	2.06E-54
E2348C_0298	<i>lacY</i>	galactoside permease	3.51	6.75E-62	1.30E-59
E2348C_0385	<i>glnK</i>	nitrogen regulatory protein P-II 2	3.65	3.51E-09	7.64E-08
E2348C_0299	<i>lacZ</i>	beta-D-galactosidase	5.47	2.49E-95	7.37E-93

III. 159 Metabolite (GC-MS/LC-MS)

Metabolite die mit der internen CBIO Standardmetaboliten Bibliothek identifiziert wurden sind rot markiert.

Metabolit	Methode	Addukt	fold change (KO:WT) GC-MS	fold change (KO:WT) LC-MS pos. [M+H]	fold change (KO:WT) LC-MS pos. [M+Na]	fold change (KO:WT) LC-MS pos. [M+NH4]	fold change (KO:WT) LC-MS neg. [M-H]
(4-hydroxyphenyl)pyruvate	GC		-2.97				
(R)-2-hydroxyglutarate	GC		-7.56				
1,3-bisphosphoglycerate	GC		-2.26				
1,6-Anhydro-N-acetylmuramate	LC-pos	[M+H], [M+Na]		1.02	1.09		
1D-myo-Inositol	GC		1.15				
1D-myo-inositol 2-phosphate	GC		-9.23				
2,3 Dihydroxybenzoate	LC-neg, GC	[M-H]	-6.22				-3.82
2,3-Dihydroxybenzoylserine	LC-pos	[M+H]	-4.55	-4.55			
2-aminoethyl phosphate	GC		1.01				
2'Deoxyadenosine	GC, LC-pos	[M+H]	13.57	4.63			
2-oxoglutarate	GC		-2.38				
2-phospho-D-glycerate 2-phosphoglycerate	GC						
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoate	LC-neg	[M-H]					-1.19
3-Hydroxymyristic acid	LC-neg	[M-H]					-2.48
3-phosphoglycerate	GC		-1.74				
4- Hydroxybenzoate	LC-neg	[M-H]					1.90
4-Hydroxybenzaldehyde	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		-1.77			-1.53
4-Methyl-2-oxopentanoate	GC		-3.35				
5'Methylthioadenosine	LC-pos			-7.84			
5-Oxo-D/L Proline	LC-pos	[M+H], [M+Na]		-1.11			

Acetyl-Coa	LC-neg	[M-H]					-1.28
Acetyl-Spermidine	LC-pos	[M+H], [M+Na]		1.15	1.23		
adenine	GC		1.01				
adenosine	GC, LC-pos	[M+H], [M+Na], [M-H]	15.73	3.60	4.98		3.60
ADP	LC-pos	[M+H], [M+Na]		-2.18	-2.05		
ADP-Glucose	LC-neg	[M-H]					-1.59
ADP-Sugar	LC-neg	[M-H]					1.88
alpha-D-glucopyranosyl-(1-4)-beta-D-glucopyranose maltose	GC		1.28				
AMP	GC, LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]	-1.10	-8.25			-6.45
Ascorbate	LC-neg	[M-H]					-7.07
Azelaic acid	LC-neg	[M-H]					1.08
cAMP	LC-pos, LC-neg	[M+H]; [M-H]		-13.33			-78.70
Citramalate	LC-neg	[M-H]					-7.75
citrate	GC		-2.80				
Citrate/Isocitrate	LC-neg	[M-H]					-1.68
Coenzyme A	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		1.45			1.22
Cytidine	LC-pos	[M+H]		3.65			
cytosine	GC, LC-pos	[M+H]	-3.52	2.83			
dADP	LC-neg	[M-H]					-4.30
D-cysteine 2-amino-3-mercaptopropanoic acid L-cysteine	GC		-1.25				
D-fructose 1,6-bisphosphate	GC		-4.34				
D-Fructose 1-phosphate	GC		3.69				
D-glycerate glycerate	GC		1.61				

Diacetylspermidine	LC-pos	[M+Na]		2.85		
Dihydrouracil	LC-neg	[M-H]				1.11
dihydroxyacetone phosphate	GC		-2.23			
D-isoleucine DL-isoleucine L-Isoleucine	GC		1.55			
Dissacharide	LC-neg	[M-H]				-2.43
DL-malate (S)-malate (R)-malate	GC		-2.70			
D-ribose 6-phosphate	GC		2.05			
dTDP-Glucose	LC-neg	[M-H]				-9.92
dTDP-Sugar	LC-neg	[M-H]				-8.90
Erythrose-4-phosphate	LC-pos	[M+Na], [M+H]		-3.19	-3.21	
ethanolamine	GC		-1.11			
FAD	LC-neg	[M-H]				-2.74
Flavin mononucleotide	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		-1.57		-1.64
Fructose 1,6 bisphosphate	LC-neg	[M-H]				-2.01
fumarate	GC		-1.84			
GDP-Glucose	LC-neg	[M-H]				3.24
Glucose	LC-pos, LC-neg	[M+Na], [M-H]			1.30	1.15
Glucose-6-Phosphate	LC-neg	[M-H]				-1.18
Glutamate	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		-1.67		1.18
Glutamyl-Leucine	LC-pos	[M+Na]			3.27	
Glutathion ox.	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		-1.68		-1.08
glycerol-3-phosphate	GC		-1.41			
glycine	GC		-1.30			
glycylglycine	GC		21.42			

GMP	GC		1.66			
Guanine	GC, LC-pos	[M+H]	2.46	2.27		
Guanosine	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		5.91		5.33
Homocitrate	LC-pos	[M+NH4]				-1.11
hypoxanthine	GC		33.59			
IMP	GC		-20.00			
Indole-3-carboxaldehyd	LC-neg	[M-H]				-1.87
inosine	GC, LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]	2.53	3.57		3.76
Isomaltulose	LC-pos	[M+Na]			-3.43	
Isopropylmalic acid	LC-neg	[M-H]				-1.16
lactose	GC		1.07			
laminaribiose	GC		-1.72			
Leucine	LC-pos	[M+H]		1.18		
Leucine/Isoleucine	LC-neg	[M-H]				1.08
L-glutamate	GC		-1.30			
L-Methionine	GC		-1.09			
Lumichrome	LC-pos	[M+H], [M+Na]		-1.23	-1.22	
L-valine D-valine	GC	[M+H]	1.65	1.09	-1.35	
LysoPE(12:0)	LC-neg	[M-H]				-1.43
LysoPE(14:0)	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M+Na], [M-H]		-2.55	-2.18	-2.77
LysoPE(14:1)	LC-pos	[M-H], [M+H], [M+Na]		-2.62	-2.38	-2.87
LysoPE(16:0)	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M+Na], [M-H]		-1.49	-1.40	-1.64
LysoPE(16:1)	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M+Na], [M-H]		-1.45	-1.24	-1.33
LysoPE(17:1)	LC-neg	[M-H]				-3.87

LysoPE(18:1)	LC-pos, LC-neg	[M-H], [M+H], [M+Na]		-1.07	1.08		-1.18
LysoPG(14:0)	LC-neg	[M-H]					-3.42
LysoPG(16:1)	LC-neg	[M-H]					-2.69
LysoPG(17:1)	LC-neg	[M-H]					-12.21
LysoPG(18:1)	LC-neg	[M-H]					-2.78
Malate	LC-neg	[M-H]					-2.93
Maltoheptaose	LC-pos	[M+Na]			3.34		
Maltotriose	LC-pos	[M+Na]			2.45		
Methionine	LC-pos	[M+H]		1.24			
N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramic acid	LC-pos	[M-H]					-1.46
N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramyl-tetrapeptide	LC-pos	[M+H]		-1.65			
N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramyl-tripeptide	LC-pos	[M+H]		-2.17			
N-Acetylputrescine	LC-pos	[M+H]		1.10			
NAD	LC-pos	[M+H]		-1.97			
NADP	LC-neg	[M-H]					-1.48
Nicotinamide	GC	[M+H]	1.68				
Nicotinate	LC-pos	[M+H]		9.89			
Nicotinate D-ribonucleoside	LC-neg	[M-H]					-9.38
N-Methyl-Glutamate	LC-pos	[M+H]		-1.13			
O-phospho-L-serine	GC		1.05				
oxalate	GC		1.43				
Oxo-Proline	LC-neg	[M-H]					-1.05
PA(17:1(9Z)/0:0)	LC-pos, LC-neg	[M-H], [M+Na]			-4.03		-2.54
Palmitoleic acid	LC-pos	[M+Na], [M+H]		-2.91	-7.54		
PE(10:0)/(16:1)	LC-neg	[M-H]					-7.50

PE(16:0)/(16:1)	LC-pos	[M+H]		-2.86		
PE(16:0)/17:1)9Z	LC-pos	[M+H]		1.80		
PE(16:1(9Z)/(14:0)	LC-pos	[M+H]		2.30		
PE(16:1)/(18:1)	LC-pos	[M+H]		-3.41		
PE(17:1)9Z	LC-pos	[M+H], [M+Na]		-4.10		
Pentasaccharid	LC-pos	[M+Na], [M+H]		2.82	2.35	
PG(14:0/0:0)	LC-pos	[M+H]		-64.72		
PG(16:0/0:0)	LC-pos	[M+H]		-3.41		
PG(16:1(9Z)/(0:0)	LC-pos	[M+Na], [M+H]		-3.41	-2.54	
Phenylalanine	LC-pos	[M+H], [M+Na]		1.22	1.30	
phenylpyruvate	GC, LC-neg	[M-H]	-3.18			-1.84
phosphoenolpyruvate	GC, LC-neg	[M-H]	-16.96			-2.46
Pipecolate	LC-pos	[M+H]		1.07		
Pro Pro	LC-neg	[M-H]				1.12
Proline	LC-pos	[M+H]		-1.14		
Pterin	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		1.32		1.24
putrescine	GC		1.27			
pyruvate	GC		1.12			
sedoheptulose-7-phosphate	GC		5.66			
Seduheptulose 1,7-Bisphosphat	LC-neg	[M-H]				
shikimate	GC		20.24			
S- Lactoylglutathione	LC-pos	[M+H]		-1.15		
spermidine	GC, LC-pos	[M+H]	-1.36	1.17		
Succinate	LC-neg	[M-H]				-2.03
Tetrasaccharid	LC-pos	[M+Na], [M+H]		2.62	2.25	
Thymidine	LC-neg	[M-H]				1.31
Thymine	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		-1.74		-1.60

TMP	LC-neg	[M-H]					-10.61
Trimetoprim	LC-pos	[M+H]		1.02			
tryptamine	GC		-1.54				
Tryptophan	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		1.09			1.28
Tyrosine	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		1.11			1.13
UDP-Acetylmuramate	LC-neg	[M-H]					-1.66
UDP-Glucose	LC-neg	[M-H]					1.11
UDP-N-Acetylglucosamin	LC-neg	[M-H]					-1.13
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine	LC-neg	[M-H]					-1.43
UMP	GC; LC-neg	[M-H]	-1.32				-5.92
Uracil	LC-neg	[M-H]					-1.24
Uridine	GC, LC-neg	[M-H]	4.98				9.13
Valine	LC-pos	[M+Na], [M+H]		1.09	-1.35		
Xanthine	LC-pos, LC-neg	[M+H], [M-H]		13.92			4.00
Xanthosine	LC-neg	[M-H]					1.78

IV. HPLC Polar Negative Mode

m/z Referenz des Addukts (Metlin)	Δ ppm	mzmed	Rtmed [min]	Metabolit	Addukt	Identifizierung	FC OE:WT	FC KO:WT	FC KO:OE	Pval OE:WT	Pval KO:WT	Pval KO:OE
111.0200	2	111.0197	1.40	Uracil	[M-H]	ST, RT, MS	-1.18	-1.24	-1.05	5.71E-01	8.46E-01	7.51E-01
112.9856	3	112.9852	1.39	Dihydrouracil	[M-H]	ST, RT, MS	1.19	1.11	-1.08	1.05E-02	3.08E-01	8.21E-02
117.0193	3	117.0189	1.93	Succinat	[M-H]	ST, RT, MS	-1.57	-2.03	-1.30	1.15E-01	1.05E-02	3.05E-01
121.0295	1	121.0293	7.42	4-Hydroxybenzaldehyd	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.23	-1.53	-1.88	2.19E-03	1.50E-02	2.12E-05
125.0357	3	125.0352	2.57	Thymine	[M-H]	ST, RT, MS	-2.64	-1.60	1.66	2.91E-07	3.09E-05	3.84E-05
128.0353	2	128.0350	1.76	Oxo-Proline	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.11	-1.05	1.06	2.86E-01	3.74E-01	9.73E-01
130.0874	1	130.0871	2.11	Leucine/Isoleucine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-3.00	1.08	3.24	1.94E-10	7.99E-02	9.09E-09
133.0142	2	133.0139	1.29	Malate	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.58	-2.93	-1.85	6.51E-03	1.99E-07	3.79E-03
135.0312	3	135.0307	1.83	Hypoxanthine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	2.85	2.83	-1.01	3.76E-04	1.65E-04	3.68E-01
137.0244	2	137.0241	6.68	3,4- Hydroxybenzoate	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.03	1.90	1.85	2.45E-01	1.04E-04	7.31E-04
144.0455	1	144.0452	9.11	Indole-3-carboxaldehyd	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.27	-1.87	-2.37	1.86E-02	2.01E-03	2.98E-06
146.0459	1	146.0456	1.16	Glutamat	[M-H]	ST, RT, MS	-1.27	1.18	1.50	9.62E-01	3.41E-01	2.25E-01
147.0299	3	147.0294	1.40	Citramalate	[M-H]	RT, MS	-3.36	-7.75	-2.30	4.44E-07	2.97E-08	6.83E-08
151.0261	4	151.0255	2.05	Xanthine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.53	4.00	2.61	3.73E-02	9.69E-05	1.29E-03
153.0193	3	153.0190	7.16	2,3 Dihydroxybenzoate	[M-H]	ST, RT,MS, MS2	-1.77	-3.82	-2.16	9.96E-04	2.00E-06	2.36E-07
157.0137	1	157.0134	1.39	Ascorbate	[M-H-H2O]	ST, RT, MS	-3.47	-6.35	-1.83	1.02E-03	1.32E-05	1.53E-01
162.0421	2	162.0417	2.39	Pterin	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.27	1.24	1.58	2.38E-01	5.57E-02	5.47E-03
163.0401	2	163.0396	7.30	Phenylpyruvat	[M-H]	ProgenisisQI MS2	1.56	-1.84	-2.87	1.24E-07	9.61E-05	3.19E-13
164.0717	1	164.0714	3.95	Phenylalanine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.90	1.16	2.21	1.10E-06	8.45E-06	2.08E-10
165.0557	1	165.0555	8.11	3-(2-Hydroxyphenyl)propanoate	[M-H]	ST, RT, MS	-1.02	-1.19	-1.17	4.05E-01	1.59E-02	1.50E-03
166.9751	4	166.9743	1.22	Phosphoenolpyruvate	[M-H]	ST, RT, MS	-1.72	-2.46	-1.43	1.52E-02	1.49E-05	2.09E-03
173.0086	0	173.0085	1.38	Citrate	[M-H2O]	ST, RT, MS	-2.91	-1.81	1.61	6.72E-05	1.18E-03	5.24E-03

175.0248	3	175.0242	1.37	Ascorbate	[M-H]	ST, RT, MS	-1.64	-7.07	-4.32	2.18E-01	2.77E-03	2.12E-02
175.0612	2	175.0608	6.54	Isopropylmalic acid	[M-H]	ST, RT, MS	2.03	-1.16	-2.36	1.24E-03	1.65E-01	3.86E-04
179.0561	0	179.0561	1.14	Glucose?	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.03	1.15	1.11	1.04E-02	2.31E-03	6.54E-01
180.0666	2	180.0661	2.10	Tyrosine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.77	1.13	2.01	4.45E-03	3.90E-02	1.61E-04
187.0976	2	187.0972	9.27	Azelaic acid	[M-H]	ST, RT, MS	-1.24	1.08	1.35	9.99E-01	4.51E-01	4.33E-01
192.0270	2	191.0192	1.39	Citrate/Isocitrate	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-2.62	-1.68	1.56	5.93E-05	1.05E-03	3.25E-03
203.0826	1	203.0822	6.16	Tryptophan	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-3.61	1.28	4.60	2.77E-10	4.03E-02	1.61E-06
215.0328	0	215.0329	1.14	Glucose?	[M+Cl]	ST, RT, MS	1.74	1.91	1.10	4.03E-04	4.39E-07	4.47E-01
227.1037	1	227.1034	6.23	Pro Pro	[M-H]	ProgenesisQI MS2	-1.09	1.12	1.23	1.56E-01	4.52E-03	1.03E-01
229.0870	0	229.0869	12.70	Naproxen	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-3.57	1.25	4.47	4.00E-01	6.19E-01	1.40E-01
237.0802	2	237.0796	4.52	IPTG	[M-H]	ST, RT, MS	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	6.35E-13	NA	2.72E-13
241.0830	2	241.0824	5.30	Thymidine	[M-H]	ST, RT, MS	1.50	1.31	-1.15	1.65E-02	9.32E-02	1.29E-01
243.0623	2	243.0617	2.07	Uridine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	8.00	9.13	1.14	9.89E-05	1.23E-06	8.78E-01
243.1966	0	243.1967	16.17	3-Hydroxymyristic acid	[M-H]	MS(MS2)	-2.23	-2.48	-1.11	9.48E-01	2.49E-03	5.13E-02
254.0670	2	254.0667	7.54	Nicotinate D-ribonucleoside	[M-H]	MS, MS2	-2.36	-9.38	-3.98	1.72E-04	2.57E-06	1.19E-08
259.0224	0	259.0222	1.03	Glucose-6-Phosphate	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.08	-1.18	-1.09	6.32E-01	7.22E-01	3.21E-01
259.1083	0	259.1083	6.91	Tyr Pro	[M-H-H2O]	ProgenesisQI MS2	-1.02	1.07	1.09	4.08E-01	8.46E-01	3.68E-01
266.0895	0	266.0887	2.91	Adenosine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	5.48	3.60	-1.52	2.43E-07	1.53E-05	5.74E-03
267.0735	2	267.0727	3.21	Inosine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	4.48	3.76	-1.19	2.80E-04	4.59E-04	9.69E-01
273.0569	3	273.0560	4.51	IPTG	[M+Cl]	ST, RT, MS	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	3.74E-09	NA	1.87E-09
282.0844	2	282.0836	3.28	Guanosine	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	9.74	5.33	-1.83	1.16E-05	1.70E-04	1.81E-03
283.0684	3	283.0675	4.66	Xanthosine	[M-H]	ST, RT, MS	2.70	1.78	-1.52	1.10E-01	1.15E-01	1.11E-01
306.0765	3	306.0756	1.39	Glutathione	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.13	1.34	1.18	5.98E-02	2.16E-02	2.00E-01
321.0493	4	321.0479	2.21	dTMP	[M-H]	ST, RT, MS	-5.70	-10.61	-1.86	7.09E-05	2.82E-05	9.36E-02
323.0286	3	323.0275	1.29	UMP	[M-H]	ST, ST, MS	-2.68	-5.92	-2.21	1.11E-02	4.58E-05	2.92E-02
328.0452	2	328.0444	2.08	cAMP	[M-H]	ST, RT, MS	-3.41	-78.70	-23.08	4.89E-03	2.92E-04	7.12E-03
338.9888	0	338.9888	1.00	Fructose 1,6 biphosphate	[M-H]	RT, MS, MS2	-2.13	-2.01	1.06	7.53E-02	4.38E-02	7.05E-01

341.1089	4	341.1074	1.19	Dissacharid	[M-H]	RT,MS	-5.98	-2.43	2.46	1.63E-05	3.13E-04	1.17E-03
346.0558	3	346.0546	1.39	AMP	[M-H]	ST, RT, MS	-4.37	-6.45	-1.47	7.83E-04	2.74E-05	7.77E-02
368.9993	0	368.9991	1.00	Seduheptulose 1,7-Bisphosphat	[M-H]	ProgenesisQI MS2	-1.43	-2.62	-1.83	4.65E-01	1.77E-05	1.15E-04
377.0856	2	377.0845	1.18	Dissachrid	[M+Cl]	MS, MS2	-4.16	-3.03	1.37	2.29E-07	4.79E-07	3.59E-02
396.2156	1	396.2152	12.96	LysoPE(12:0)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	2.65	-1.43	-3.79	2.08E-08	5.13E-03	7.70E-09
410.0272	3	410.0257	1.39	dADP	[M-H]	ST, RT, MS	-1.67	-4.30	-2.58	1.41E-03	1.64E-06	7.29E-08
421.2361	0	421.2364	17.08	PA(17:1(9Z)/0:0)	[M-H]	MS, MS2	1.86	-2.54	-4.72	1.37E-02	1.38E-02	1.67E-03
422.2313	0	422.2312	13.49	LysoPE(14:1)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	2.25	-2.87	-6.45	3.75E-08	1.64E-05	5.57E-09
424.2469	0	424.2472	14.38	LysoPE(14:0)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	1.95	-2.77	-5.41	2.66E-05	3.56E-06	6.74E-07
444.1711	0	444.1709	12.37	Glipizide	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-2.34	1.12	2.61	2.83E-01	6.93E-01	1.13E-01
450.2626	0	450.2628	14.80	LysoPE(16:1)	[M-H]	MS, MS2	2.42	-1.33	-3.22	7.18E-09	6.45E-02	6.90E-10
452.2782	0	452.2784	15.86	LysoPE(16:0)	[M-H]	MS, MS2	1.76	-1.64	-2.89	2.08E-04	3.61E-02	1.18E-06
455.0973	1	455.0965	7.07	Flavine mononucleotide (FMN)	[M-H]	MS, MS2	-1.23	-1.64	-1.33	7.98E-01	1.24E-03	1.26E-03
455.2415	0	455.2413	14.68	LysoPG(14:0)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	2.09	-3.42	-7.16	4.31E-04	3.70E-05	2.52E-05
464.2783	0	464.2783	15.61	LysoPE(17:1)	[M-H]	MS, MS2	-1.18	-3.87	-3.28	3.48E-01	7.77E-05	6.23E-07
477.1726	3	477.1712	5.51	N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramic acid	[M-H]	MS, MS2	1.06	-1.46	-1.55	7.21E-03	2.55E-01	1.09E-03
478.2939	0	478.2941	16.19	LysoPE(18:1)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	1.56	-1.18	-1.83	2.20E-02	4.83E-01	1.90E-03
480.9820	0	480.9799	1.39	Thymidine 5'-triphosphate	[M-H]	MS	-5.69	-10.93	-1.92	1.16E-06	8.89E-07	1.29E-02
481.2572	0	481.2574	15.52	LysoPG(16:1)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	2.52	-2.12	-5.34	2.78E-05	3.13E-04	2.78E-06
481.2572	0	481.2575	15.20	LysoPG(16:1)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	2.00	-2.84	-5.69	4.31E-04	7.06E-04	2.96E-05
483.2728	0	483.2730	16.91	LysoPG(16:0)	[M-H]	ProgenesisQI MS2	1.71	-2.69	-4.60	1.10E-03	9.69E-05	1.51E-05
495.2728	0	495.2730	16.56	LysoPG(17:1)	[M-H]	MS2	-1.49	-12.21	-8.22	2.47E-01	1.07E-05	1.53E-05
509.2885	1	509.2890	17.38	LysoPG(18:1)	[M-H]	MS, MS2	1.74	-2.78	-4.84	6.35E-03	4.40E-04	6.12E-05
539.1384	3	539.1364	1.21	Trisaccharid	[M+Cl]	MS, MS2	-2.19	2.57	5.63	8.50E-03	1.73E-06	1.73E-07
545.0579	3	545.0561	1.38	dTDP-Sugar	[M-H]	MS	-9.09	-8.90	1.02	3.24E-05	1.84E-05	4.44E-01
558.0644	4	558.0620	1.24	ADP-Sugar	[M-H]	MS, MS2	1.57	1.88	1.20	6.81E-02	5.28E-03	1.58E-01

563.0685	5	563.0669	1.38	dTDP-Glucose	[M-H]	ST, RT, MS	-8.35	-9.92	-1.19	4.07E-05	1.99E-05	7.31E-02
565.0477	3	565.0455	1.22	UDP-Glucose	[M-H]	ST, RT, MS	1.33	1.11	-1.20	1.67E-02	6.15E-01	2.26E-02
588.0750	1	588.0738	1.38	ADP-Glucose	[M-H]	ST, RT, MS	-2.34	-1.59	1.47	9.83E-04	2.50E-02	7.44E-04
604.0699	4	604.0672	1.24	GDP-Glucose	[M-H]	ST, RT, MS	1.73	3.24	1.87	9.69E-03	5.27E-06	6.66E-03
604.2654	0	604.2654	13.60	PE(10:0)/(16:1)	[M-H]	MS, MS2	1.54	-7.50	-11.55	1.48E-05	4.36E-09	1.18E-08
606.0743	4	606.0717	1.20	UDP-N-Acetylglucosamin	[M-H]	ST, RT, MS	-1.18	-1.13	1.05	3.34E-01	9.56E-01	1.87E-01
611.1447	3	611.1427	2.15	Glutathion ox.	[M-H]	MS, MS2. RT	-1.46	-1.08	1.36	7.09E-01	4.03E-01	2.38E-01
678.0954	2	678.0938	1.39	UDP-Acetylmuramate	[M-H]	ProgenesisQI MS2	-1.45	-1.66	-1.14	1.37E-02	1.91E-04	6.77E-03
701.1913	3	701.1888	1.24	Maltotetraose	[M+Cl]	ProgenesisQI MS2	-2.11	2.72	5.72	8.33E-03	8.49E-07	6.26E-08
742.0682	2	742.0660	1.35	NADP	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.06	-1.48	-1.58	3.72E-02	3.66E-02	5.69E-05
766.1079	2	766.1058	5.62	Coenzyme A	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	1.77	1.22	-1.45	6.93E-03	6.37E-02	3.02E-01
784.1499	1	784.1489	6.75	FAD	[M-H]	ST, RT, MS, MS2	-1.35	-2.74	-2.03	2.25E-02	5.49E-11	2.63E-08
808.1185	1	808.1172	6.14	Acetyl-Coa	[M-H]	ProgenesisQI MS2	-1.27	-1.28	-1.01	6.32E-01	2.04E-01	6.54E-01
827.2674	3	827.2647	1.30	Maltopentaose	[M-H]	MS, MS2	-3.07	3.71	11.42	1.57E-01	2.04E-04	4.70E-05
863.2441	1	863.2418	1.29	Maltopentaose	[M+Cl]	ProgenesisQI MS2	-2.11	3.25	6.85	2.52E-01	7.25E-07	2.62E-08
989.3202	1	989.3183	1.35	Maltohexaose	[M-H]	MS. MS2	-2.76	4.44	12.22	4.87E-01	3.34E-05	1.00E-05
1,025.2969	1	1025.2952	1.35	Maltohexose	[M+Cl]	ProgenesisQI MS2	-1.65	3.28	5.40	6.41E-01	4.49E-08	5.15E-10
1,192.3341	0	1192.3345	5.41	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl- D-alanine	[M-H]	MS MS2	1.47	-1.43	-2.11	1.04E-01	9.75E-01	1.17E-01

V. HPLC Polar Positive Mode

m/z Referenz des Addukts (Metlin)	Δppm	mzmed	Rtmed [min]	Metabolit	Addukt	Identifizierung	FC OE:WT	FC KO:WT	FC KO:OE	Pval OE:WT	Pval KO:WT	Pval KO:OE
112.0505	1	112.0507	1.38	Cytosine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	4.22	2.83	-1.49	1.98E-07	2.82E-07	1.96E-04
116.0706	0	116.0707	1.21	Proline	[M+H]	ST, RT, MS	-1.66	-1.14	1.46	8.70E-01	1.82E-01	1.94E-01
118.0863	1	118.0864	1.36	Valine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-2.10	1.09	2.28	9.34E-03	1.23E-10	1.00E-09
123.0441	0	123.0440	7.40	4-Hydroxybenzaldehyde	[M+H]	ST, RT, MS	1.44	-1.77	-2.55	5.10E-02	9.12E-04	7.75E-06
123.0553	0	123.0552	1.74	Nicotinamid	[M+H]	ST, RT, MS,	1.22	1.25	1.03	1.00E-02	9.80E-03	9.00E-01
124.0393	0	124.0394	1.39	Nicotinate	[M+H]	ST, RT MS	5.58	9.89	1.77	3.94E-07	7.05E-04	1.47E-02
127.0502	1	127.0501	2.65	Thymine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-2.70	-1.74	1.55	2.06E-05	2.99E-07	2.73E-04
130.0499	0	130.0499	1.79	5-Oxo-D/L Proline	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.11	-1.11	1.00	7.63E-01	5.31E-01	3.41E-01
130.0863	0	130.0862	1.40	Pipecolate	[M+H]	ST, RT, MS	1.44	1.07	-1.35	7.88E-02	1.04E-05	1.67E-04
131.1179	2	131.1180	1.30	N-Acetylputrescine	[M+H]	ST, Rt, MS, MS2	-5.28	1.10	5.81	2.47E-01	6.83E-03	1.16E-03
132.1019	0	132.1020	2.11	Leucine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-3.39	1.18	3.99	3.06E-01	3.24E-04	4.41E-05
137.0458	0	137.0458	1.86	Hypoxanthine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	2.76	2.88	1.04	7.38E-04	8.36E-04	3.92E-01
137.0458	1	137.0460	1.40	Hypoxanthine	[M+H]	ST, RT, MS	2.05	2.31	1.12	6.73E-05	1.74E-03	7.48E-01
140.0682	0	140.0683	1.17	Valine	[M+Na]	ST, RT, MS	-1.78	-1.35	1.33	3.53E-01	3.08E-01	9.95E-01
146.1652	0	146.1653	1.00	Spermidine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	1.33	1.17	-1.13	2.76E-03	1.32E-05	3.05E-01
147.1128	0	147.1128	1.04	Lysine	[M+H]	RT, MS	1.80	1.41	-1.27	2.61E-04	2.52E-06	3.34E-04
148.0604	0	148.0604	1.20	Glutamat	[M+H]	ST, RT, MS	-1.86	-1.67	1.11	2.59E-01	8.26E-02	5.95E-01
150.0583	1	150.0585	1.40	Methionine	[M+H]	ST, RT, MS	-3.87	1.24	4.82	5.18E-05	4.78E-14	1.61E-12
152.0318	0	152.0317	1.79	5-Oxo-D/L Proline	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	1.18	1.02	-1.16	6.85E-01	8.46E-04	1.60E-04
152.0567	0	152.0568	1.40	Guanin	[M+H]	ST, RT, MS	3.70	2.27	-1.63	7.18E-09	7.89E-07	9.80E-05
153.0407	2	153.0403	2.11	Xanthine	[M+H]	ST, RT, MS	5.96	13.92	2.33	1.50E-04	1.73E-02	2.03E-02
162.0761	0	162.0761	1.35	N-Methyl-Glutamate	[M+H]	ST, Rt, MS	1.05	-1.13	-1.19	6.62E-01	2.14E-02	1.67E-02
164.0567	0	164.0566	2.47	Pterin	[M+H]	ST, Rt, MS, MS2	-1.58	1.32	2.09	9.41E-02	2.80E-02	1.68E-04

166.0863	0	166.0864	4.09	Phenylalanin	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.51	1.22	1.84	2.40E-06	6.96E-06	1.78E-10
182.0812	0	182.0813	2.14	Tyrosine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.53	1.11	1.70	3.35E-03	3.85E-05	3.49E-06
188.0682	0	188.0681	4.09	Phenylalanin	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-1.26	1.30	1.63	1.14E-01	1.89E-02	5.14E-04
188.1757	1	188.1761	1.14	Acetyl-Spermidine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.07	1.15	1.22	4.78E-04	3.61E-02	4.20E-01
195.0877	1	195.0879	7.18	Caffeine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	1.06	-1.10	-1.16	3.19E-01	9.05E-01	1.05E-01
201.0159	0	201.0158	1.25	Erythrose-4-phosphate	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-1.55	-3.19	-2.06	9.02E-06	1.25E-01	5.29E-05
203.0526	1	203.0530	1.17	Glucose	[M+Na]	ST, RT, MS	1.11	1.30	1.17	3.16E-05	4.29E-05	3.70E-01
205.0972	1	205.0974	6.13	Tryptophan	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-2.89	1.09	3.15	5.35E-01	1.27E-09	2.37E-06
210.1577	0	210.1578	1.14	Acetyl-Spermidine	[M+Na]	MS, MS2	1.07	1.23	1.16	1.67E-03	1.70E-02	9.88E-01
215.1390	0	215.1390	6.98	Prolyl-Valine	[M+H]	ProgenesisQi MS2	1.05	1.02	-1.03	9.64E-01	2.48E-02	7.80E-03
219.0265	2	219.0270	1.14	Glucose	[M+K]	ST, RT, MS	1.12	1.16	1.04	4.45E-06	2.53E-06	2.12E-01
219.1339	0	219.1339	5.62	Ser Ile	[M+H]	ProgenesisQi MS2	2.48	1.50	-1.65	1.19E-04	5.39E-06	8.43E-05
222.9978	0	222.9979	1.24	Erythrose-4-phosphate	[M+Na]	ProgenesisQi MS2	-1.15	-3.21	-2.78	3.52E-06	3.10E-01	1.41E-06
224.0781	0	224.0781	1.40	Homocitrat	[M+NH4]	ProgenesisQi MS2	4.13	-1.11	-4.60	1.00E+00	2.15E-05	2.16E-05
231.1016	0	231.1018	12.72	Naproxen	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.23	1.06	1.30	8.38E-01	2.44E-01	1.28E-01
239.0948	1	239.0951	4.72	IPTG	[M+H]	ST, RT, MS	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	NA	4.18E-11	2.59E-11
242.0659	1	242.0662	6.18	2,3-Dihydroxybenzoylserine	[M+H]	MS/MS2	-1.07	-4.55	-4.26	1.31E-08	2.66E-01	4.07E-09
243.0877	0	243.0877	9.25	Lumichrome	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.49	-1.23	1.21	6.38E-01	1.60E-01	2.64E-01
244.0928	2	244.0933	1.38	Cytidine	[M+H]	RT, MS	5.54	3.65	-1.52	7.00E-09	1.66E-07	7.93E-05
252.1091	2	252.1091	3.51	2'Deoxyadenosin	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	3.62	4.63	1.28	8.40E-05	2.91E-04	9.62E-01
253.0835	0	253.0837	12.72	Naproxen	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-1.72	1.02	1.74	8.49E-01	2.45E-01	1.31E-01
255.2319	0	255.2318	19.06	Palmitoleic acid	[M+H]	ST, RT, MS	2.03	-2.91	-5.91	1.98E-01	2.17E-02	3.05E-04
256.1213	1	256.1216	4.72	IPTG	[M+NH4]	ST, RT, MS	286.20	#DIV/0!	#DIV/0!	2.14E-01	1.16E-14	1.97E-13
261.0767	1	261.0771	4.71	IPTG	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	NA	5.25E-12	3.07E-12
261.1445	0	261.1446	6.33	Glu Leu	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-2.71	2.69	7.29	2.54E-05	4.11E-06	2.60E-06
264.1747	1	264.1750	11.26	Nortriptyline	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.25	1.27	1.59	2.56E-01	1.70E-01	9.67E-03
265.0696	0	265.0696	9.25	Lumichrome	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-1.46	-1.22	1.20	5.90E-01	1.10E-01	2.14E-01

268.1040	1	268.1043	3.05	Adenosine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	5.12	3.60	-1.42	5.76E-05	1.88E-07	1.58E-03
269.0575	1	269.0571	12.72	Naproxen	[M+K]	ST, RT, MS, MS2	-1.71	-1.08	1.59	8.51E-01	2.39E-01	1.35E-01
269.0880	0	269.0879	3.36	Inosine	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	3.49	3.57	1.02	1.74E-04	3.40E-04	6.03E-01
276.1078	0	276.1078	4.80	1,6-Anhydro-N-acetylmuramate	[M+H]	MS/MS2	1.26	1.02	-1.23	9.13E-02	6.00E-02	3.42E-01
277.2138	0	277.2137	19.06	Palmitoleic acid	[M+Na]	ST, RT, MS	1.98	-7.54	-14.91	2.20E-01	1.65E-02	2.46E-04
283.1264	0	283.1264	6.35	Glutamyl-Leucine	[M+Na]	ProgenesisQi MS2	-15.36	3.27	50.28	1.22E-07	1.52E-04	2.70E-08
284.0990	0	284.0991	3.43	Guanosin	[M+H]	ST, RT, MS	11.00	5.91	-1.86	3.11E-06	1.45E-05	1.84E-03
290.0860	0	290.0859	3.05	Adenosine	[M+Na]	ST, RT, MS	5.76	4.98	-1.16	9.43E-07	5.32E-10	4.59E-04
291.1452	0	291.1456	7.38	Trimetoprim	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.13	1.02	1.16	6.51E-01	4.65E-02	5.28E-03
295.1288	0	295.1294	6.70	Glu Phe	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-2.71	3.30	8.92	3.03E-06	2.03E-05	5.71E-07
298.0897	0	298.0896	4.80	1,6-Anhydro-N-acetylmuramate	[M+Na]	MS/MS2	1.21	1.09	-1.11	8.46E-02	5.96E-02	2.09E-01
298.0968	0	298.0972	6.35	5'Methylthioadenosin	[M+H]	ST,RT,MS,MS2	-1.92	-7.84	-4.08	9.39E-07	6.36E-02	6.62E-04
308.0911	1	308.0915	1.40	Glutathione	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.16	1.06	1.23	6.88E-02	9.22E-01	2.43E-02
311.1238	1	311.1240	5.47	Glu Tyr	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-2.83	4.96	14.02	1.61E-06	2.65E-05	4.50E-07
330.0598	0	330.0597	2.13	cAMP	[M+H]	ST, RT, MS	-3.00	-13.33	-4.45	1.32E-05	2.99E-04	6.98E-05
348.0704	0	348.0708	1.40	AMP	[M+H]	ST, RT, MS	-8.48	-8.25	1.03	1.02E-05	9.85E-05	9.38E-02
365.1054	0	365.1060	1.19	Isomaltulose	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-3.97	-3.43	1.16	1.86E-11	6.28E-12	6.66E-01
380.1122	0	380.1125	2.86	S-Lactoyl Glutathion	[M+H]	ProgenesisQi MS2	1.07	-1.15	-1.23	8.56E-01	9.20E-01	6.70E-01
391.2843	0	391.2842	21.84	Phthalate	[M+H]	ST, RT, MS/MS2	-1.22	-1.04	1.18	8.44E-01	6.83E-01	9.40E-01
413.2662	0	413.2666	21.84	Phthalate	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-1.19	-1.05	1.13	8.51E-01	9.22E-01	3.18E-01
424.2459	0	424.2462	13.50	LysoPE(14:1)9Z	[M+H]	ProgenesisQi MS2	2.30	-2.62	-6.01	6.45E-04	5.33E-09	1.02E-10
426.2615	1	426.2620	14.39	LysoPE(14:0)	[M+H]	ProgenesisQi MS2	2.36	-2.55	-6.03	3.44E-03	8.93E-07	6.64E-01
428.0367	0	428.0369	1.26	ADP	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-2.96	-2.18	1.36	2.33E-04	1.31E-02	3.59E-11
429.2402	0	429.2401	21.84	Phthalate	[M+K]	ST, RT, MS/MS2	1.03	-1.03	-1.05	7.03E-01	2.94E-02	1.34E-08
445.2326	0	445.2325	17.73	PA(17:1)9Z	[M+Na]	ProgenesisQi MS2	3.33	-4.03	-13.40	4.46E-02	1.90E-02	9.60E-01
446.1857	1	446.1861	12.40	Glipizide	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.19	1.07	1.28	8.23E-01	2.05E-01	1.63E-03

446.2278	0	446.2276	13.50	LysoPE(14:1)9Z	[M+Na]	MS/MS2	2.36	-2.38	-5.61	8.92E-04	8.00E-09	4.58E-03
448.2434	0	448.2437	14.39	LysoPE(14:0)	[M+Na]	MS/MS2	1.51	-2.18	-3.29	1.38E-04	4.31E-07	9.26E-02
450.0186	0	450.0189	1.26	ADP	[M+Na]	ST, RT, MS, MS2	-2.64	-2.05	1.28	2.01E-05	4.05E-02	6.93E-12
452.2772	0	452.2776	14.82	LysoPE(16:1)	[M+H]	ProgenesisQi MS2	2.71	-1.45	-3.92	2.18E-01	1.91E-08	2.23E-12
454.2928	1	454.2933	15.88	LysoPE(16:0)	[M+H]	ProgenesisQi MS2	1.95	-1.49	-2.90	5.61E-01	3.60E-04	4.82E-01
457.1119	0	457.1121	7.06	Flavin mononucleotide	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-1.30	-1.57	-1.21	5.20E-03	8.45E-01	3.21E-10
457.2561	0	457.2560	15.05	PG(14:0/0:0)	[M+H]	MS, MS2	4.02	-64.72	-260.11	4.93E-03	2.87E-06	7.76E-05
466.2928	1	466.2933	15.62	PE(17:1)9Z	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-1.25	-4.10	-3.29	2.49E-03	8.58E-01	2.99E-03
474.2591	0	474.2595	14.82	LysoPE(16:1)	[M+Na]	MS/MS2	1.74	-1.24	-2.15	5.35E-01	4.85E-06	9.80E-07
476.2747	0	476.2749	15.88	LysoPE(16:0)	[M+Na]	MS/MS2	1.32	-1.40	-1.85	4.53E-01	1.69E-03	7.80E-07
480.3084	0	480.3087	16.21	LysoPE(18:1)11Z	[M+H]	ProgenesisQi MS2	1.78	-1.07	-1.91	9.36E-01	5.31E-03	1.35E-09
483.2717	0	483.2720	15.53	PG(16:1(9Z)/(0:0)	[M+H]	MS/MS2	3.04	-3.41	-10.37	1.31E-03	8.93E-07	3.61E-04
485.2874	0	485.2874	16.99	PG(16:0/0:0)	[M+H]	MS, MS2	2.47	-2.01	-4.95	4.00E-01	4.68E-04	8.02E-04
488.2748	0	488.2748	15.62	PE(17:1)9Z	[M+Na]	MS/MS2	-1.35	-2.71	-2.01	6.70E-04	4.66E-01	3.11E-07
497.2874	0	497.2874	16.61	PG(17:1(9Z)/0:0)	[M+H]	MS, MS2	-1.12	-181.30	-162.39	7.92E-04	8.08E-01	2.45E-05
502.2904	0	502.2904	16.21	LysoPE(18:1)11Z	[M+Na]	MS/MS2	1.45	1.08	-1.34	9.69E-01	6.11E-03	2.87E-06
505.2537	0	505.2538	15.52	PG(16:1(9Z)/(0:0)	[M+Na]	MS/MS2	2.60	-2.54	-6.61	5.97E-03	1.20E-04	3.04E-06
519.2693	0	519.2690	16.59	PG(17:1(9Z)/0:0)	[M+Na]	MS, MS2	-1.20	-48.32	-40.38	7.17E-04	8.41E-01	4.99E-03
527.1583	1	527.1588	1.23	Maltotriose	[M+Na]	ProgenesisQi MS2	-1.96	2.45	4.80	3.13E-08	3.15E-03	1.00E-05
543.1322	0	543.1324	1.23	Maltotriose	[M+K]	ProgenesisQi MS2	-2.16	2.20	4.76	2.67E-06	1.05E-03	1.87E-06
613.1592	1	613.1601	1.40	Glutathion ox.	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-1.48	-1.68	-1.14	3.32E-04	1.80E-01	1.22E-10
613.1592	0	613.1594	2.19	Glutathion ox.	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	-1.48	-1.08	1.36	9.24E-01	6.81E-01	5.03E-08
649.2197	1	649.2185	1.28	Tetrasaccharid	[+H-H2O]	ProgenesisQi MS2	-2.33	2.79	6.51	2.06E-07	2.81E-02	1.45E-02
662.4755	1	662.4764	20.66	PE(16:1(9Z)/(14:0)	[M+H]	ProgenesisQi MS2	1.91	2.30	1.21	4.45E-01	9.37E-01	5.92E-01
664.1164	1	664.1173	1.40	NAD	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	1.10	-1.97	-2.16	1.54E-05	4.63E-03	1.00E-09
667.2291	0	667.2291	1.27	Tetrasaccharid	[M+H]	ProgenesisQi MS2	-2.64	2.62	6.90	6.49E-07	4.89E-04	2.59E-01
689.2111	1	689.2118	1.26	Tetrasaccharid	[M+Na]	ProgenesisQi MS2	-1.68	2.25	3.78	4.59E-11	5.97E-03	1.23E-06

690.5068	0	690.5075	20.89	PE(16:0)/(16:1)	[M+H]	ProgenesisQI MS2	-1.96	-2.86	-1.46	7.10E-03	4.85E-01	7.53E-09
704.5225	0	704.5231	21.03	PE(16:0)/17:1)9Z	[M+H]	MS MS2	1.52	1.80	1.19	3.42E-01	3.82E-01	3.28E-12
705.1850	0	705.1849	1.26	Tetrasaccharid	[M+K]	ProgenesisQI MS2	-1.78	2.41	4.28	3.24E-08	7.30E-03	2.46E-01
716.5225	0	716.5222	27.31	PE(16:1)/(18:1)	[M+H]	ProgenesisQI	-2.29	-3.41	-1.49	9.10E-03	6.72E-01	9.57E-01
768.1225	0	768.1224	5.67	Coenzyme A	[M+H]	ST, RT, MS, MS2	1.44	1.45	1.01	4.69E-04	1.51E-03	2.39E-10
829.2820	1	829.2828	1.31	Pentasaccharid	[M+H]	ProgenesisQI MS2	-2.92	2.82	8.24	4.11E-08	1.16E-01	2.00E-01
846.3085	0	846.3084	1.31	Pentasaccharid	[M+NH4]	ProgenesisQI MS2	#DIV/0!	2.55	#DIV/0!	1.14E-07	3.62E-08	1.83E-01
851.2639	1	851.2648	1.31	Pentasaccharid	[M+Na]	ProgenesisQI MS2	-1.80	2.35	4.25	5.62E-14	1.21E-01	1.27E-09
851.3517	0	851.3514	5.88	N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramyl-tripeptide	[M+H]	MS	-1.00	-2.17	-2.17	6.97E-05	6.73E-01	4.61E-09
867.2378	0	867.2382	1.31	Pentasaccharid	[M+K]	ProgenesisQI MS2	-1.95	2.38	4.65	9.95E-11	9.43E-02	2.28E-08
922.3888	0	922.3887	6.16	N-Acetyl-D-glucosamine(anhydrous)N-Acetylmuramyl-tetrapeptide	[M+H]	MS	1.80	-1.65	-2.97	3.68E-04	1.77E-03	5.15E-04
1153.3876	0	1153.3874	1.38	Maltoheptaose	[M+H]	MS/RT	-1.98	5.31	10.53	5.98E-11	9.59E-01	6.36E-10
1175.3695	0	1175.3687	1.39	Maltoheptaose	[M+Na]	MS/MS2	-1.62	3.34	5.39	6.26E-12	9.35E-01	9.21E-05

VI. GC Polar

Derivative	Metabolite	FC KO:WT	FC OE:WT	FC KO:OE	Pvalue KO/WT	Pvalue KO/OE	Pvalue OE/WT
Pyruvic_acid,_4-hydroxyphenyl- _(1MEOX)_(2TMS)_MP_1904	(4-hydroxyphenyl)pyruvate	-2.97	3.68	-10.9	8.50E-04	6.12E-05	6.06E-04
Glutaric_acid,_2-hydroxy-_(3TMS)_1574.7	(R)-2-hydroxyglutarate	-7.56	-3.60	-2.1	3.83E-06	3.26E-03	5.56E-04
Glyceric_acid-1,3-diphosphate_(5TMS)_2674	1,3-bisphosphoglycerate	-2.26	1.29	-2.9	5.85E-03	4.83E-05	2.61E-01
Inositol,_myo-_(6TMS)_2086.3	1D-myo-Inositol	1.15	1.55	-1.3	6.77E-01	4.75E-01	3.47E-01
Inositol-2-phosphate,_myo-_(7TMS)_2465.95	1D-myo-inositol 2-phosphate	-9.23	-1.79	-5.2	1.40E-03	6.53E-03	1.62E-01
Benzoic_acid,_2,3-dihydroxy-_(3TMS)_1745.1	2,3-dihydroxybenzoate	-6.22	-1.74	-3.6	1.57E-02	5.93E-02	3.37E-01
Ethanolaminephosphate_(4TMS)_1787	2-aminoethyl phosphate	1.01	5.88	-5.8	9.72E-01	4.83E-05	8.35E-05
Adenosine,_2'-deoxy-_(3TMS)_2645.48	2'-deoxyadenosine	13.57	3.53	3.8	1.49E-04	4.16E-03	1.11E-02
Glutaric_acid,_2-oxo-_(1MEOX)_(2TMS)_MP_1581.2	2-oxoglutarate	-2.38	1.18	-2.8	7.77E-02	8.70E-02	5.27E-01
Glyceric_acid-2-phosphate_(4TMS)_1793.2	2-phospho-D-glycerate 2-phosphoglycerate	-2.07	1.01	-2.1	5.53E-02	4.16E-03	1.00E+00
Glyceric_acid-3-phosphate_(4TMS)_1811	3-phosphoglycerate	-1.74	-1.04	-1.7	1.30E-03	6.53E-03	8.37E-01
Isocaproic_acid,_2-oxo-_(1MEOX)_(1TMS)_MP_1217.05	4-Methyl-2-oxopentanoate	-3.35	2.04	-6.8	2.55E-04	8.44E-04	1.58E-02
Adenine_(2TMS)_1869.1	adenine	1.01	1.38	-1.4	9.66E-01	8.91E-02	1.62E-01
Adenosine,_alpha-_(4TMS)_MP_2639.7	adenosine	15.73	4.42	3.6	1.82E-04	6.15E-03	5.20E-03
Maltose_(1MEOX)_(8TMS)_BP_2760.2 Maltose_(1MEOX)_(8TMS)_MP_2736.3	alpha-D-glucopyranosyl-(1-4)- beta-D-glucopyranose maltose	1.28	-2.17	2.8	5.93E-01	1.03E-01	4.84E-01
Adenosine-5-monophosphate_(5TMS)_3061.8	AMP	-1.10	4.39	-4.8	7.05E-01	1.94E-06	5.68E-06
Citric_acid_(4TMS)_1825.5	citrate	-2.80	-2.26	-1.2	3.84E-04	5.86E-01	9.37E-03
Cytosine_(2TMS)_1523.1	cytosine	-3.52	-4.83	1.4	3.81E-01	7.14E-01	4.84E-01
Alanine_(2TMS)_1106.8	D-alanine nonpolar amino acid/out L-alanine	1.63	-1.43	2.3	6.90E-02	2.01E-02	2.86E-01
Aspartic_acid_(2TMS)_1431.9	D-aspartate	1.15	-1.04	1.2	8.21E-01	7.14E-01	9.92E-01

	L-aspartate						
Cysteine_(3TMS)_1563	D-cysteine 2-amino-3-mercaptopropanoic acid L-cysteine	-1.25	-12.67	10.1	8.50E-01	3.40E-01	4.84E-01
Fructose-1,6-diphosphate_(7TMS)_2677.9 Fructose-1,6-diphosphate_(1MEOX)_ (7TMS) BP 2724.3	D-fructose 1,6-bisphosphate	-4.34	2.70	-11.7	6.48E-03	2.18E-04	5.42E-03
Fructose-1-phosphate_(1MEOX)_ (6TMS) MP_2292.4	D-Fructose 1-phosphate	3.69	-1.05	3.9	3.56E-02	8.18E-02	9.50E-01
Glyceric_acid_(3TMS)_1343.4	D-glycerate glycerate	1.61	-1.63	2.6	3.92E-01	2.99E-01	1.64E-01
Dihydroxyacetone_phosphate_(1MEOX)_ (3TMS) MP_1753.9	dihydroxyacetone phosphate	-2.23	-1.65	-1.4	4.28E-03	6.00E-01	2.52E-01
Isoleucine_(2TMS)_1296.3	D-isoleucine DL-isoleucine L-Isoleucine	1.55	-5.86	9.1	1.84E-01	1.46E-02	4.87E-03
Malic_acid_(3TMS)_1488.3	DL-malate (S)-malate (R)-malate	-2.70	-1.47	-1.8	4.94E-05	6.53E-03	4.91E-02
Ribose-5-phosphate_(1_MEOX)_ (5TMS) BP_2114.6 Ribose-5-phosphate_(1_MEOX)_ (5TMS) MP_2112	D-ribose 6-phosphate	2.05	1.66	1.2	3.98E-03	5.67E-01	2.61E-01
Tyrosine_(2TMS)_1882.5 Tyrosine_(3TMS)_1939.8	D-tyrosine DL-tyrosine L-tyrosine	1.02	-1.91	2.0	8.79E-01	3.13E-03	3.15E-02
Ethanolamine_(3TMS)_1269.07	ethanolamine	-1.11	1.51	-1.7	5.06E-01	1.90E-02	6.40E-02
Fumaric_acid_(2TMS)_1362.4	fumarate	-1.84	-1.30	-1.4	4.33E-02	2.85E-01	4.57E-01
Glycerol-3-phosphate_(4TMS)_1767.8	glycerol-3-phosphate	-1.41	2.32	-3.3	2.42E-02	1.94E-04	1.19E-03
Glycine_(3TMS)_1313.8	glycine	-1.30	-2.11	1.6	1.60E-01	5.93E-02	1.58E-02
Glycylglycine_(3TMS)_1823.87	glycylglycine	21.42	11.09	1.9	8.70E-05	3.48E-02	1.16E-03
Guanosine-5-monophosphate_(6TMS)_3121.8	GMP	1.66	4.55	-2.7	1.18E-01	2.41E-02	9.37E-03
Guanine_(3TMS)_2135	Guanine	2.46	2.67	-1.1	2.35E-03	7.78E-01	9.37E-03
Hypoxanthine_(2TMS)_1811.5	hypoxanthine	33.59	21.26	1.6	NA	3.53E-01	NA
Inosine-5'-monophosphate_(5TMS)_2994.56	IMP	-20.00	7.57	-151.3	1.09E-02	3.68E-03	8.32E-03

Inosine_(4TMS)_2582.37	inosine	2.53	-1.52	3.8	3.66E-02	2.51E-02	6.67E-01
beta-D-Galactopyranoside,_1-isopropyl-,_1-thio-_(4TMS)_2065.92	isopropyl 1-thio-beta-D-galactopyranoside	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	NA	NA	NA
Lactose,_alpha-_(1MEOX)_(8TMS)_BP_2693.41	lactose	1.07	-1.10	1.2	8.20E-01	8.11E-01	9.24E-01
Laminaribiose_(1MEOX)_(8TMS)_BP_2748.96	laminaribiose	-1.72	-3.36	2.0	5.06E-01	5.96E-01	4.35E-01
Glutamic_acid_(2TMS)_1532.7 Glutamic_acid_(3TMS)_1628.5	L-glutamate	-1.26	-1.33	1.1	3.18E-01	8.31E-01	3.90E-01
Lysine_(3TMS)_1849.9	L-lysine D-lysine	1.20	2.07	-1.7	5.30E-01	2.08E-01	1.38E-01
Methionine_(2TMS)_1520.2 Methionine_(1TMS)_1413.7	L-Methionine	-1.09	-6.79	6.3	8.45E-01	8.34E-02	2.09E-02
Phenylalanine_(1TMS)_1560 Phenylalanine_(2TMS)_1629.4	L-phenylalanine D-phenylalanine	1.23	-1.49	1.8	7.34E-02	1.41E-04	4.94E-02
Threonine_(3TMS)_1392.6	L-threonine D-threonine L-allothreonine DL-threonine	6.44	1.96	3.3	4.21E-01	6.23E-01	5.08E-01
Tryptophan_(3TMS)_2203.1	L-tryptophan DL-tryptophan D-tryptophan	-1.21	-3.43	2.8	1.40E-01	9.61E-05	2.23E-04
Valine_(2TMS)_1214.5	L-valine D-valine	1.65	-2.30	3.8	2.21E-02	1.66E-03	1.11E-02
Nicotinamide_(1TMS)_1482.3	Nicotinamide	1.68	1.46	1.1	2.49E-02	5.43E-01	6.40E-02
Serine,_O-phospho-_(4TMS)_1836.79	O-phospho-L-serine	1.05	-1.81	1.9	8.96E-01	2.08E-01	3.08E-01
Oxalic_acid_(2TMS)_1139.3	oxalate	1.43	1.24	1.1	4.37E-01	8.46E-01	8.37E-01
Phenylpyruvic_acid_(1MEOX)_(1TMS)_MP_1591	phenylpyruvate	-3.18	3.09	-9.8	4.08E-03	7.68E-07	5.81E-06
Phosphoenolpyruvic_acid_(3TMS)_1599.2	phosphoenolpyruvate	-16.96	-6.54	-2.6	1.08E-03	1.52E-01	9.23E-03
Putrescine_(4TMS)_1739.36	putrescine	1.27	-1.22	1.6	6.96E-02	4.39E-02	4.57E-01
Pyruvic_acid_(1MEOX)_(1TMS)_1055.7	pyruvate	1.12	-1.07	1.2	6.76E-01	6.54E-01	8.86E-01
Sedoheptulose-7-phosphate_(xMeOX)_(yTMS)_2555.17	sedoheptulose-7-phosphate	5.66	9.22	-1.6	1.13E-01	4.26E-01	5.48E-03
Shikimic_acid_(4TMS)_1815.3	shikimate	20.24	10.69	1.9	5.47E-04	1.37E-01	3.41E-02
Spermidine_(5TMS)_2256.63	spermidine	-1.36	1.80	-2.4	1.22E-01	2.07E-03	1.41E-02

Tryptamine_(2TMS)_2195.59	tryptamine	-1.54	2.22	-3.4	3.83E-01	5.60E-03	1.32E-02
Uridine_5'-monophosphate_(5TMS)_2872.1	UMP	-1.32	29.35	-38.9	6.49E-01	1.46E-02	1.46E-02
Uridine_(4TMS)_2461.37	uridine	4.98	5.78	-1.2	3.29E-02	8.23E-01	9.63E-02
Disaccharid_1_2748.1		-85.96	-138.09	1.6	1.08E-01	1.31E-01	2.21E-01
Disaccharid_6_2749.9		-36.51	-30.77	-1.2	2.92E-01	6.82E-01	4.45E-01
Disaccharid_3_2740.8		-2.72	-2.41	-1.1	5.80E-04	6.02E-01	5.56E-03
Disaccharid_4_2740.8		-2.62	-2.45	-1.1	8.71E-05	6.79E-01	1.16E-03
Disaccharid_5_2739.6		-2.37	-2.44	1.0	1.20E-03	8.61E-01	5.48E-03
Hexose_1884.9		-1.89	-1.52	-1.2	2.45E-01	5.96E-01	5.09E-01
Sucrose_(8TMS)_2643.6		-1.71	-2.37	1.4	6.76E-01	7.70E-01	6.67E-01
Disaccharid_2_2740.2		-1.69	-1.63	-1.0	2.63E-01	8.61E-01	4.44E-01
Hexose_1891.0		-1.56	-1.20	-1.3	2.20E-01	1.89E-01	6.67E-01
Hexose_1971.9		-1.46	-1.03	-1.4	7.40E-02	6.90E-02	9.33E-01
Hexose_1890.4		-1.25	1.02	-1.3	5.54E-01	3.17E-01	9.94E-01
Hexose_1889.6		-1.04	1.25	-1.3	8.80E-01	2.79E-01	3.69E-01
Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2338.5		1.01	1.68	-1.7	9.67E-01	6.79E-01	6.67E-01
Hexose_1908.5		1.05	-1.10	1.2	8.32E-01	7.02E-01	8.13E-01
Hexose_1907.2		1.12	1.10	1.0	3.33E-01	8.26E-01	5.37E-01
Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2318.7		1.14	-1.15	1.3	6.51E-01	5.43E-01	6.75E-01
Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2318.4		1.21	-1.13	1.4	5.66E-01	4.90E-01	7.73E-01
Hexose_1906.7		1.22	1.23	-1.0	1.74E-01	9.10E-01	2.79E-01
Hexose_1889.0		1.25	-1.13	1.4	2.65E-01	1.24E-01	6.67E-01
Hexose_1909.0		1.41	1.36	1.0	3.73E-01	9.32E-01	5.59E-01
Disaccharid_8_2767.3		1.45	1.66	-1.1	3.58E-01	7.14E-01	3.15E-01
Trihexose_3475.7		1.48	-1.97	2.9	2.11E-01	8.12E-03	2.52E-01
Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2317.4		1.54	-1.19	1.8	8.13E-04	4.83E-05	3.47E-01
Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2318.0		1.54	-1.19	1.8	8.13E-04	4.83E-05	3.47E-01

Glucose-6-phosphate_(1MEOX)_(6TMS)_2344.0		1.60	-1.03	1.7	3.66E-03	2.41E-02	9.33E-01
Guanosine_(5TMS)_2769.57		1.69	1.14	1.5	2.47E-02	1.68E-01	6.67E-01
Ketopentosephosphate_2_2111.4		1.82	1.22	1.5	5.05E-02	3.40E-01	6.75E-01
Ketopentosephosphate_1_2111.8		1.99	1.33	1.5	4.81E-02	3.62E-01	6.06E-01
Trihexose_3509.2		2.81	-2.98	8.4	5.15E-02	3.15E-02	9.63E-02
Disaccharid_7_2760.8		3.68	-1.80	6.6	1.05E-05	5.18E-05	1.11E-01
Pentose_1675.9		4.45	7.80	-1.8	1.71E-02	3.81E-01	6.40E-02
Pentose_1676.7		4.80	7.36	-1.5	7.10E-03	4.75E-01	6.40E-02
Leucrose_(1MEOX)_(8TMS)_MP_2760.52		4.81	-1.53	7.4	4.79E-06	4.83E-05	3.08E-01
Trihexose_3525.7		5.36	1.06	5.0	1.05E-02	3.77E-02	9.78E-01
N-Acetyl-Hexosamine_2072.1		7.80	11.46	-1.5	1.21E-02	3.40E-01	1.16E-03
N-Acetyl-Hexosamine_2072.5		7.80	11.46	-1.5	1.21E-02	3.40E-01	1.16E-03
N-Acetyl-Hexosamine_2071.9		8.01	11.46	-1.4	8.75E-03	3.58E-01	1.16E-03
N-Acetyl-Hexosamine_2073.2		9.40	13.39	-1.4	1.06E-02	4.26E-01	5.25E-03
N-Acetyl-Hexosamine_2073.3		9.40	13.39	-1.4	1.06E-02	4.26E-01	5.25E-03

VII. FAME GC

IS: Interner Standard

FAME Name (identified) Bezeichnung der Bibliothek	RetentionIndex	FC WT/KO	FC OE/KO	FC WT/OE	Pval WT:KO	Pval OE:KO	Pval OE:WT
Dodecanoic acid methyl ester IS	1506.13	-1.01	1.19	-1.21	6.99E-01	1.40E-02	2.27E-02
Tetradecanoic acid methyl ester	1695.09	-2.15	-1.91	-1.12	4.72E-05	1.04E-04	6.10E-02
Tetradecanoic acid methyl ester	1718.62	-1.07	1.14	-1.22	3.56E-01	2.88E-02	4.73E-05
Pentadecanoic acid methyl ester	1820.70	-1.18	1.27	-1.50	9.71E-01	5.30E-01	4.16E-01
Pentadecanoic acid methyl ester	1820.70	-1.18	1.27	-1.50	9.71E-01	5.30E-01	4.16E-01
Hexadecanoic methyl ester	1905.91	1.22	2.12	-1.74	9.13E-01	2.52E-01	2.82E-01
Hexadecanoic methyl ester	1930.05	1.10	1.32	-1.20	6.14E-01	8.15E-01	7.31E-01
Hexadecanoic methyl ester	1930.05	1.10	1.32	-1.20	6.14E-01	8.15E-01	7.31E-01
Heptadecanoic acid methyl ester	2011.31	1.12	1.66	-1.48	1.72E-01	2.88E-01	5.46E-01
Heptadecanoic acid methyl ester IS	2029.94	1.04	1.00	1.04	8.27E-01	6.30E-01	7.42E-01
Octadecanoic acid methyl ester	2109.86	1.06	1.04	1.01	9.69E-01	2.44E-01	2.55E-01
Octadecanoic acid methyl ester	2127.49	1.07	1.26	-1.17	5.13E-01	1.05E-02	1.51E-02
C19:0cyc	2210.72	1.66	2.74	-1.65	2.73E-04	8.06E-09	2.16E-06

VIII. HPLC Lipidome negative

mzmed	Rtmed	Metabolit	Identifiziert	FC_WT_OE	FC WT_D	FC OE_D	Pval WT_OE	P val WT_D	Pval OE_D
424.2475	4.70	LPE14:0	MS2	1.01	-1.75	-1.77	9.46E-01	4.69E-04	1.18E-03
452.2789	5.16	LPE16:0	MS2	1.28	-1.27	-1.63	4.57E-02	2.94E-02	4.28E-04
450.2634	4.84	LPE16:1	MS2	1.29	-1.90	-2.44	2.24E-01	1.40E-04	6.86E-06
478.2945	5.25	LPE18:1	MS2	1.56	-1.75	-2.74	1.48E-02	2.13E-04	9.85E-07
492.3097	5.50	LPE19:0cyc	MS2	-1.15	-1.50	-1.31	4.76E-01	3.31E-03	1.02E-01
483.2727	4.74	LPG16:0	MS2	1.15	1.05	-1.09	3.02E-01	6.65E-01	4.04E-01
511.2867	6.24	LPG18:0	MS2	-2.99	-1.00	2.99	4.02E-06	1.00E+00	4.02E-06
509.2887	4.80	LPG18:1	MS2	1.67	-1.49	-2.49	7.28E-02	4.12E-02	1.68E-05
523.3174	6.23	LPG19:0cyc	MS2	-3.63	-1.00	3.63	9.67E-05	1.00E+00	9.67E-05
634.4467	8.36	PE14:0/14:0	MS2	-1.57	-1.43	1.10	1.56E-03	3.65E-04	3.38E-01
660.4626	8.72	PE14:0/16:1	MS2	-1.38	-1.09	1.27	2.22E-02	4.22E-01	5.19E-02
674.4784	9.20	PE14:0/17:0cyc	MS2	-2.27	-1.59	1.43	4.48E-06	5.43E-05	1.71E-03
688.4935	9.75	PE16:0/16:1	MS2	-1.07	1.16	1.24	3.98E-01	1.09E-01	6.98E-03
690.5084	10.46	PE16:0/16:0	MS2	1.24	-1.22	-1.52	1.32E-01	1.63E-01	2.98E-02
702.5092	10.35	PE16:0/17:0cyc	MS2	-1.68	-1.00	1.68	2.08E-05	9.98E-01	2.72E-05
716.5249	10.81	PE16:0/18:1	MS2	1.12	1.28	1.14	1.29E-01	4.84E-03	9.10E-02
730.4641	9.32	PE16_0/19:0cyc oder PE18:0/17:0cyc	MS2	-1.36	-1.50	-1.10	1.99E-02	1.86E-02	4.76E-01
464.2790	5.06	PE17:0cyc	MS2	-1.34	-2.14	-1.60	2.09E-01	1.44E-05	7.83E-03
714.5092	10.05	PE18:1/16:1	MS2	-1.02	1.13	1.15	7.66E-01	1.76E-01	5.75E-02
742.5406	11.66	PE18:1/18:1	MS2	1.14	1.24	1.09	5.25E-01	3.56E-01	6.71E-01
742.5407	11.11	PE18:1/18:1	MS2	1.14	1.27	1.11	9.81E-02	7.07E-03	1.61E-01
691.4568	7.13	PG14:0/16:1	MS2	-1.42	1.46	2.08	8.36E-06	1.52E-04	1.26E-11
705.4721	7.48	PG14:0/17:0cyc oder PG15:0/16:1	MS2	-2.44	-1.13	2.16	3.52E-10	6.31E-02	9.37E-10
693.4725	7.54	PG16:0/14:0	MS2	-1.75	1.25	2.18	3.27E-07	2.01E-02	6.82E-10

721.4944	7.81	PG16:0/16:0	MS2	-1.23	1.42	1.75	1.26E-01	1.16E-02	9.30E-04
721.5029	8.29	PG16:0/16:0	MS2	-1.24	1.31	1.63	2.11E-01	1.67E-01	1.38E-03
719.4882	7.78	PG16:0/16:1	MS2	-1.30	1.26	1.64	2.90E-03	1.95E-02	2.12E-07
747.5195	8.51	PG16:1/18:1	MS2	1.01	1.59	1.58	9.41E-01	4.18E-03	6.02E-06
733.4897	7.63	PG17:0/17:0 _{eyc}	MS2	-1.24	1.60	1.99	3.92E-02	8.27E-04	6.80E-06
733.5038	8.21	PG17:0/17:0 _{eyc}	MS2	-2.05	1.20	2.46	9.60E-07	1.72E-01	1.98E-08
773.5350	8.80	PG18:1/18:1	MS2	1.24	1.74	1.41	7.42E-02	1.49E-03	1.02E-04

IX. HPLC Lipidome Positive

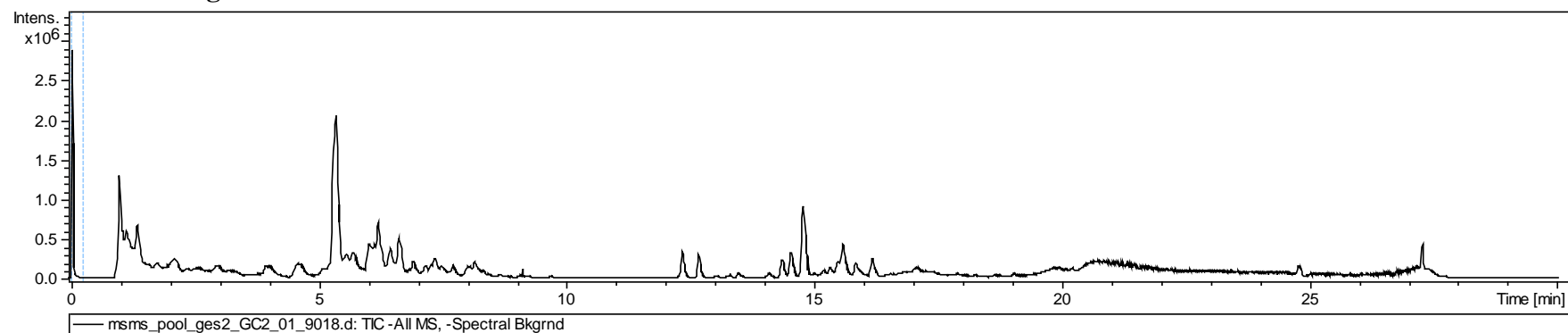
mzmed	Rtmed	Metabolit	Identifiziert	FC_WT_OE	FC WT_D	FC OE_D	Pval WT_OE	Pval WT_D	Pval OE_D
426.2614	4.65	LPE14:0	MS2	-1.18	-2.27	-1.92	4.15E-01	6.38E-05	7.45E-04
452.2770	4.77	LPE16:1	MS2	1.17	-2.52	-2.94	5.00E-01	2.26E-05	6.78E-06
454.2927	5.09	LPE16:0	MS2	1.13	-1.57	-1.78	2.91E-01	1.24E-03	3.05E-04
457.2211	4.30	LPG14:0	MS2	-1.12	1.47	1.64	4.65E-01	5.83E-03	9.20E-03
466.2928	4.99	LPE17:0cyc	MS2	-1.51	-2.90	-1.92	1.20E-01	2.90E-06	8.45E-04
480.3084	5.16	LPE18:1	MS2	1.44	-2.27	-3.27	7.14E-02	3.88E-05	2.90E-06
483.2712	4.39	LPG16:1	MS2	-1.06	-2.47	-2.33	8.52E-01	4.02E-04	6.69E-04
485.2896	5.76	LPG16:0	MS2	4.74	8.88	1.87	1.59E-07	3.47E-09	2.35E-01
497.2895	5.69	LPG17:0cyc	MS2	-7.67	1.11	8.49	2.89E-05	3.43E-01	2.73E-05
511.3022	4.72	LPG18:1	MS2	1.84	-2.14	-3.93	1.23E-01	1.54E-03	2.39E-06
662.4756	8.44	PE14:0/16:1	MS2	-1.38	1.03	1.42	7.29E-05	6.04E-01	2.05E-05
676.4914	8.95	PE14:0/17:0cyc	MS2	-2.25	-1.39	1.62	4.33E-08	4.53E-05	2.67E-06
690.5072	9.45	PE16:0/16:1	MS2	-1.16	1.14	1.32	2.10E-02	2.74E-02	1.56E-04
692.5229	8.21	PE16:0/16:0	MS2	-1.52	1.50	2.28	4.21E-02	7.76E-02	5.11E-04
693.4697	6.79	PG14:0/16:1	MS2	-1.79	1.31	2.34	5.22E-07	7.02E-04	4.10E-08
695.4854	7.18	PG16:0/14:0	MS2	-2.23	1.46	3.27	1.35E-07	5.19E-04	3.63E-08
704.5227	10.04	PE16:0/17:0cyc	MS2	-1.66	1.09	1.81	4.33E-07	1.26E-01	5.70E-08
707.4856	7.12	PG14:0/17:0cyc or PG15:0/16:1	MS2	-4.21	-1.05	4.02	1.93E-08	7.44E-01	4.81E-09
707.5052	8.07	PG14:0/17:0cyc or PG15:0/16:1	MS2	-1.19	-1.32	-1.10	2.48E-02	9.50E-04	1.73E-01
716.5226	10.89	PE18:1/16:1	MS2	1.06	1.61	1.51	7.36E-01	3.20E-02	2.98E-02
718.5384	10.48	PE16:0/18:1	MS2	1.01	1.27	1.26	8.41E-01	4.10E-04	1.00E-03
721.5016	7.39	PG16:0/16:1	MS2	-1.43	1.54	2.20	5.12E-05	6.74E-06	5.31E-08
723.5162	7.86	PG16:0/16:0	MS2	-1.57	1.29	2.03	1.10E-03	3.68E-02	2.86E-05
732.5537	8.76	PE16:0/19:0cyc or PE18:0/17:0cyc	MS2	1.72	2.18	1.27	2.43E-02	6.08E-03	3.47E-02
735.5171	7.79	PG16:0/17:0cyc	MS2	-2.33	1.46	3.41	5.32E-08	1.82E-04	1.15E-08

744.5540	10.77	PE18:1/18:1	MS2	1.10	1.45	1.33	1.61E-01	7.03E-05	6.12E-04
749.5327	8.08	PG18:1/16:1	MS2	-1.03	2.13	2.19	7.31E-01	4.16E-07	5.58E-08
755.5507	7.78	PG18:1/18:1	MS2	-2.32	1.69	3.92	1.21E-08	1.90E-05	1.71E-09

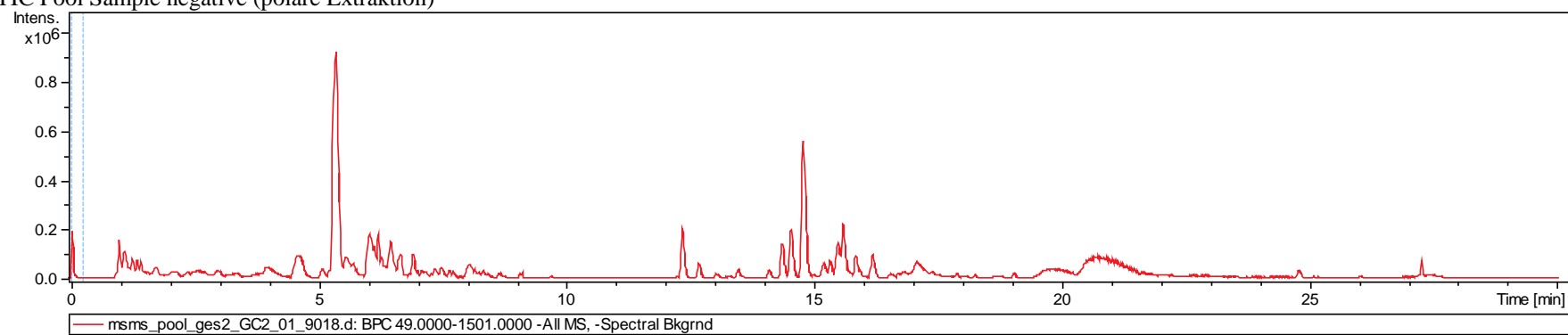
X. Sequencing Read Mapping Statistik

Library	Sequencing technology	Description	Total number of read counts	Number of mapped reads	Number of uniquely mapped reads	% of uniquely mapped reads	Reference
wt_1_S27_L006_R1_001	Illumina HiSeq	wildtype biological replicate 1	22422128	20803348	20166515	96.94	This study
wt_2_S28_L006_R1_001	Illumina HiSeq	wildtype biological replicate 2	26954015	21895998	21093415	96.33	This study
wt_3_S29_L006_R1_001	Illumina HiSeq	wildtype biological replicate 3	23935508	22282678	21640470	97.12	This study
KO_1_S33_L006_R1_001	Illumina HiSeq	knockout biological replicate 1	23738677	21754425	21092722	96.96	This study
KO_2_S34_L006_R1_001	Illumina HiSeq	knockout biological replicate 2	19027927	17623846	17042603	96.7	This study
KO_3_S6_L001_R1_001	Illumina HiSeq	knockout biological replicate 3	17862960	16844377	16418676	97.47	This study
OE_1_S30_L006_R1_001	Illumina HiSeq	Overexpression biological replicate 1	20077648	16778078	16219363	96.67	This study
OE_2_S31_L006_R1_001	Illumina HiSeq	Overexpression biological replicate 2	19142773	15677874	15119396		This study
OE_3_S32_L006_R1_001	Illumina HiSeq	Overexpression biological replicate 3	22978175	19346196	18654709	96.44	This study

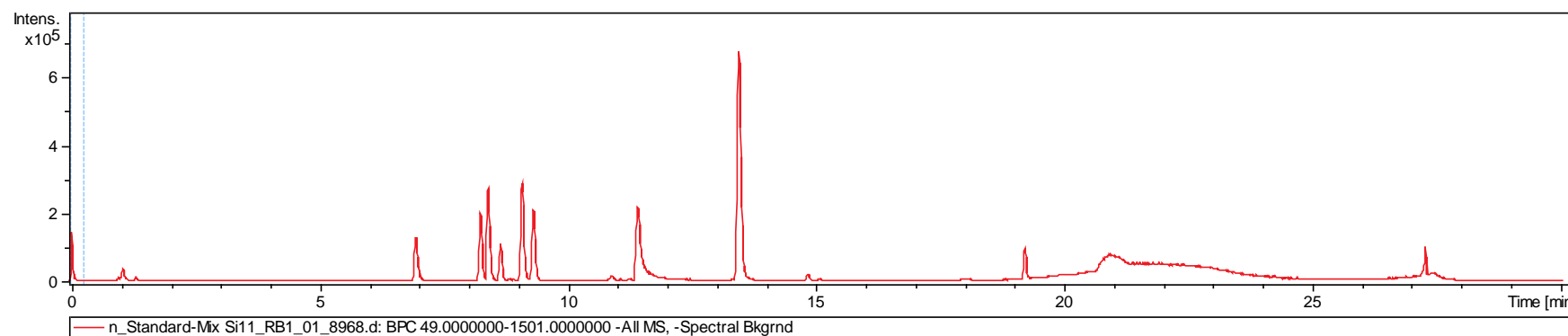
XI. Chromatogramme



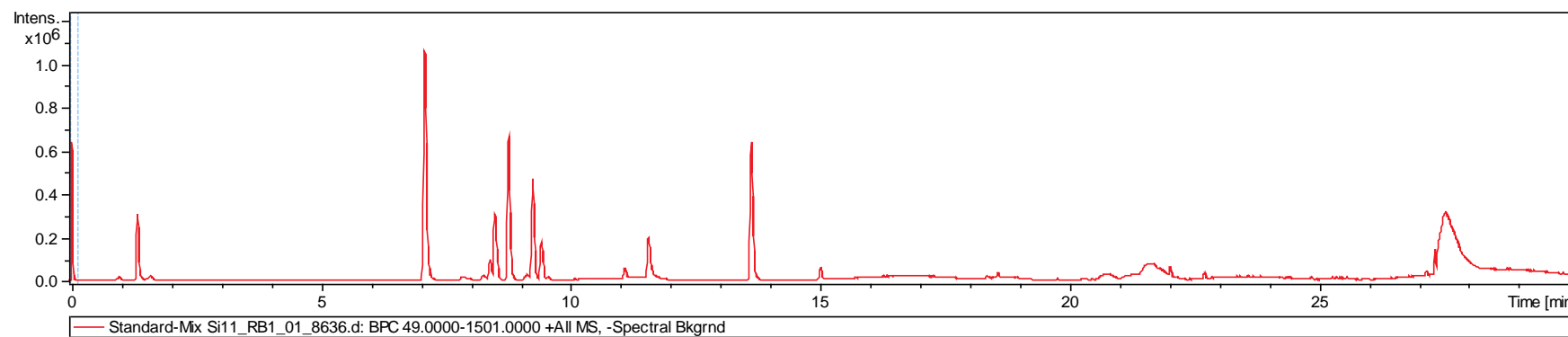
TIC Pool Sample negative (polare Extraktion)



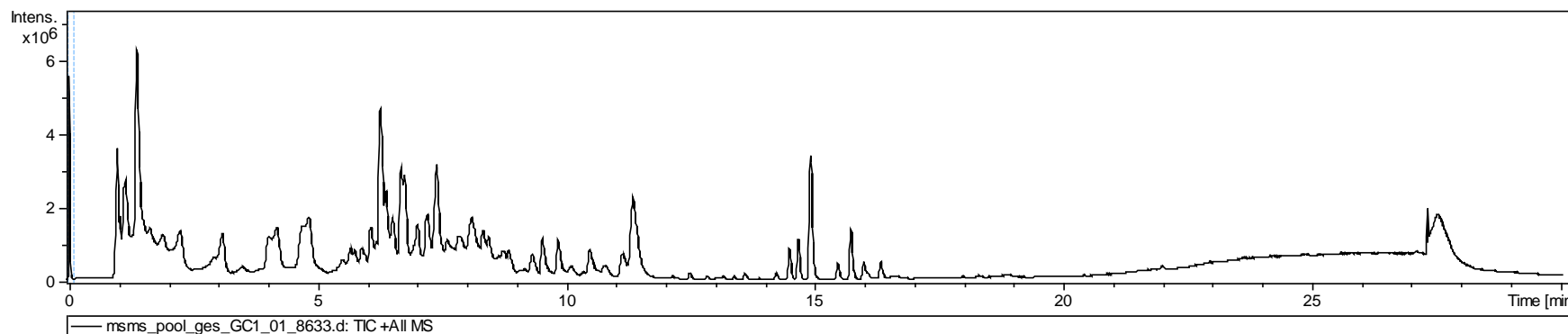
Base Peak Pool Sample negative (polare Extraktion)



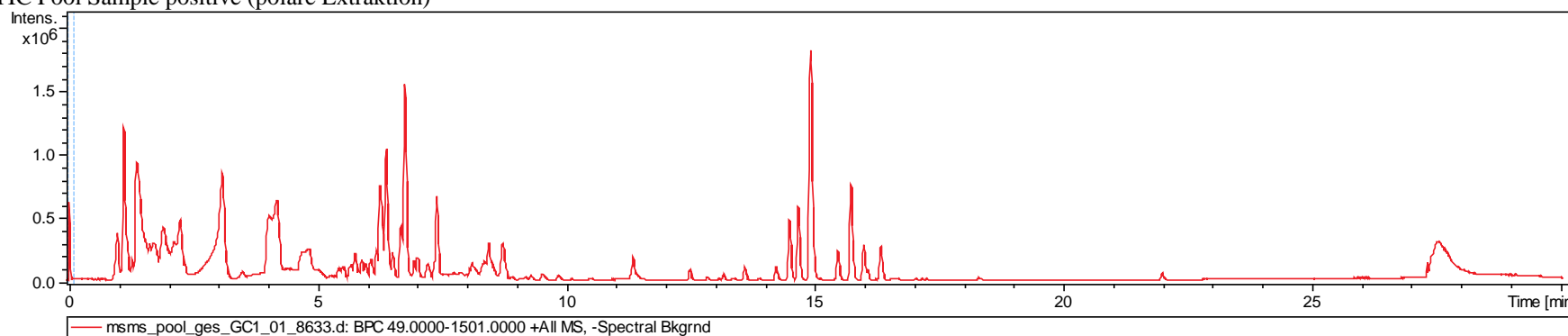
Standard Mix Qualitätskontrolle, negative BPC



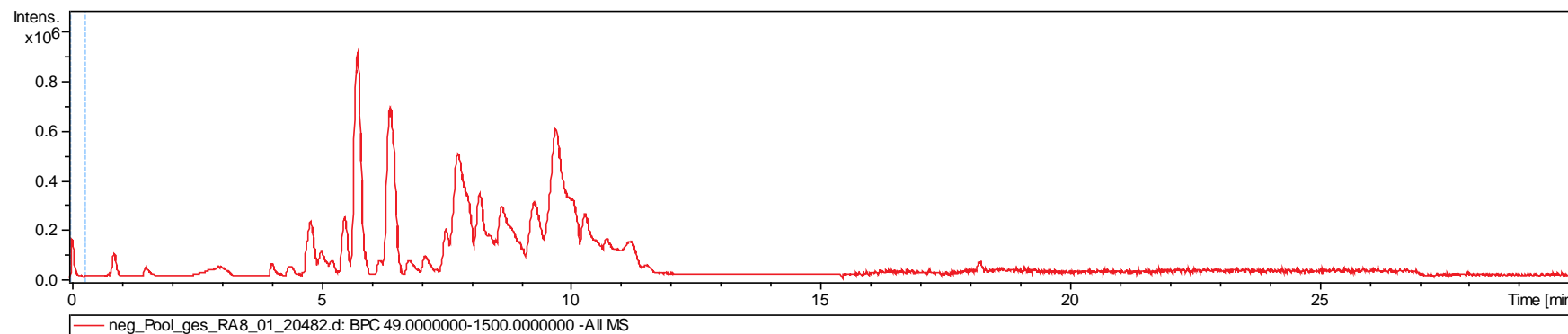
Standard Mix Qualitätskontrolle, positive BPC



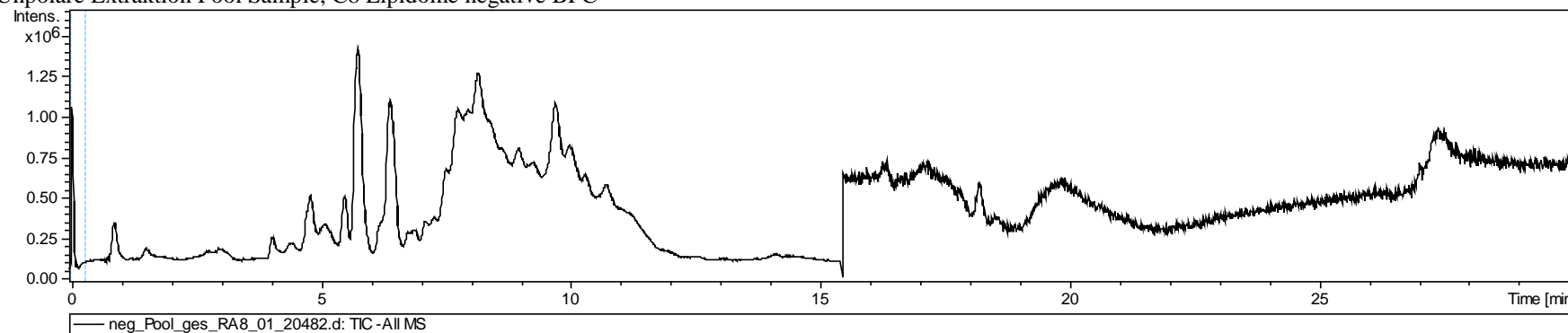
TIC Pool Sample positive (polare Extraktion)



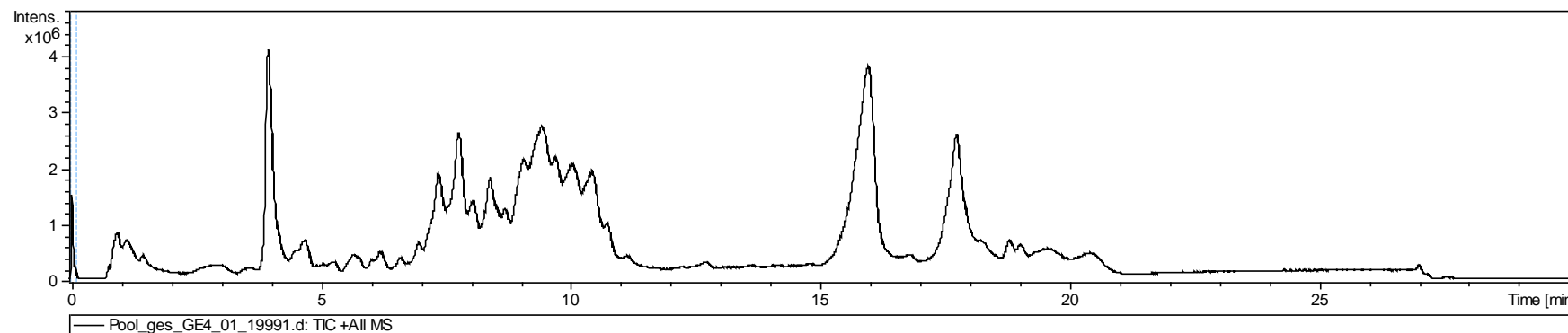
Base Peak Pool Sample positive (polare Extraktion)



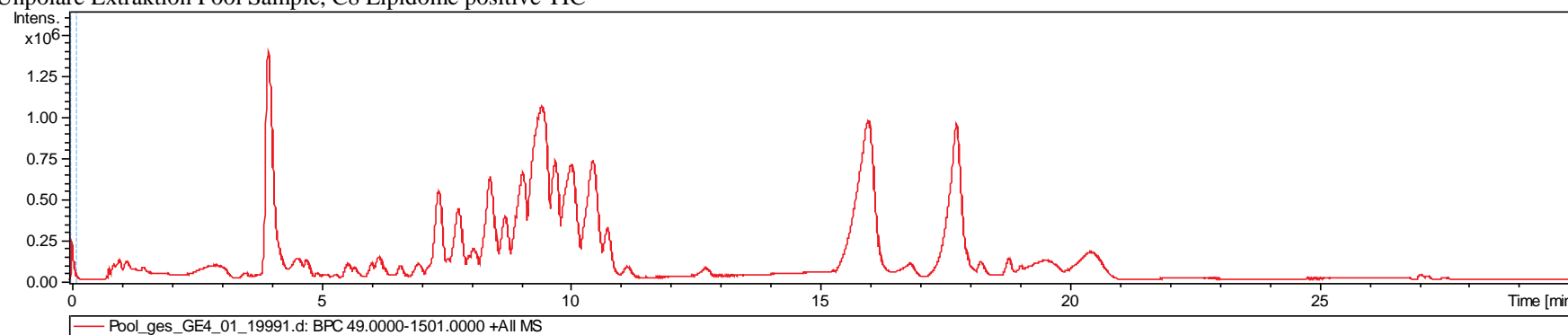
Unpolare Extraktion Pool Sample, C8 Lipidome negative BPC



Unpolare Extraktion Pool Sample, C8 Lipidome negative TIC



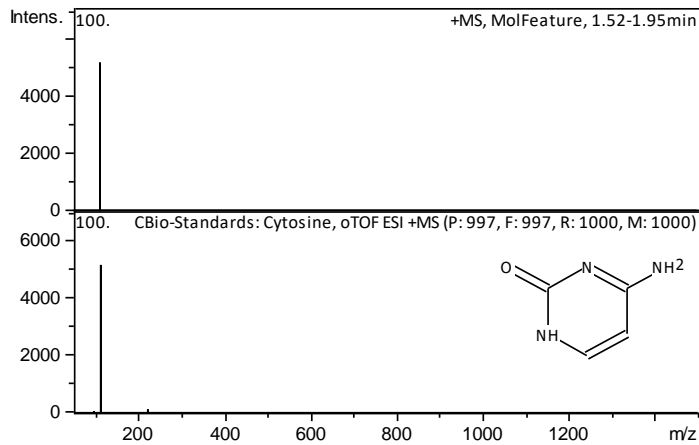
Unpolare Extraktion Pool Sample, C8 Lipidome positive TIC



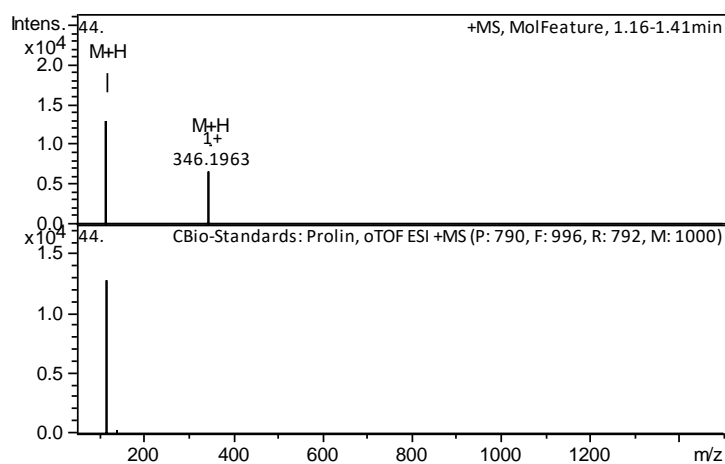
Unpolare Extraktion Pool Sample, C8 Lipidome positive BPC

XII. Spektren: Identified features

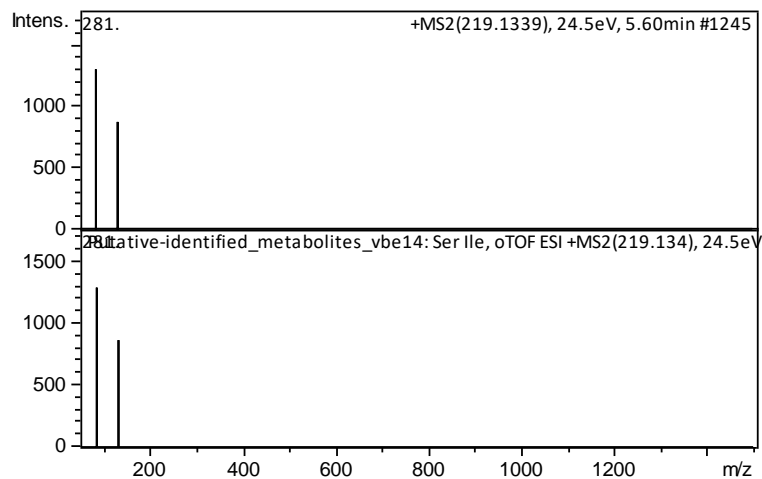
Identifizierung via MS, RT (MS2) mit der internen C BIO Bibliothek. Die gemessene m/z Werte des jeweiligen Addukts sind mit der Referenz m/z aus Metlin und der Δ ppm in **Tabelle IV** und **V** angegeben. Der ppm Cutoff lag bei maximal 5 ppm. Der höchste bestimmte Δ ppm im positiv Modus lag bei 1 ppm, im negativ Modus bei 5 ppm.



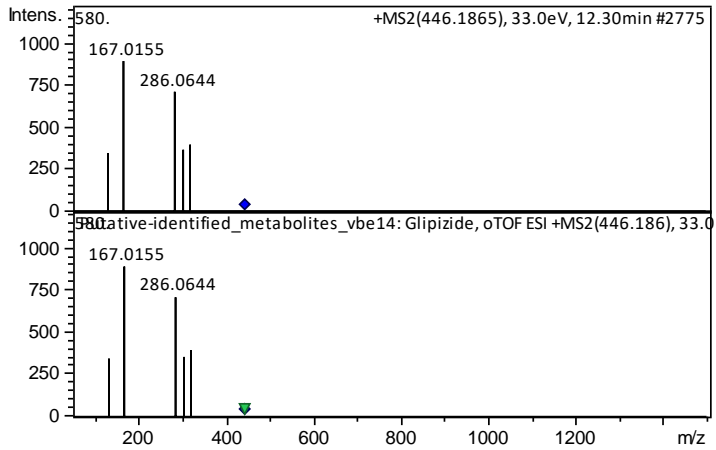
Cytosin ST, RT, MS



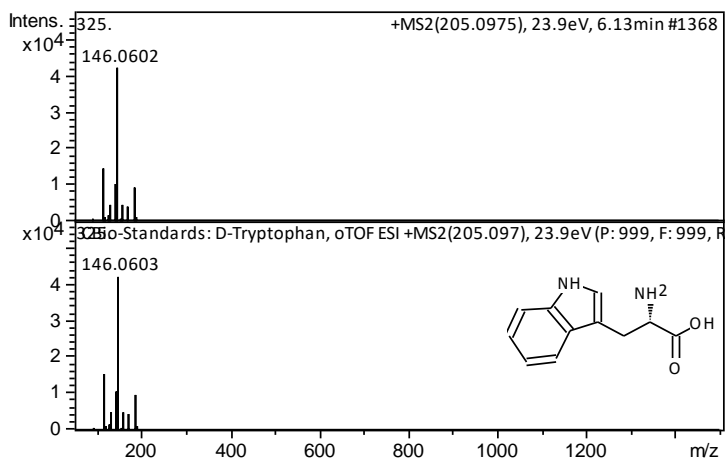
Prolin ST, RT, MS



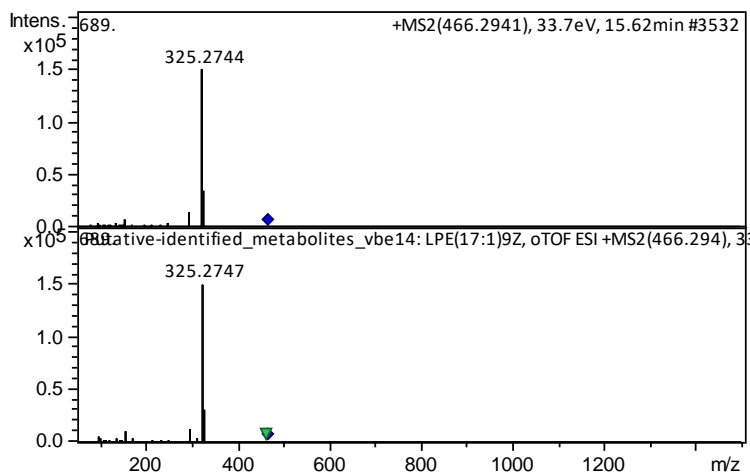
Ser, Ile ST, RT, MS



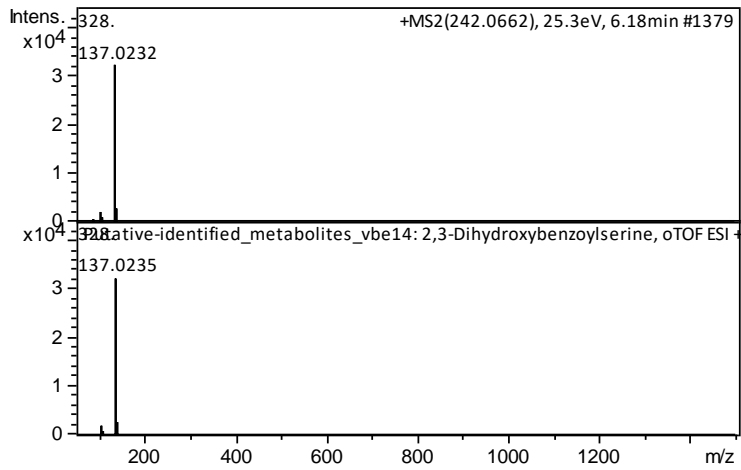
Glipizide ST, RT, MS, MS2



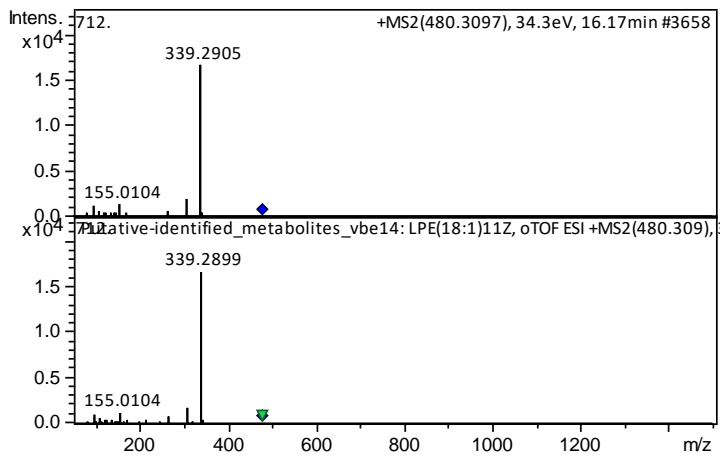
Tryptophan ST, RT, MS, MS2



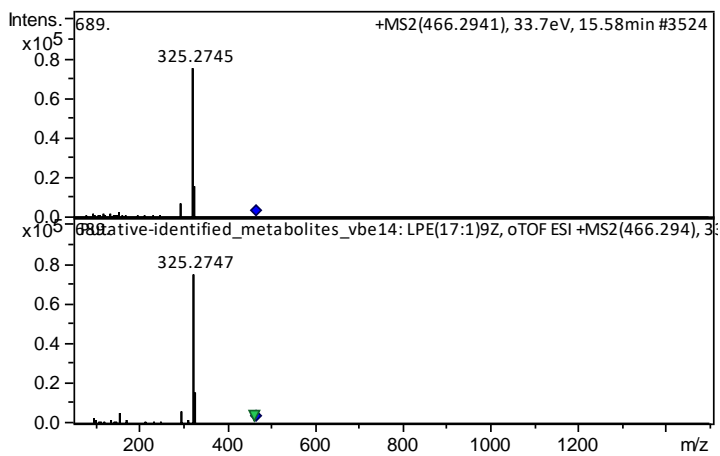
LPG17:0cyc MS/MS2



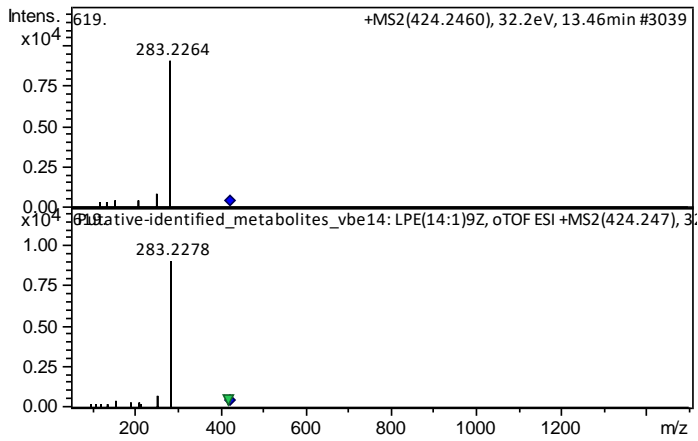
2,3 Dihydroxybenzoylserin ST, MS,MS2



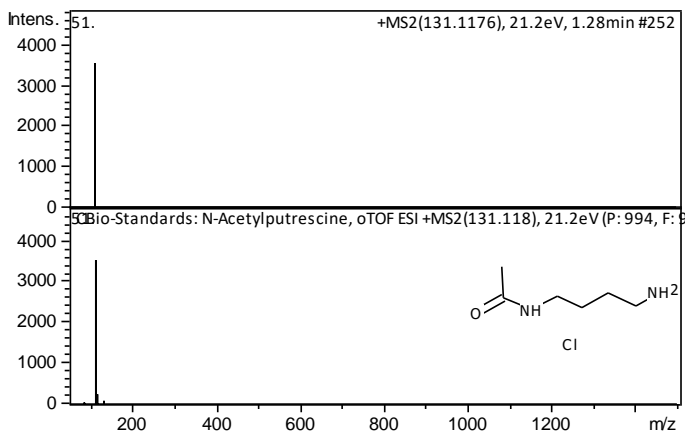
LPE18:1 MS/MS2



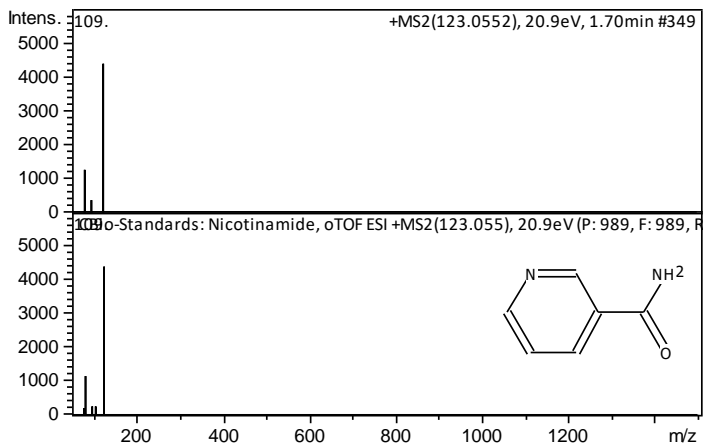
LPE17:1 MS/MS2



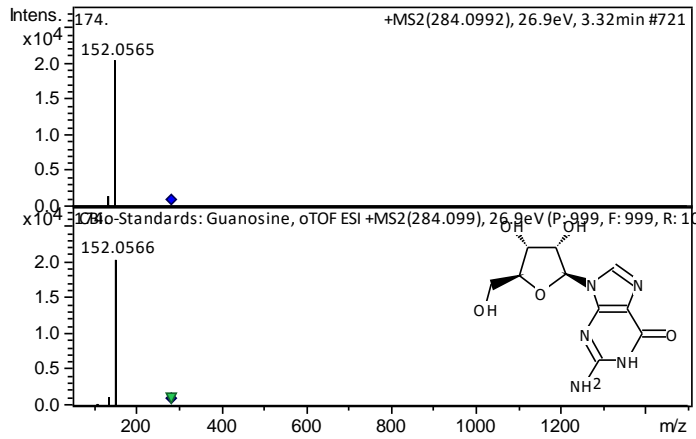
LPE14:1 MS/MS2



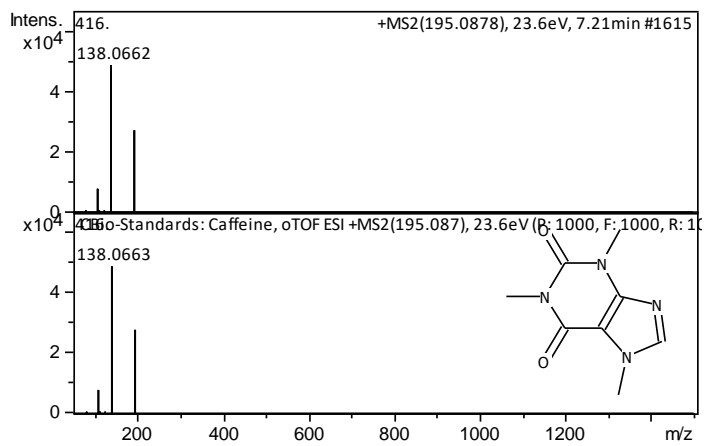
N-Acetylputrescine ST, RT, MS, MS2



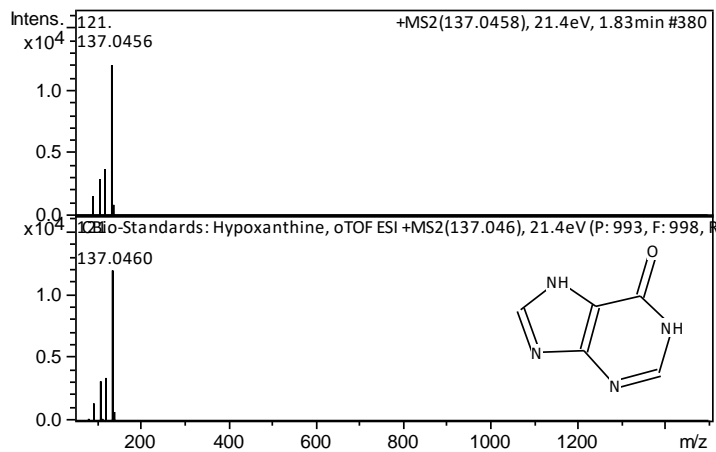
Nicotinamid ST, RT, MS, MS2



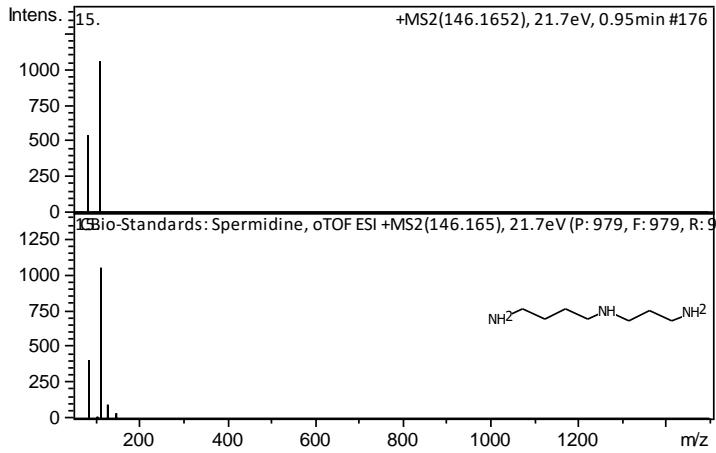
Guanosin: ST, RT, MS, MS2



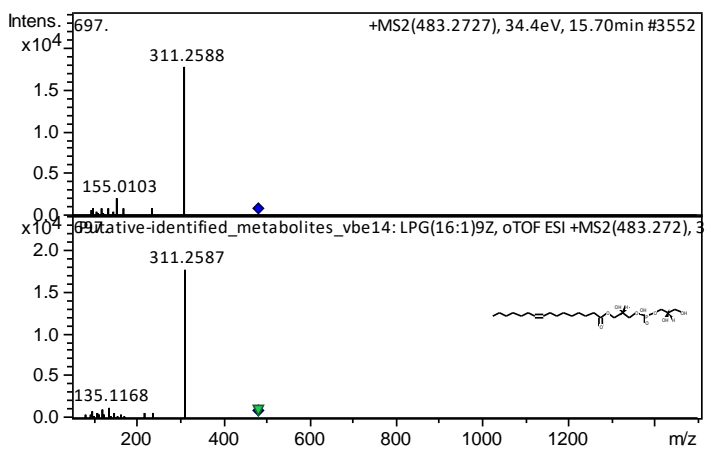
Koffein ST, RT, MS, MS2



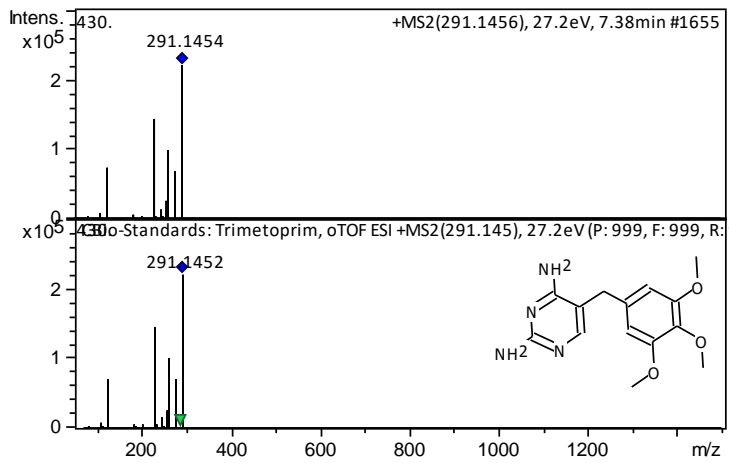
Hypoxanthin ST, RT, MS,MS2



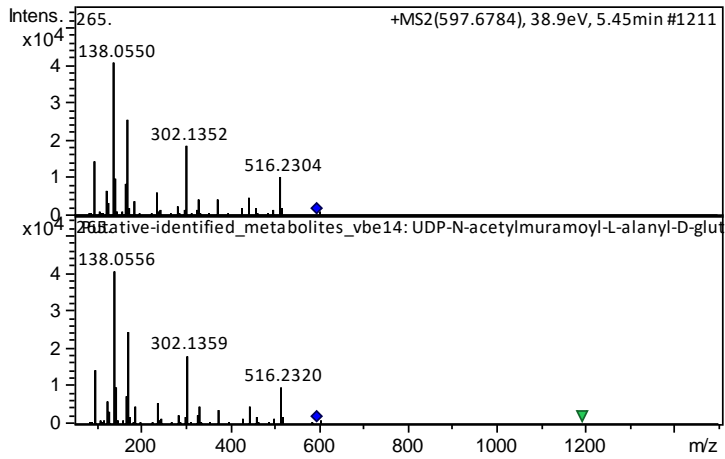
Spermidin ST, RT, MS, MS2



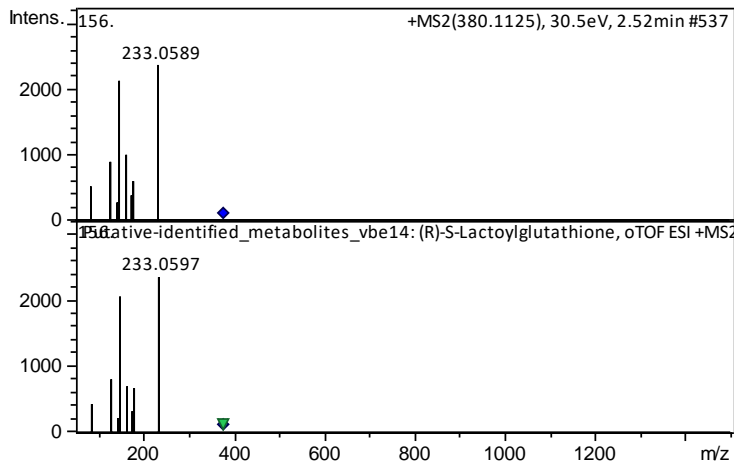
LPG16:1 MS,MS2



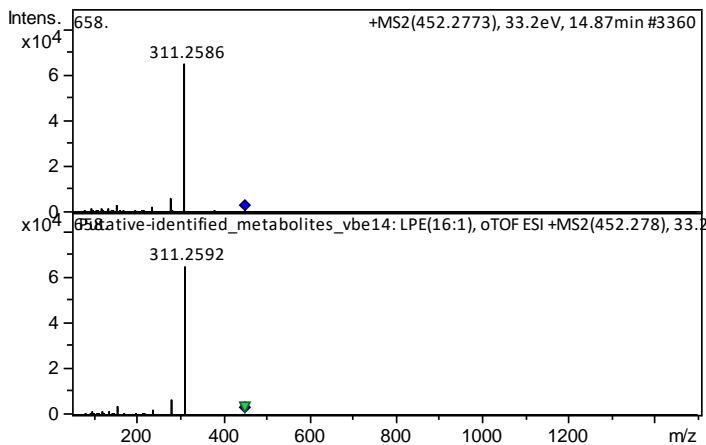
Trimetoprim ST, RT, MS, MS2



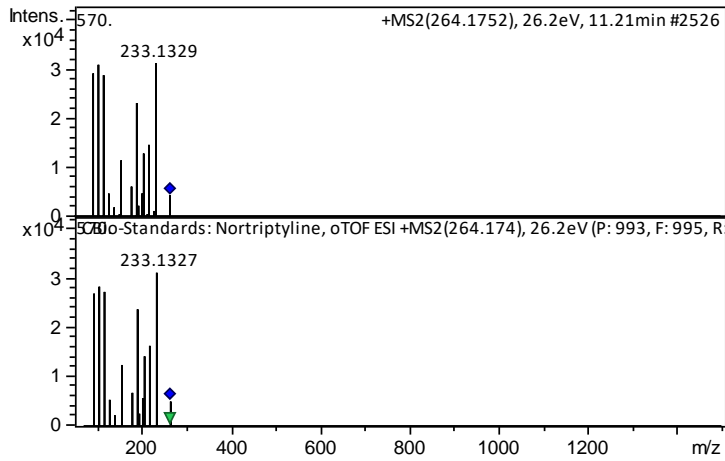
UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-d-glutamyl-6-carboxy-l-lysyl-d-alanyl-d-alanine MS/MS2



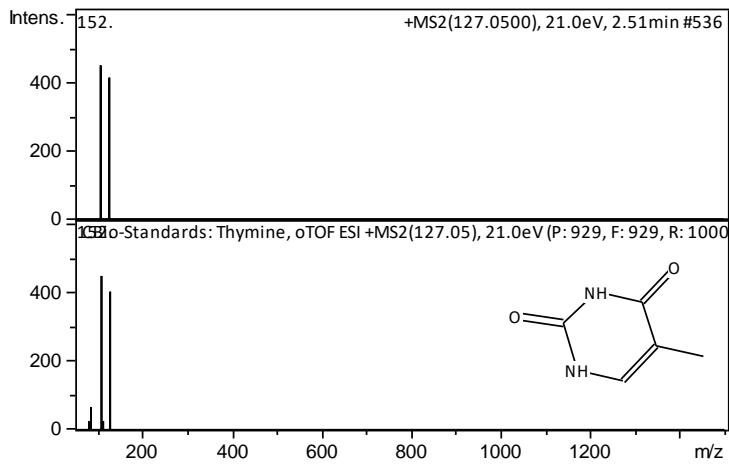
S- Lactoylglutathione MS/MS2



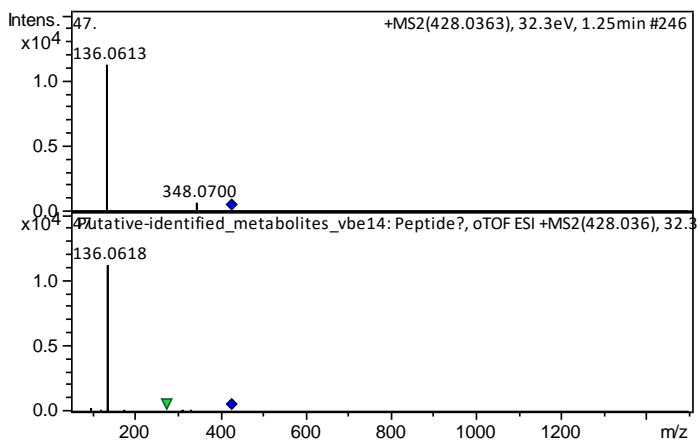
LPE16:1 MS/MS2



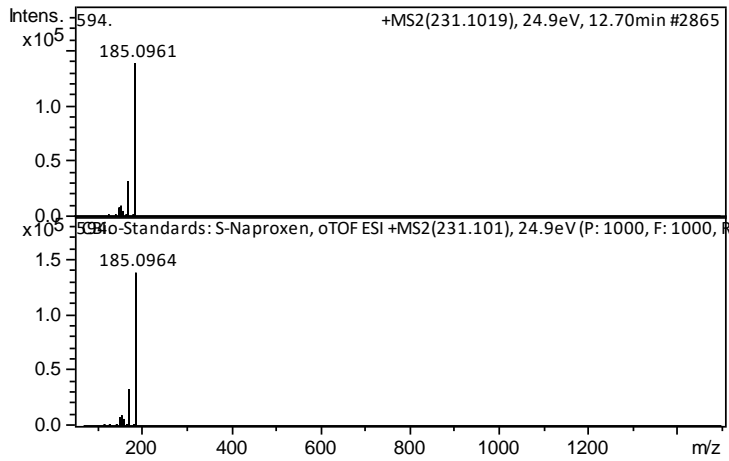
Nortriptyline ST, RT, MS, MS2



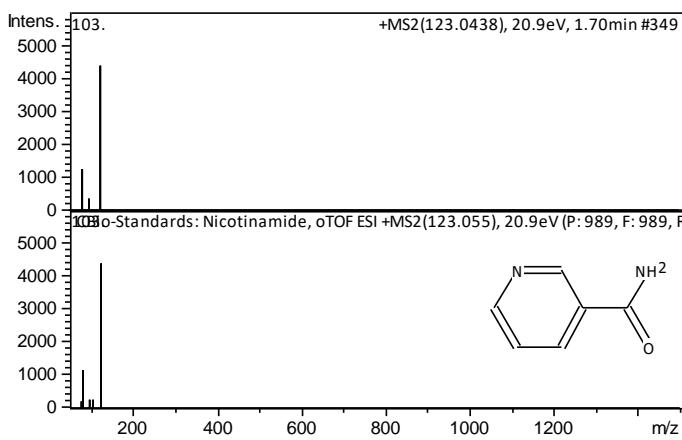
Thymine ST, RT, MS, MS2



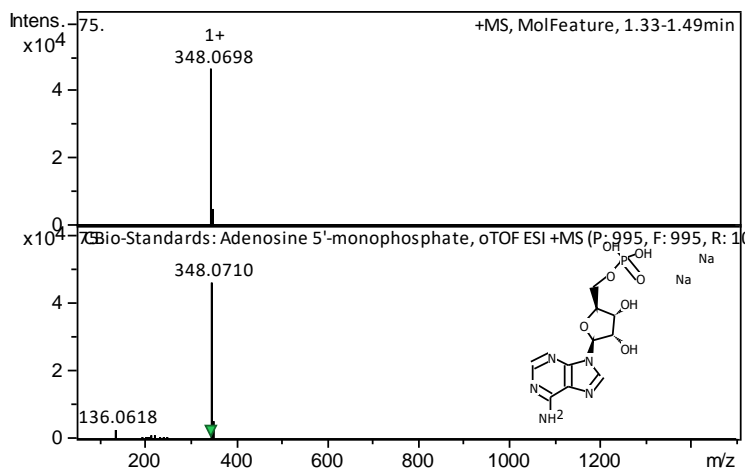
ADP ST, RT, MS, MS2



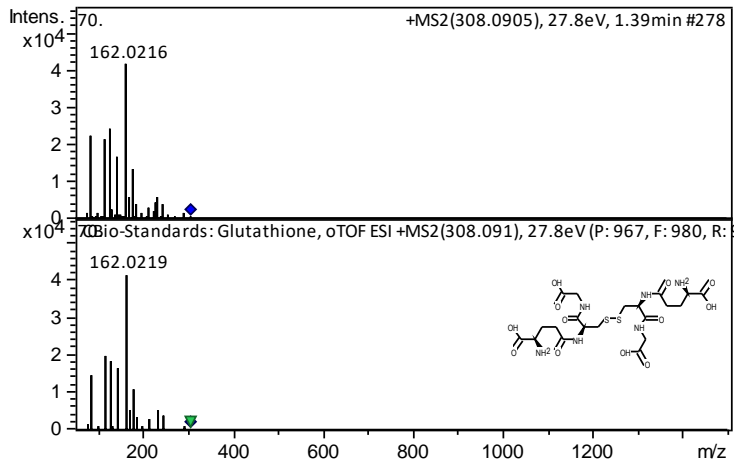
Naproxen ST, RT, MS, MS2



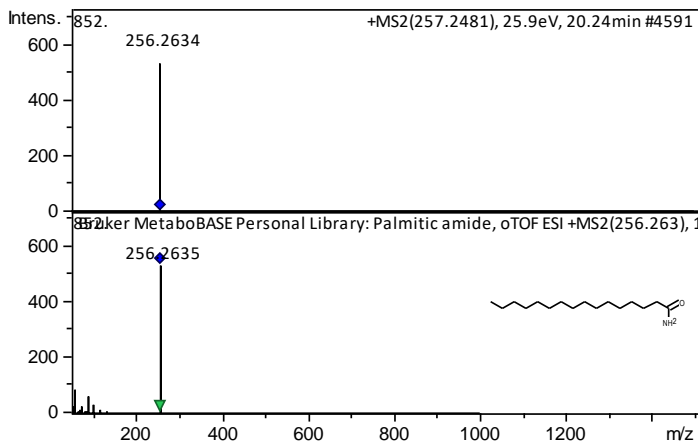
Nicotinamid ST, RT, MS, MS2



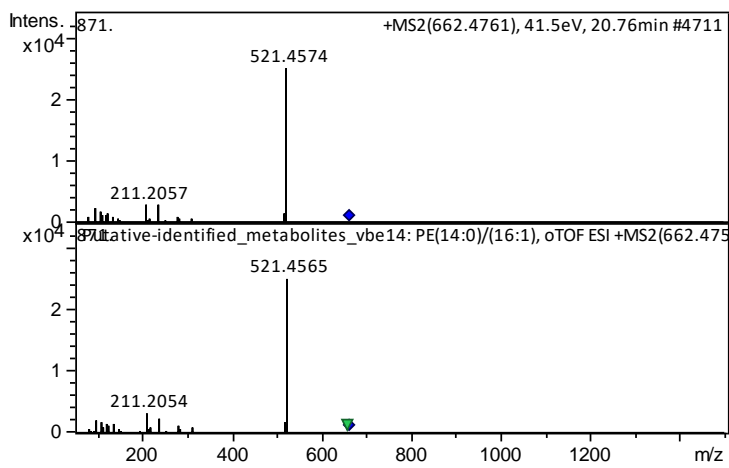
AMP ST, RT, MS



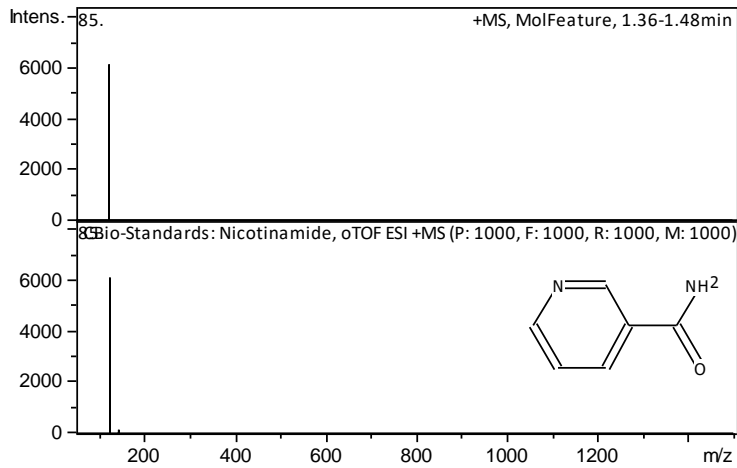
Glutathion ST, RT, MS, MS2



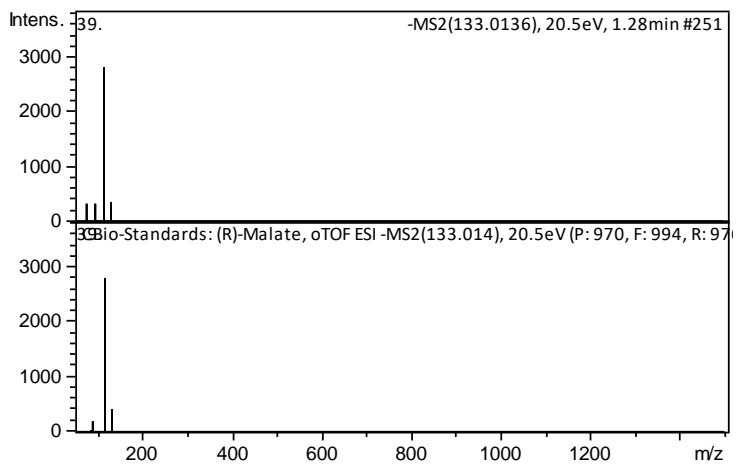
Palmitinsäure ST, RT, MS



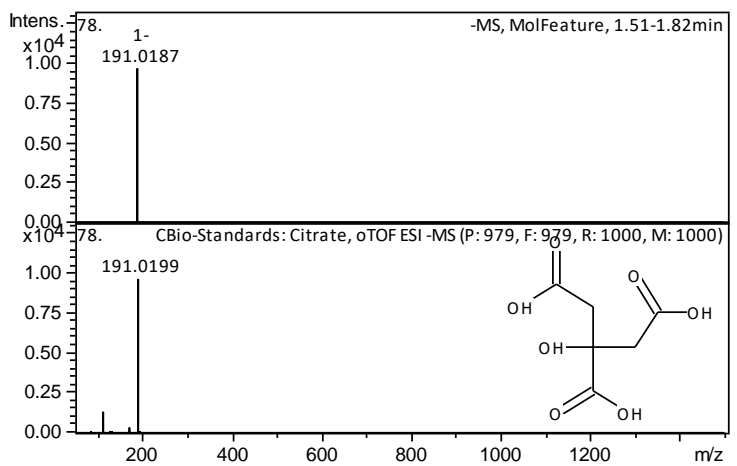
PE(14:0/16:0) MS/MS2



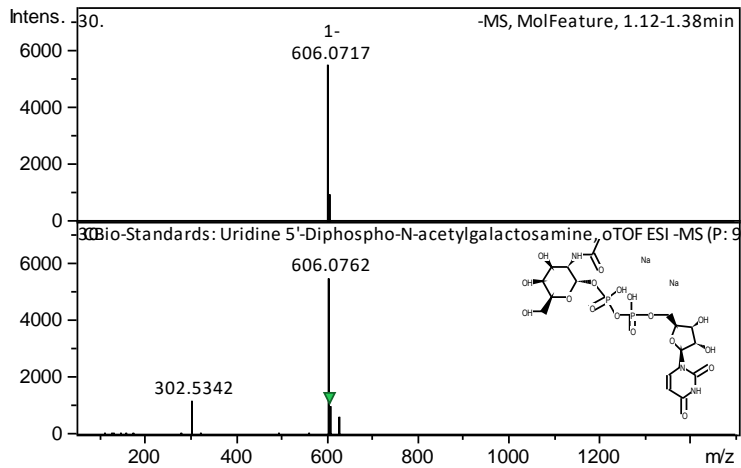
Nicotinamid ST, RT, MS



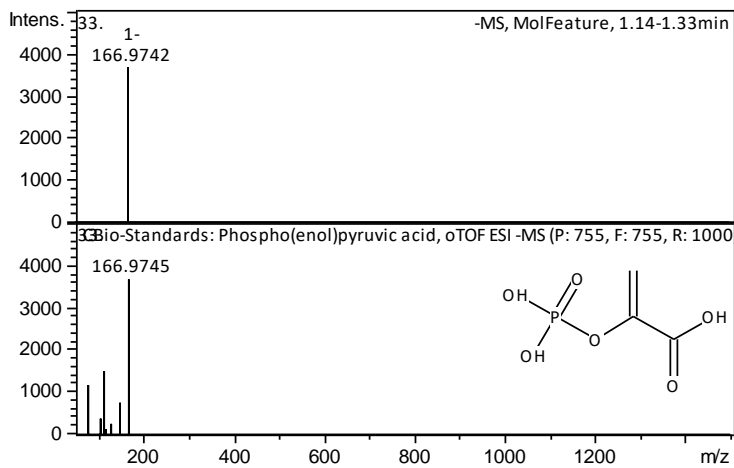
Malat ST, RT, MS, MS2



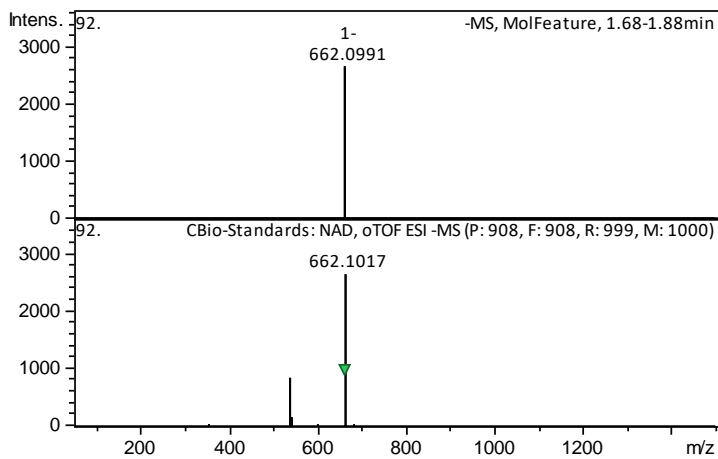
Citrat ST, RT, MS



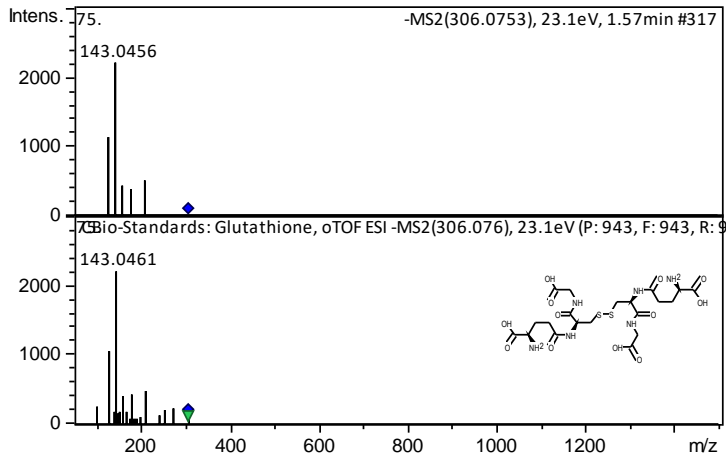
Uridin 5' Diphospho-N-acetylgalactosamine ST, RT, MS



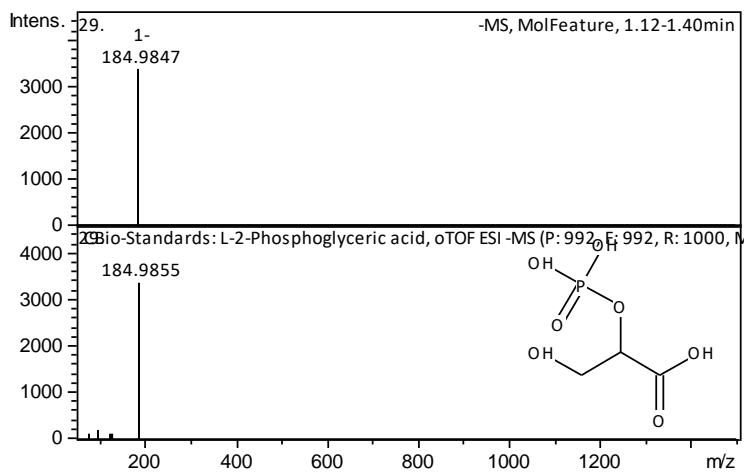
Phosphoenolpyruvat ST, RT, MS



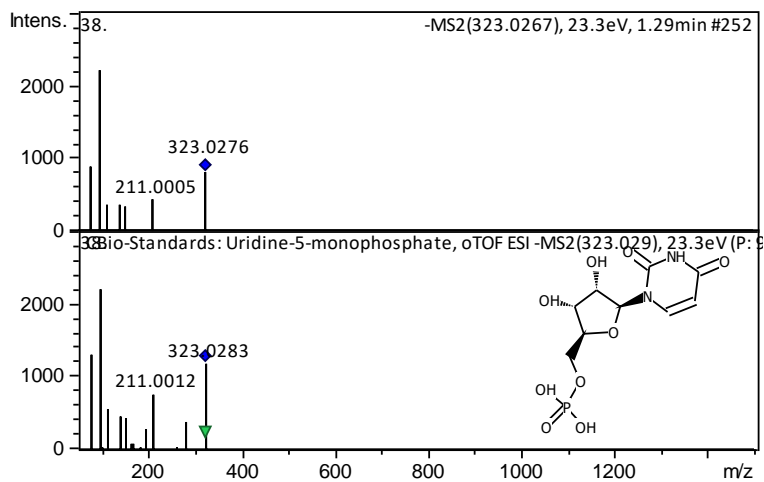
NAD ST,RT, MS



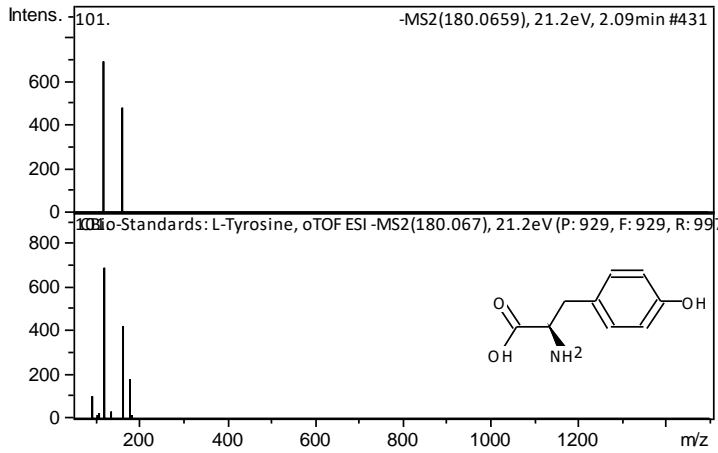
Glutathion ST, RT, MS, MS2



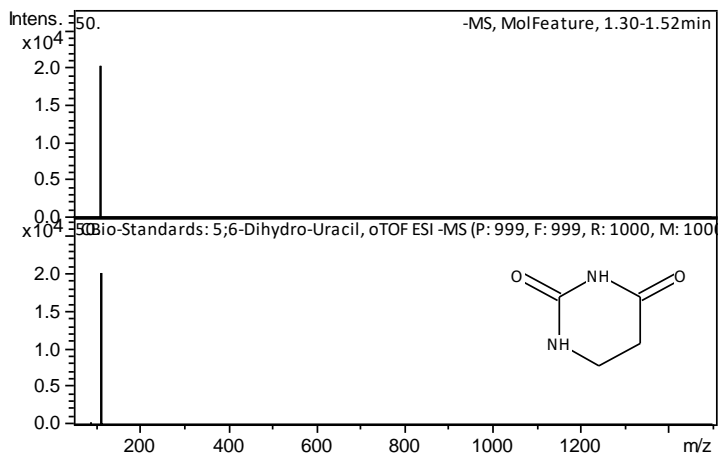
Phosphoglycerat ST, RT,MS



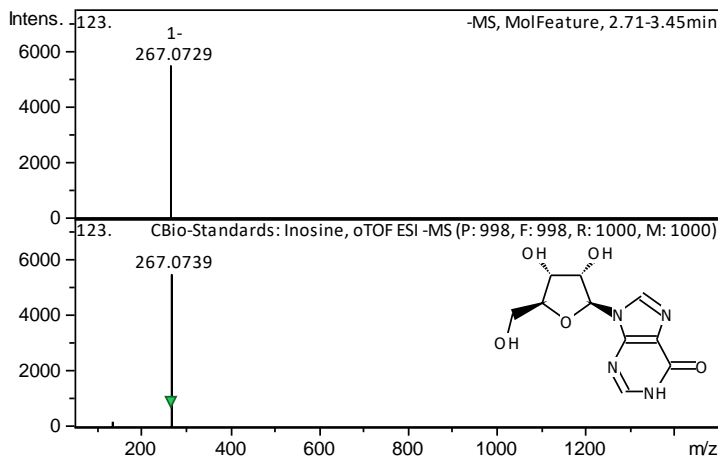
UMP ST, RT, MS, MS2



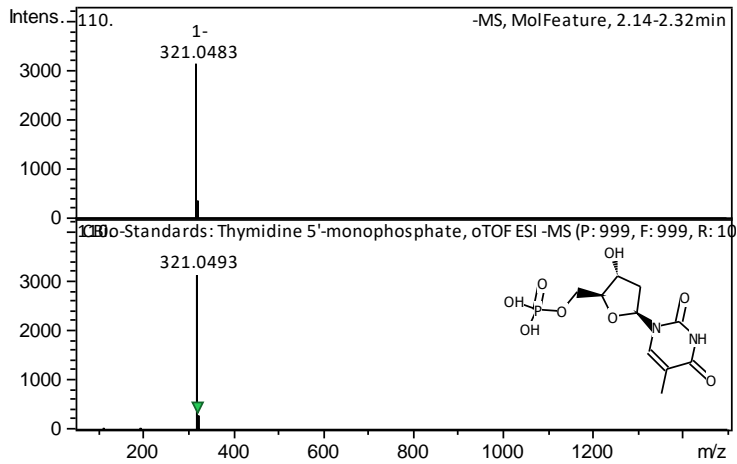
Tryptophan ST, RT, MS, MS2



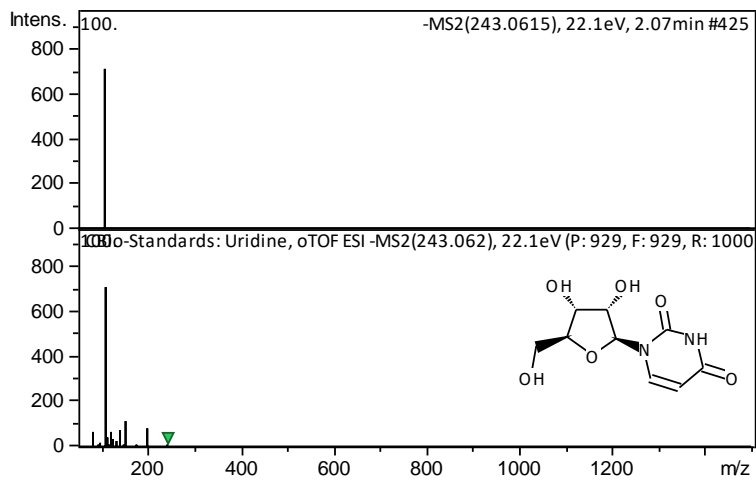
Dihydrouracil ST, RT, MS, MS2



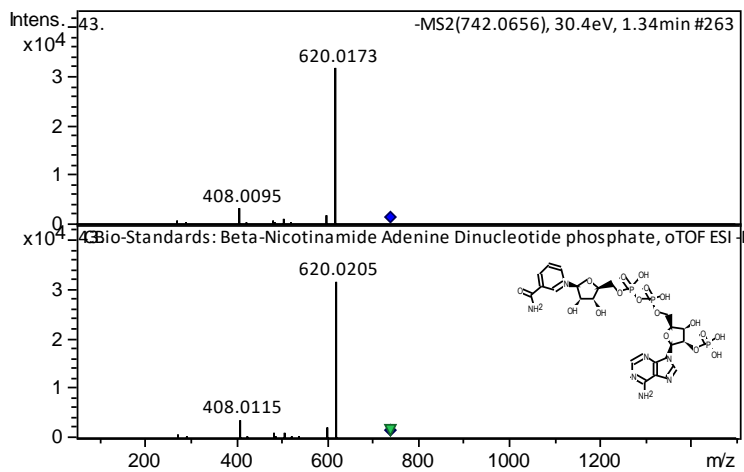
Inosin ST, RT, MS

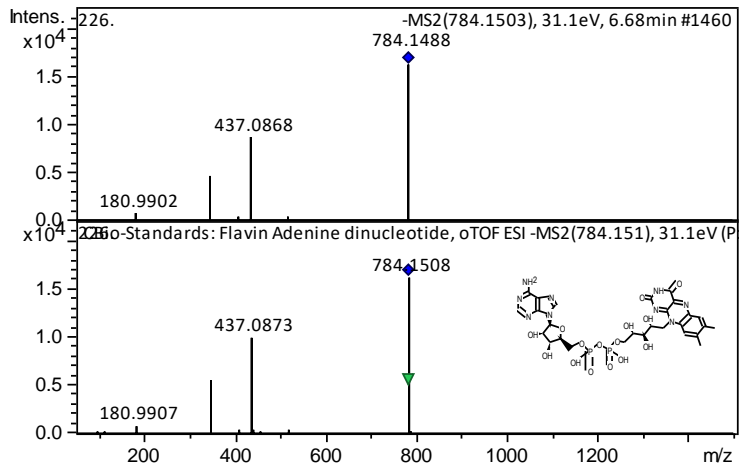


TMP ST, RT, MS

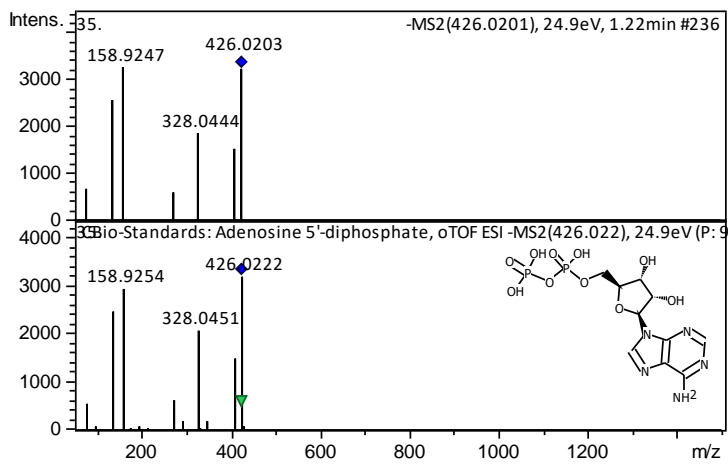


Uridin ST, RT, MS, MS2

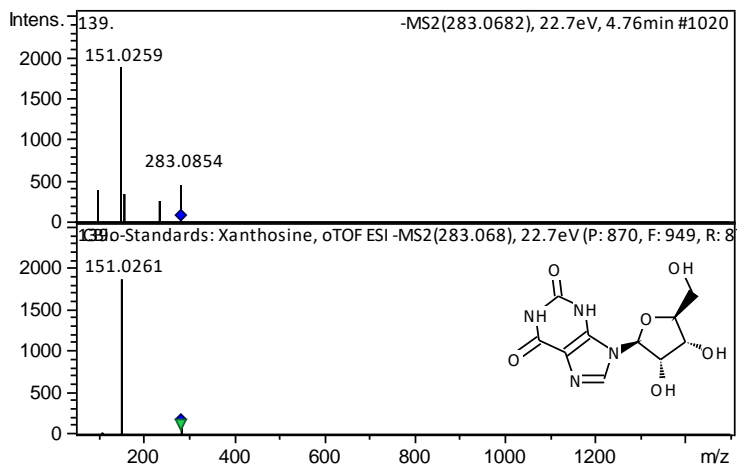
 β -Adenin Dinucleotid-Phosphat ST, RT,MS,MS2



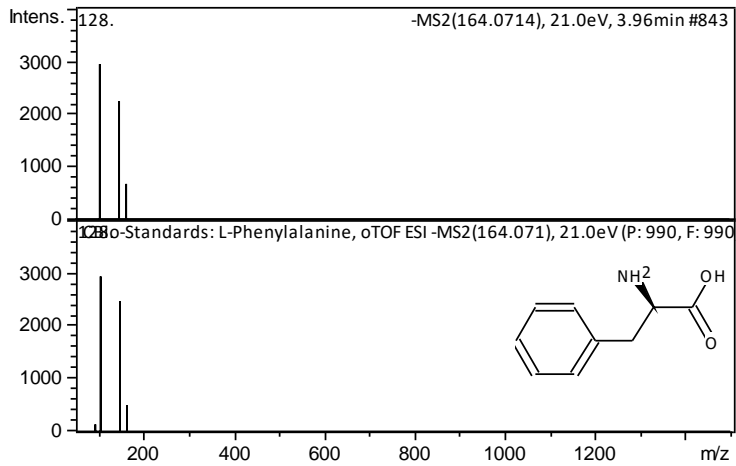
FAD ST, RT, MS, MS2



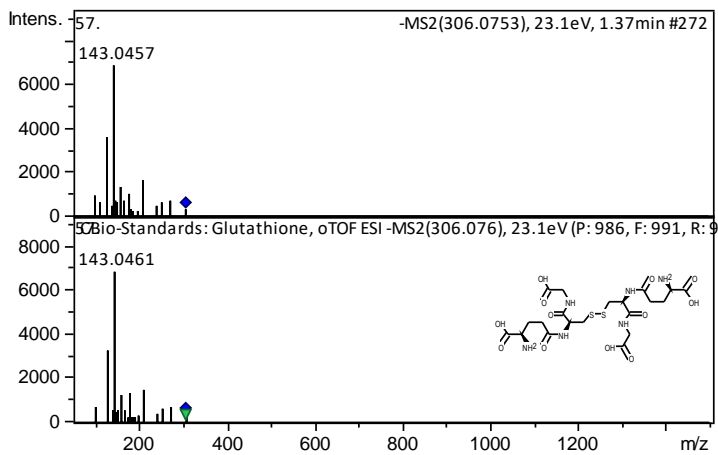
ADP ST, RT, MS, MS2



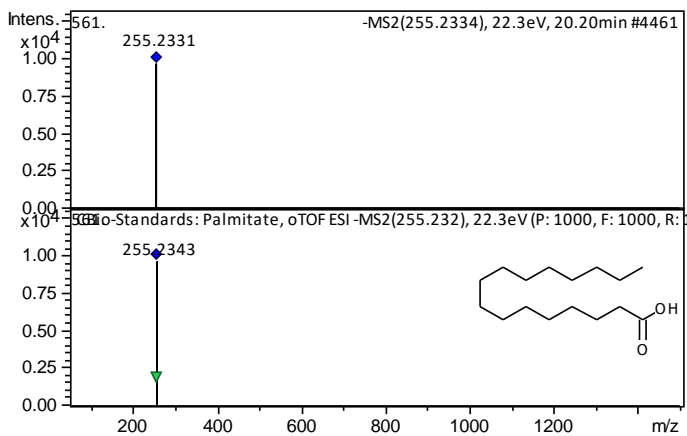
Xanthosin ST, RT, MS, MS2



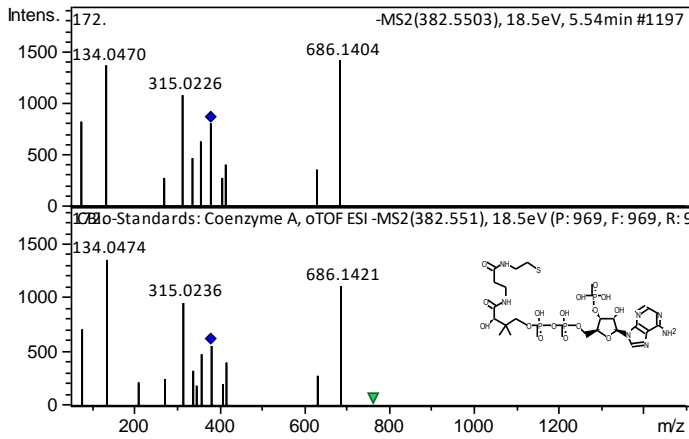
L-Phenylalanin ST, RT, MS, (MS2)



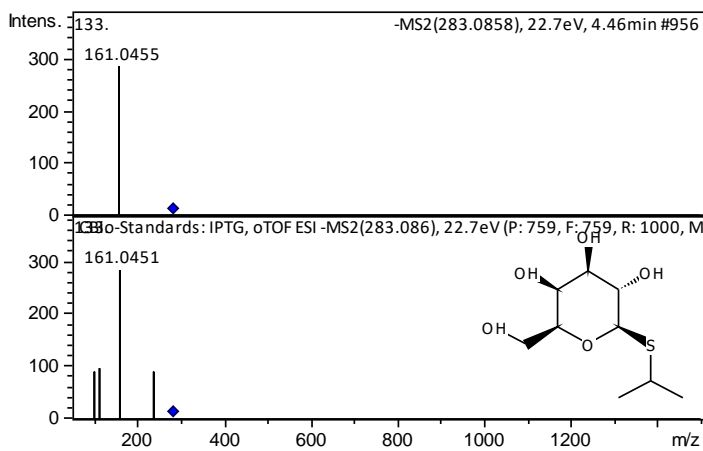
Glutathion ST, RT, MS, MS2



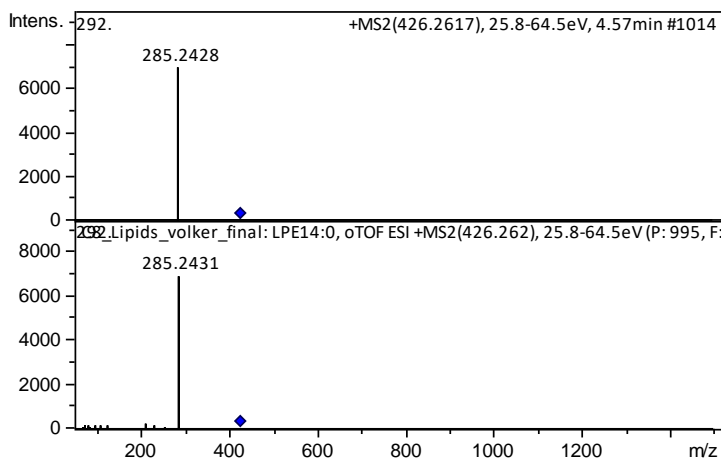
Palmitat ST, RT, MS



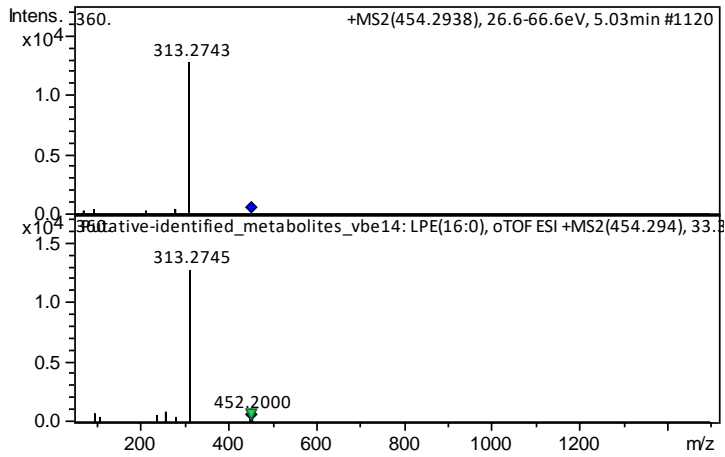
CoA ST, RT, MS, MS2



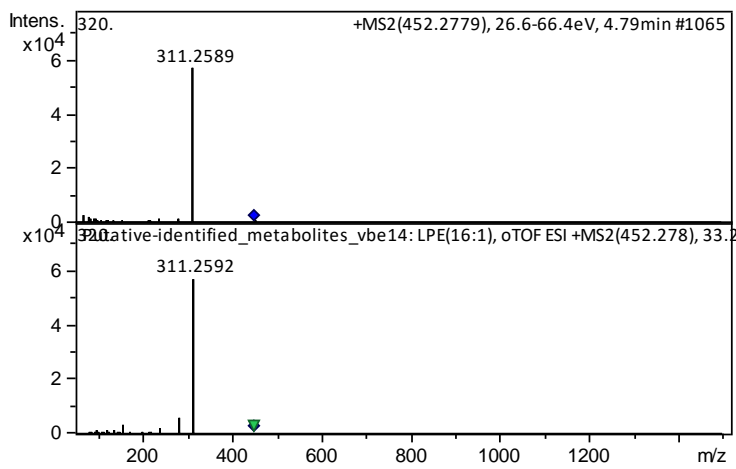
IPTG ST, RT, MS, MS2



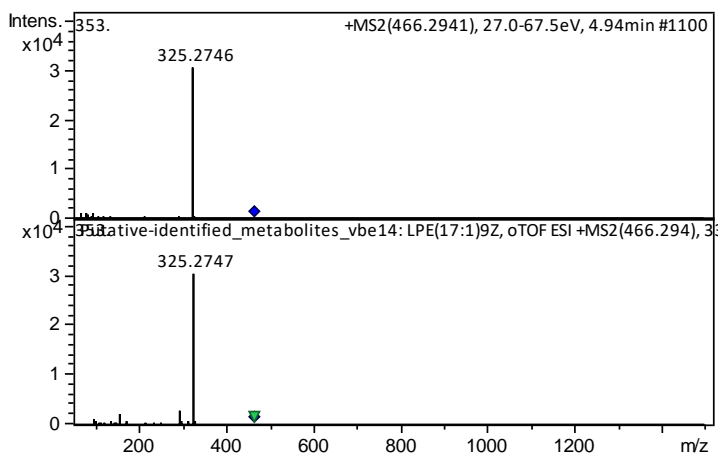
LPE14:0 MS/MS2



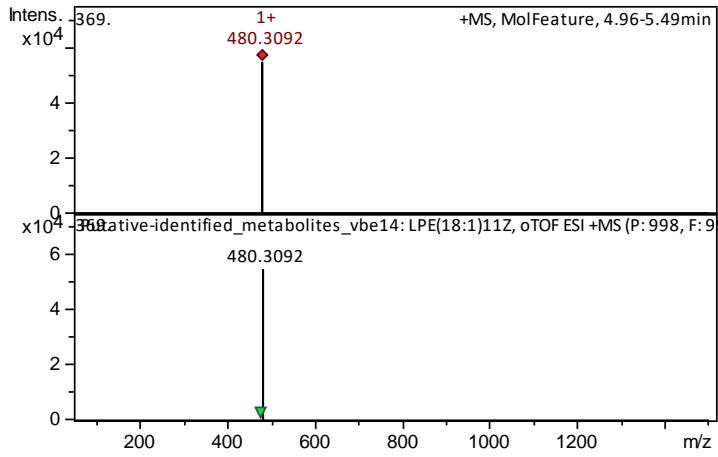
LPE16:0 MS/MS2



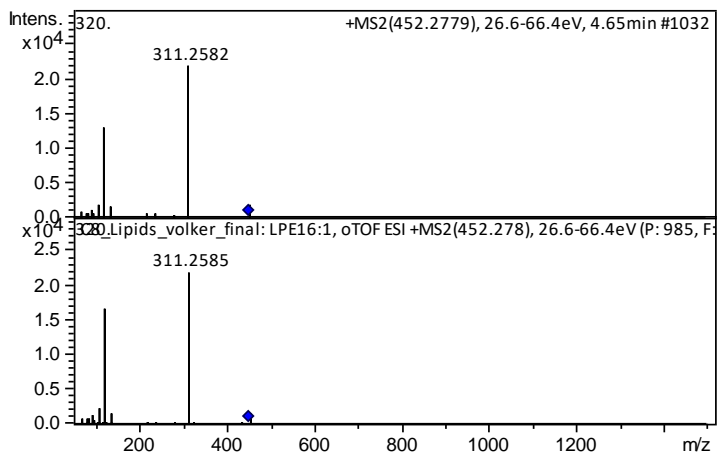
LPE16:1 MS/MS2



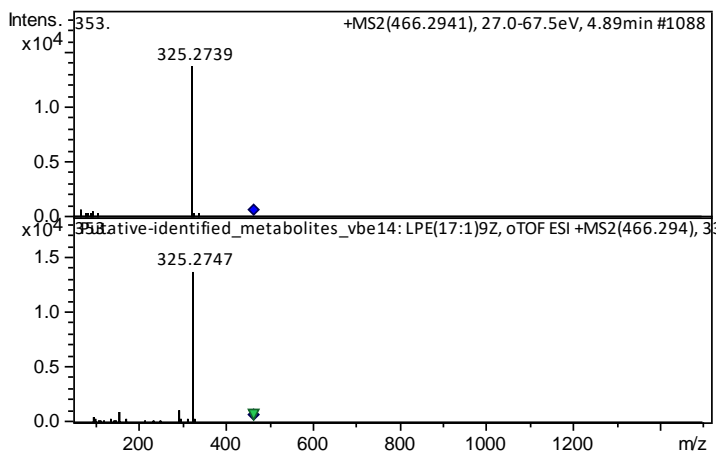
LPE17:0cyc MS/MS2



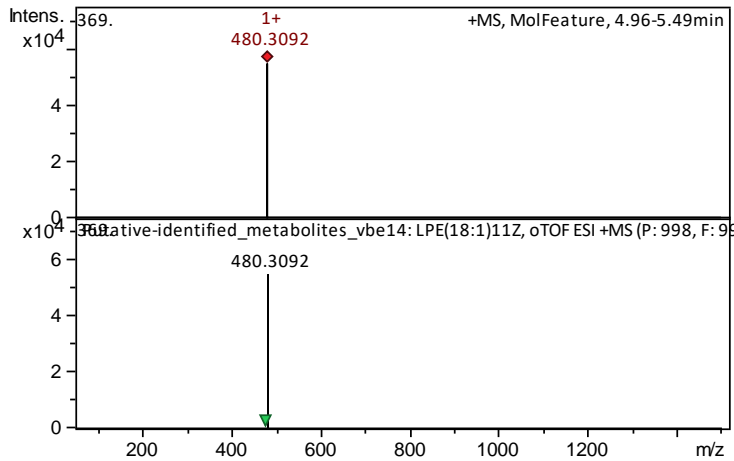
LPE18:1 MS/MS2



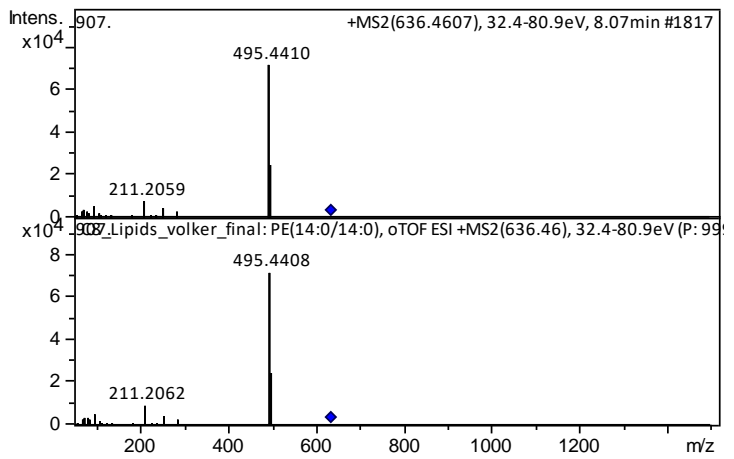
LPE16:1 MS/MS2



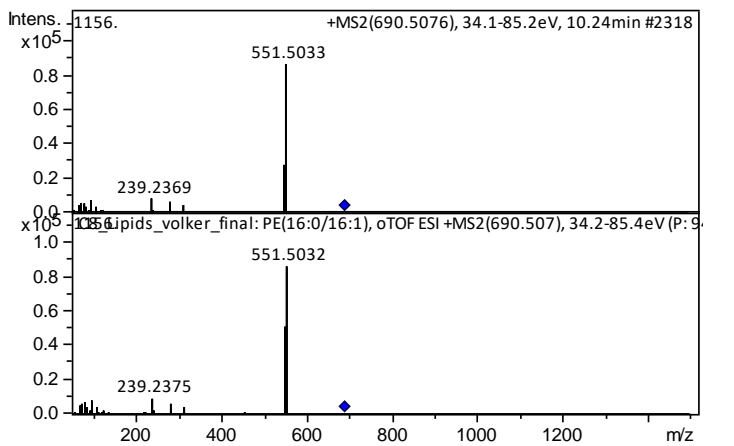
LPE17:1 MS/MS2



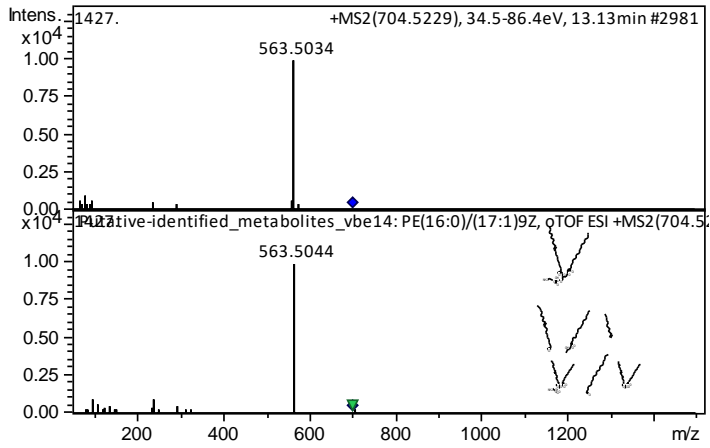
LPE18:1 MS/MS2



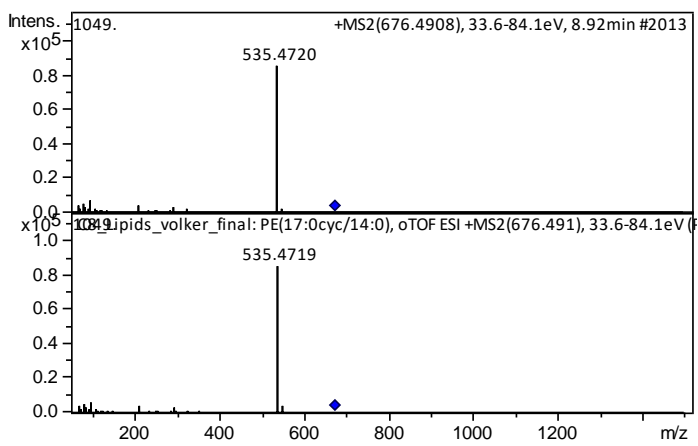
PE(14:0/14:0) MS/MS2



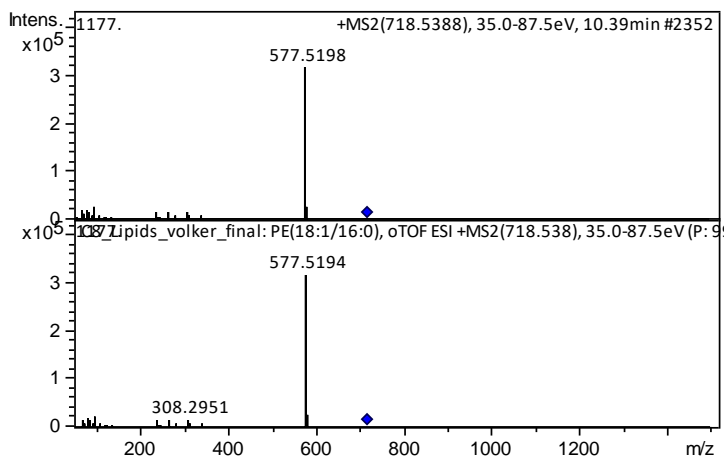
PE(16:0/16:1) MS/MS2



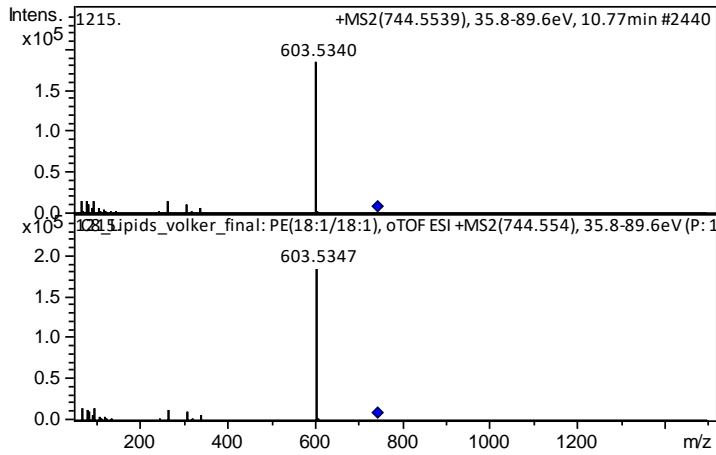
PE(16:0/17:1) MS/MS2



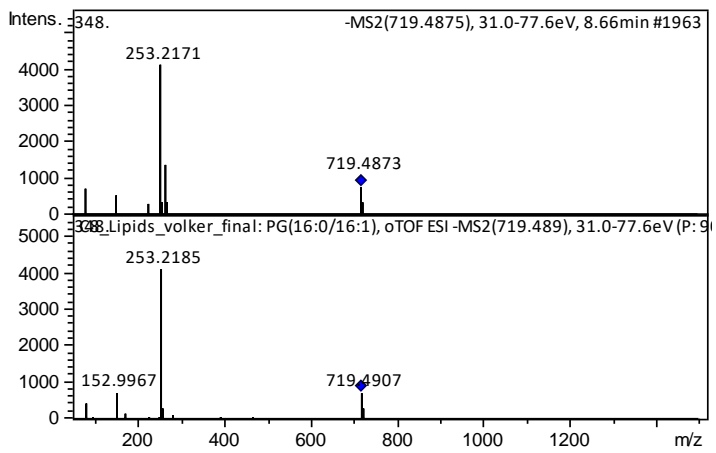
PE(17:0/14:0) cyc



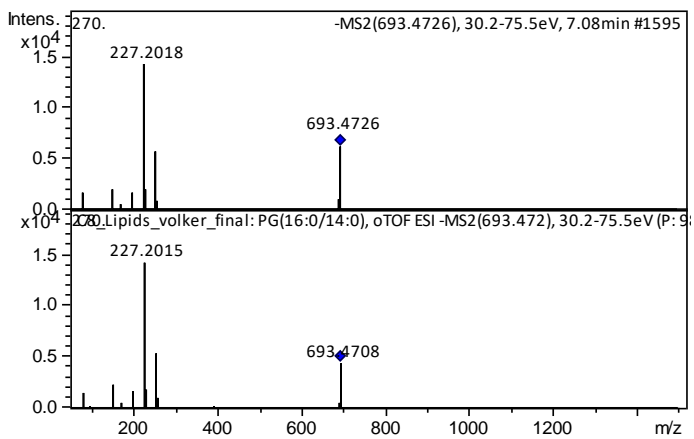
PE(18:1/16:0) MS/MS2



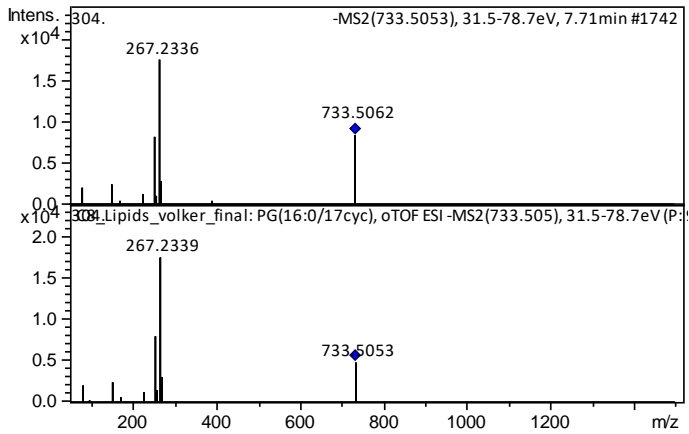
PE(18:1/18:1) MS/MS2



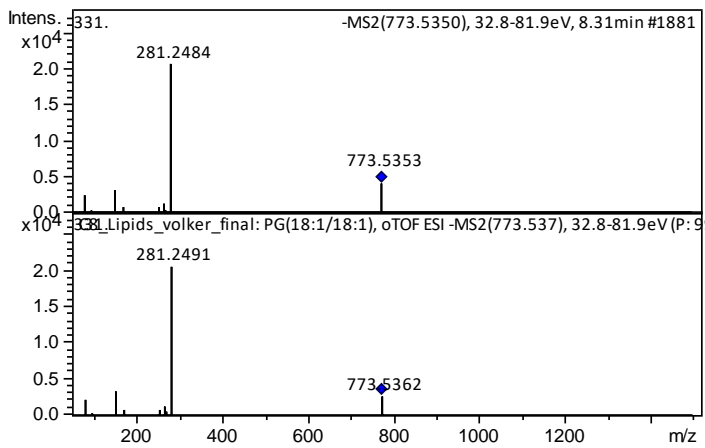
PG(16:0/16:1) MS/MS2



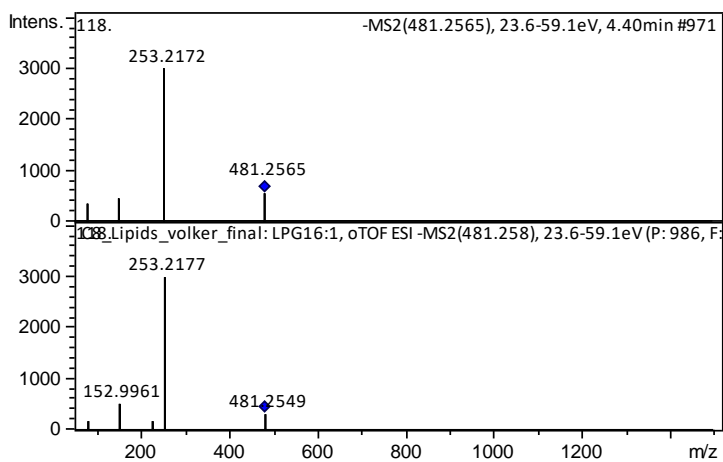
PG(16:0/14:0) MS/MS2



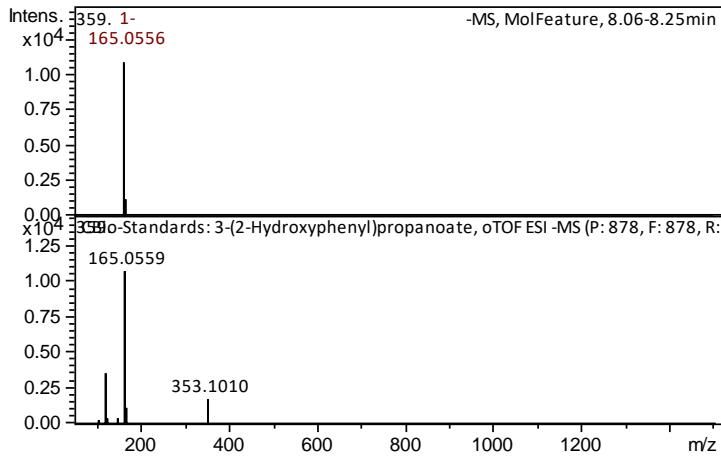
PG(16:0/17:1) MS/MS2



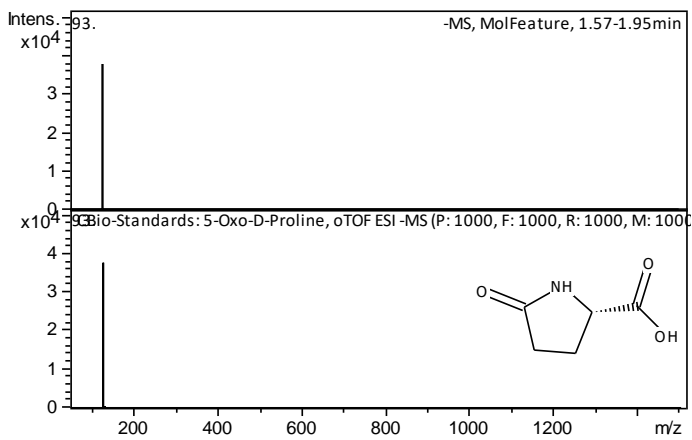
PG(18:1/18:1) MS/MS2



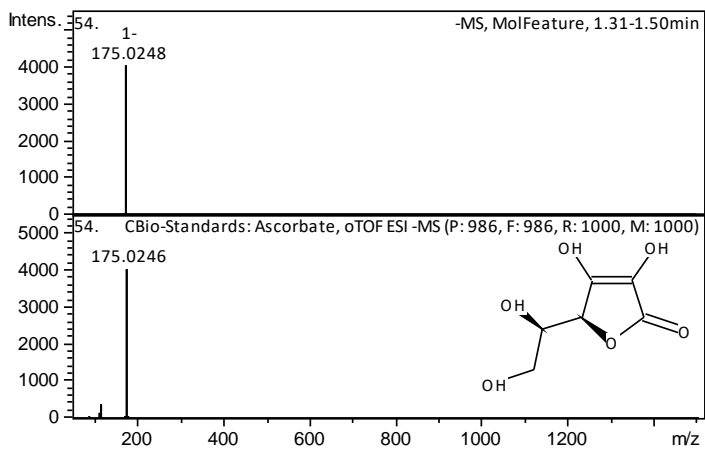
LPG(16:1) MS/MS2



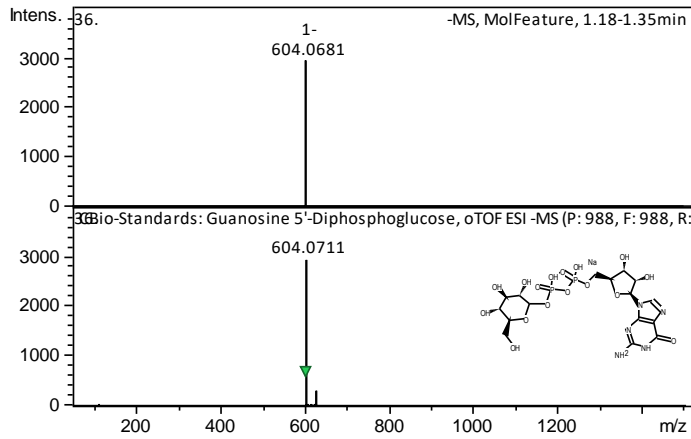
3-(2-Hydroxyphenyl)propanoate ST, RT, MS



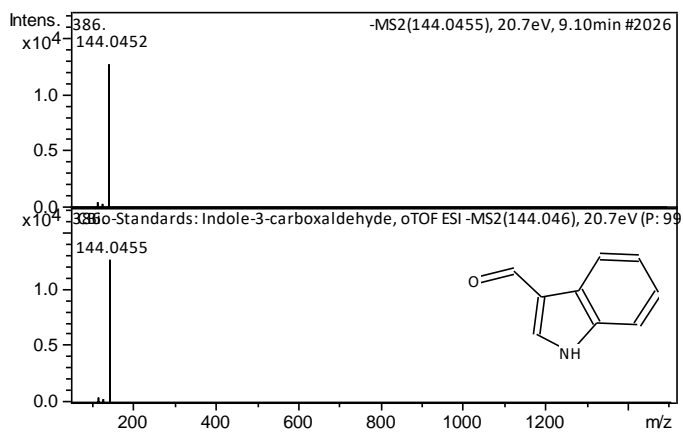
5-Oxo-D/L-Proline ST, RT, MS



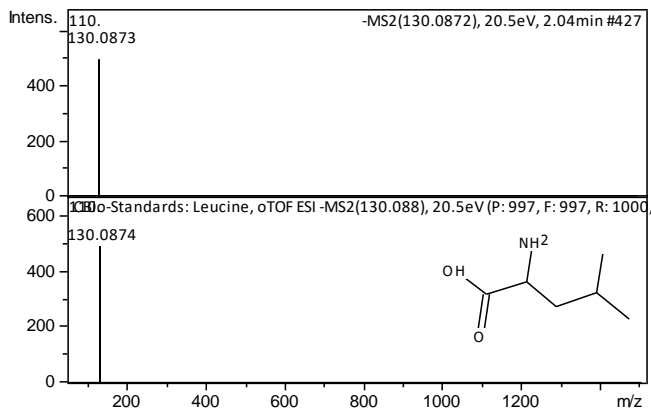
Ascorbat ST, RT, MS



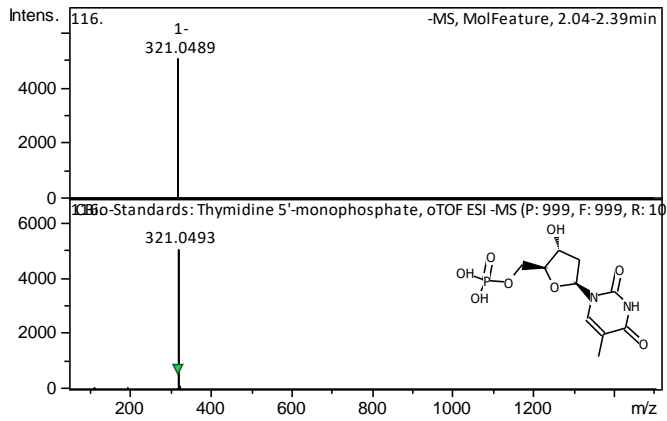
GDP-Glucose ST, RT, MS



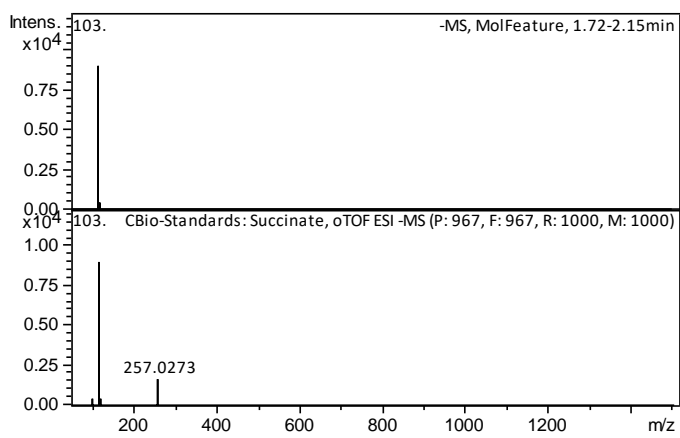
Indole-3-carboxylate ST, RT,MS



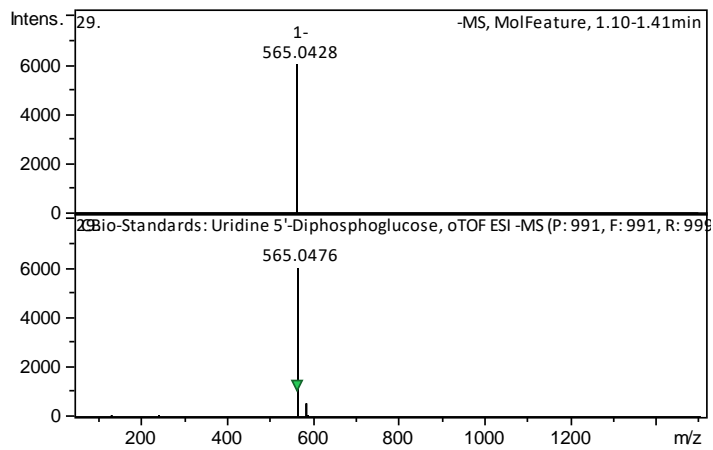
Leucin/Isoleucin (über RT differenzierbar) ST, RT, MS



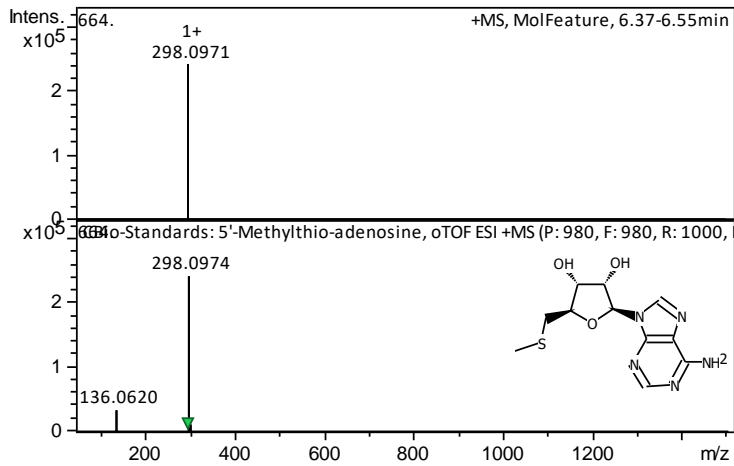
TMP ST, RT, MS



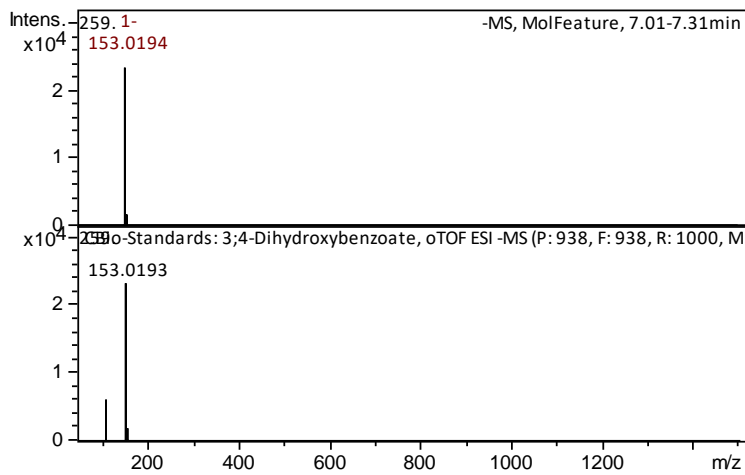
Succinat ST, RT, MS



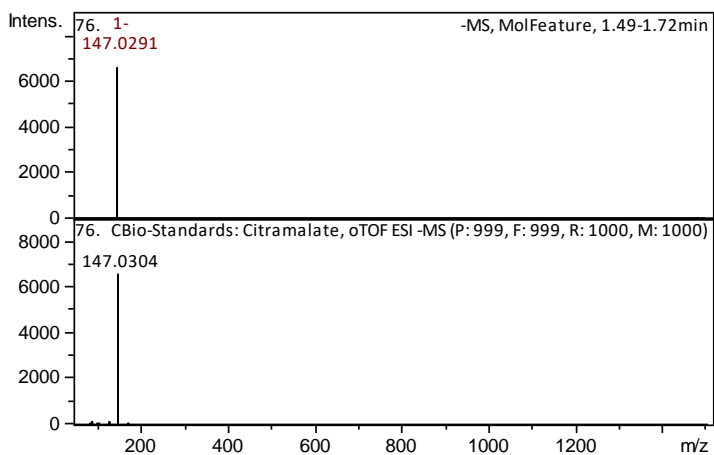
Uridine-5'-Diphosphoglucose ST, RT, MS



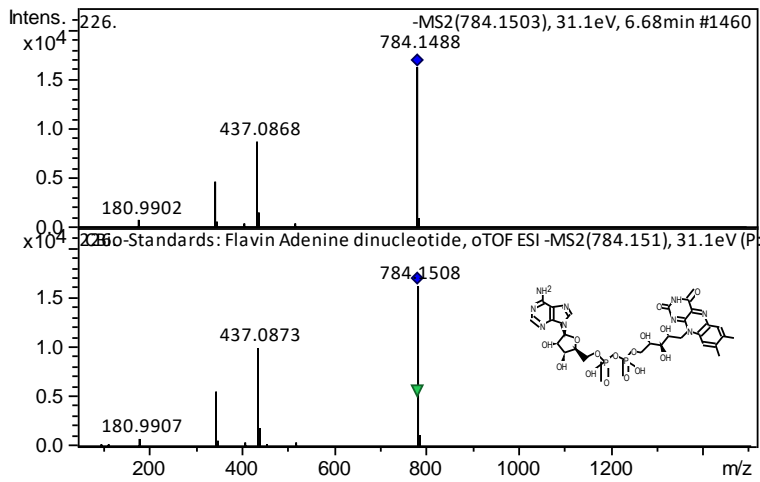
5-Methylthioadenosin ST, RT, MS



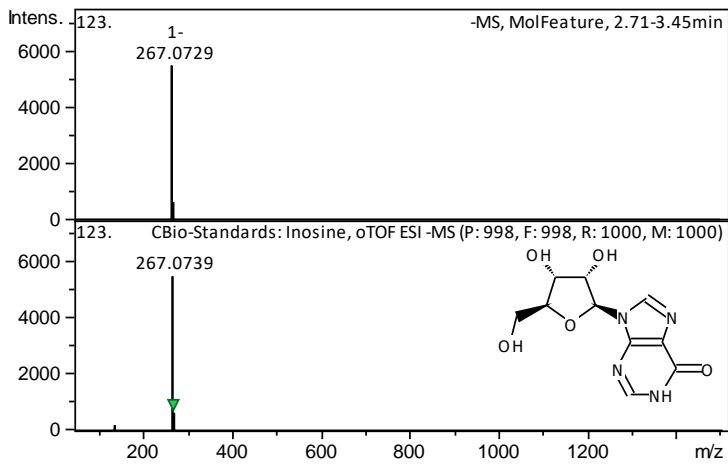
2,3 Dihydroxybenzoate ST, RT, MS



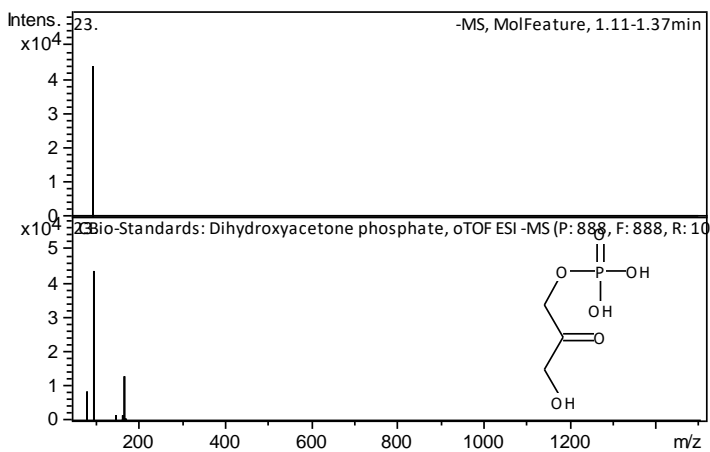
Citramalate ST, RT, MS



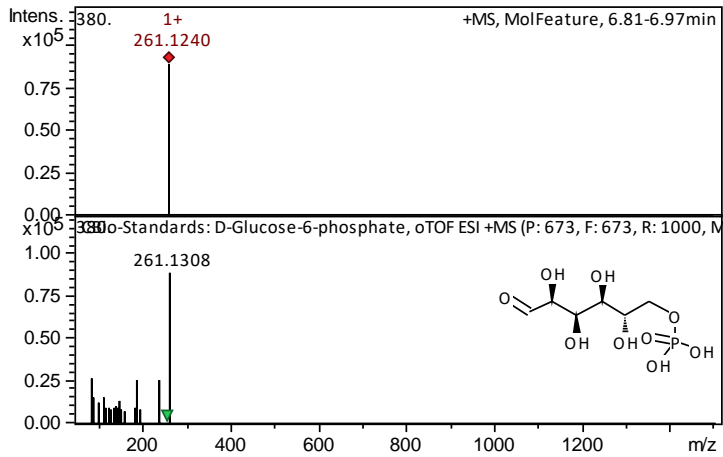
FAD ST, RT, MS



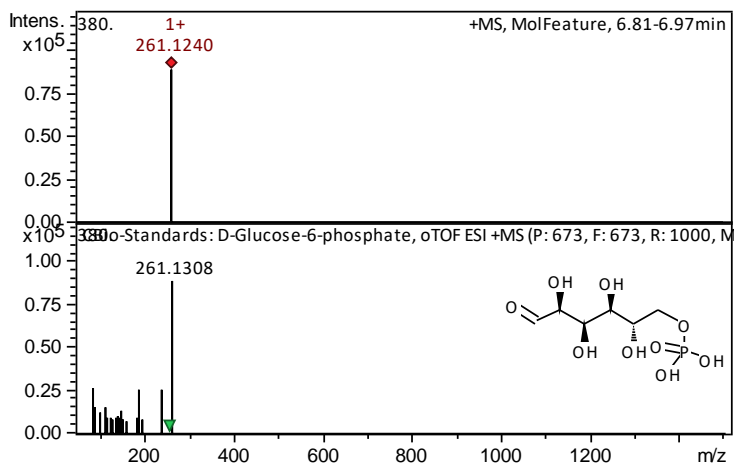
Inosine ST, RT, MS



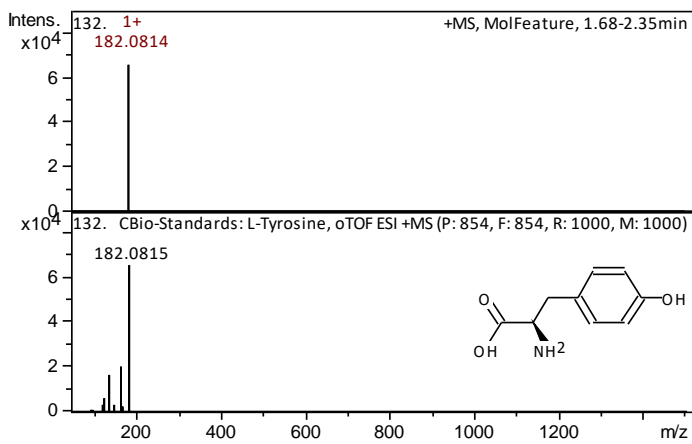
Dihydroxyacetonephosphat ST, RT, MS



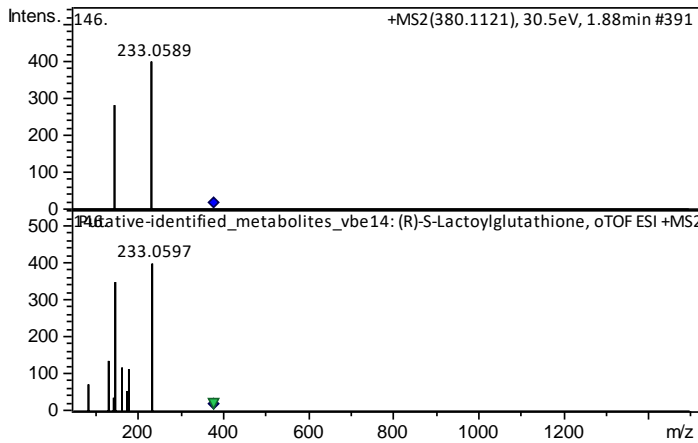
cAMP, ST, RT, MS



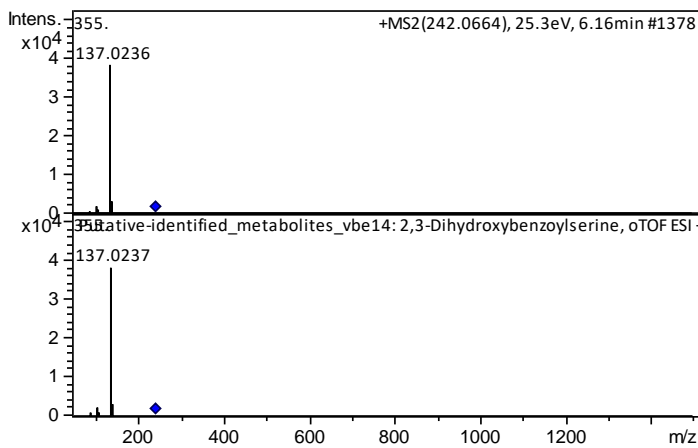
Glucose-6-Phosphat ST, RT, MS



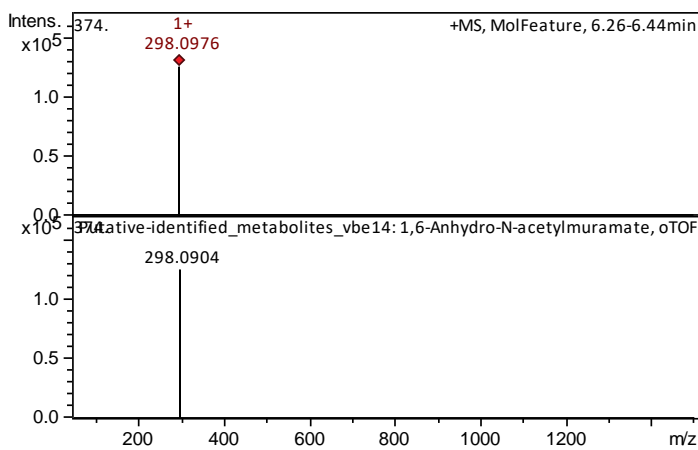
Tyrosin ST, RT, MS, MS2



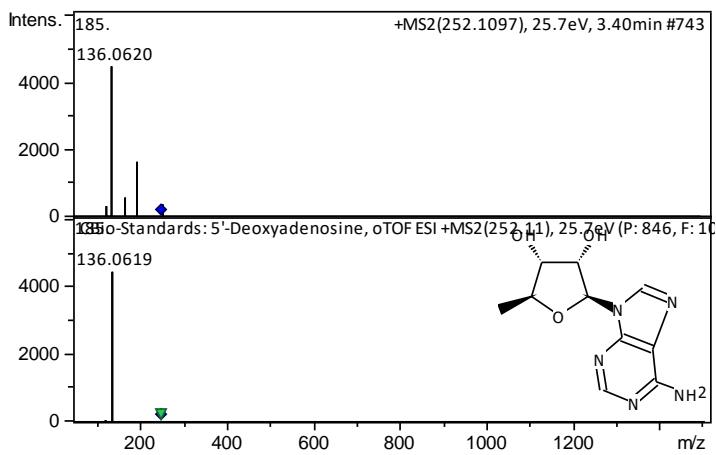
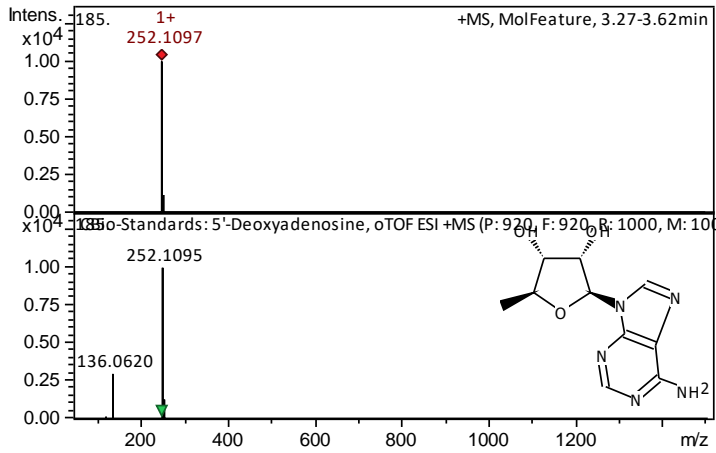
S-Lactylglutathion MS,MS2



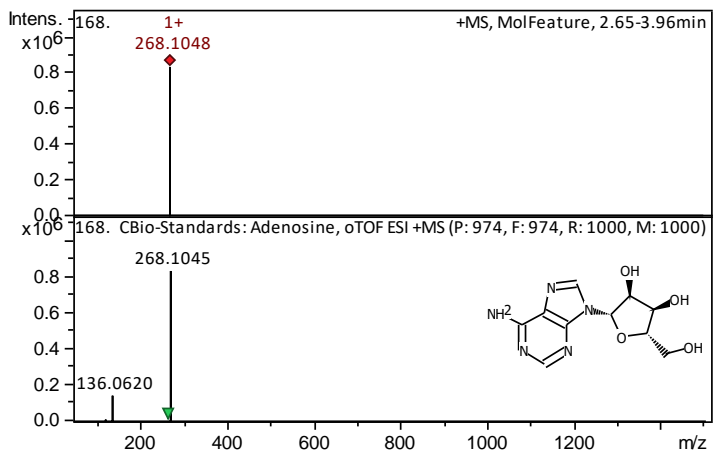
2,3 Dihydroxybenzoylserin MS/MS2



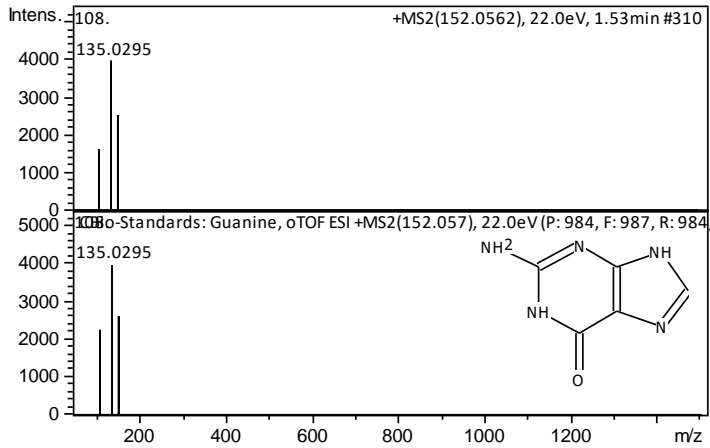
1,6 Anhydro-N-acetylmuramate MS, MS2



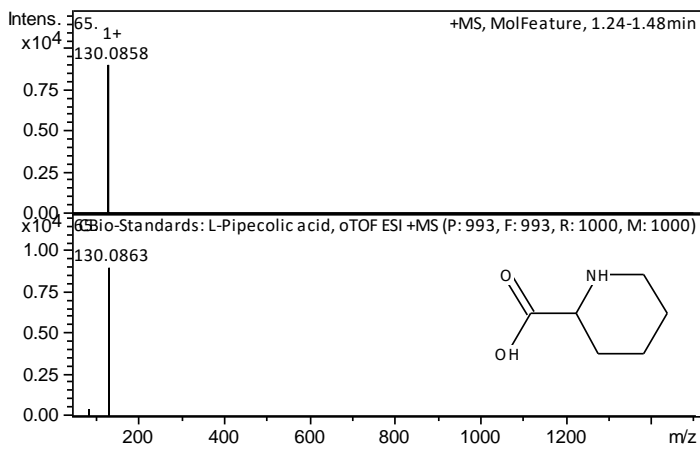
2'-Deoxyadenosin ST, RT, MS, MS2



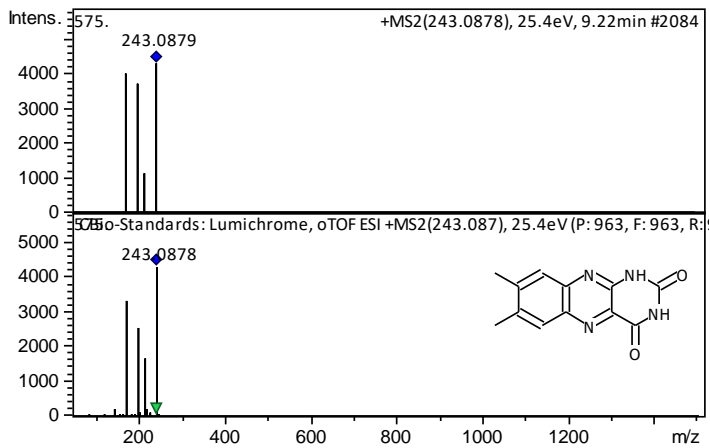
Adenosin ST, RT, MS



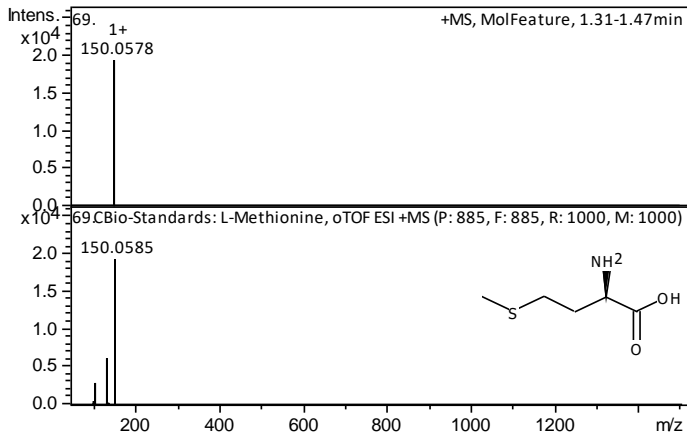
Guanin ST, ST, MS, MS2



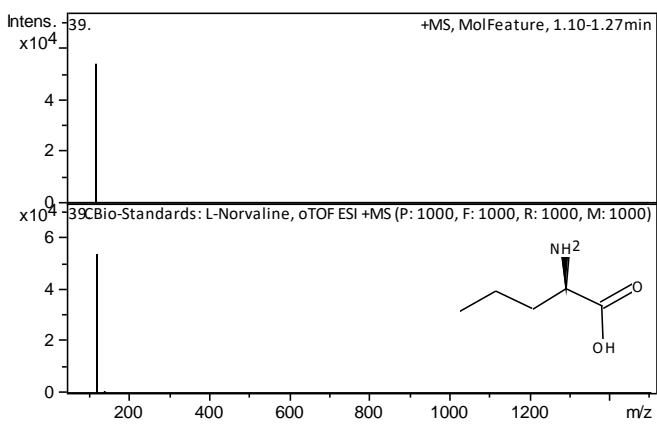
Pipecolat ST, RT, MS



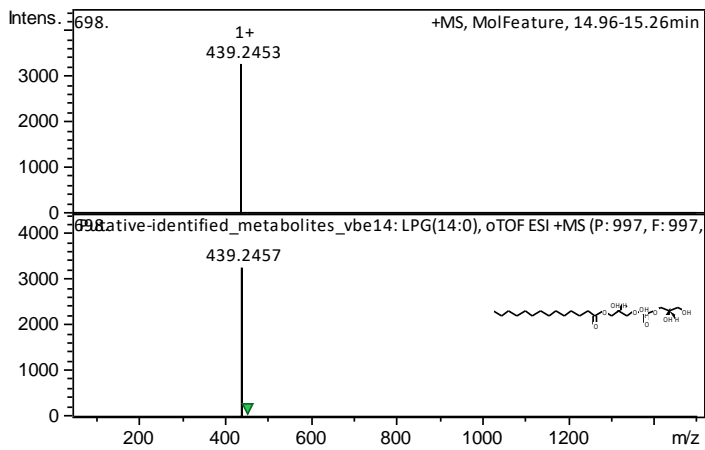
Lumichrome ST, RT; MS, MS2



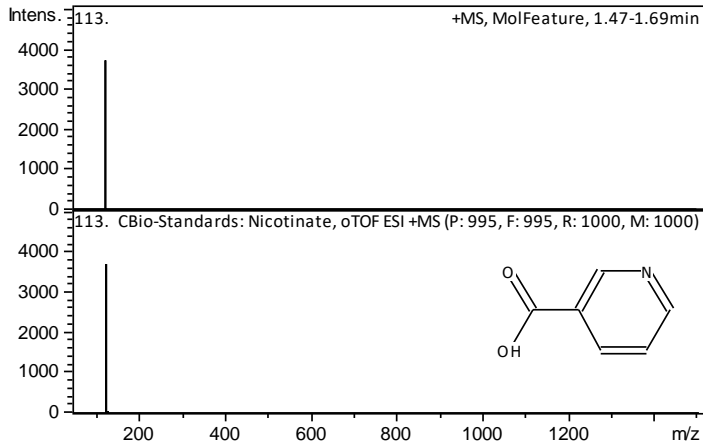
Methionin ST, RT, MS



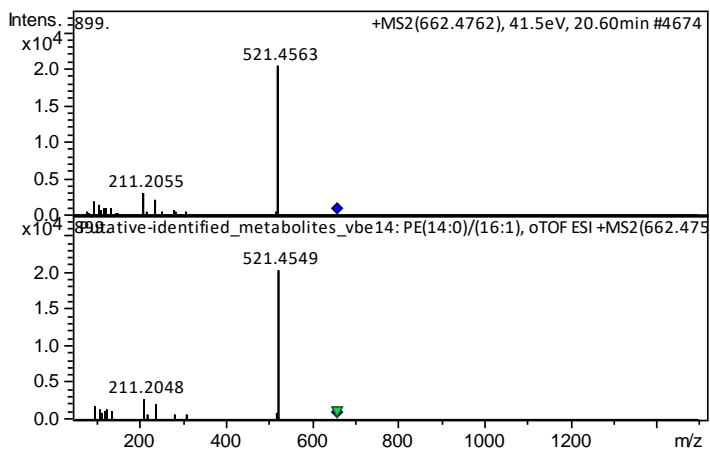
Valin ST, RT, MS



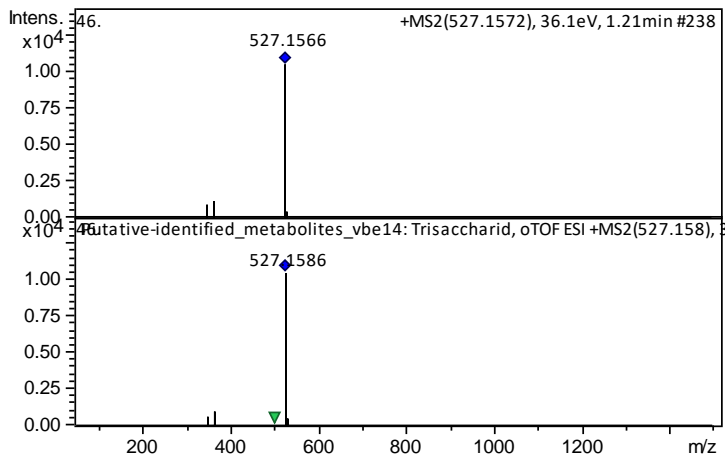
LPG(14:0) MS (MS2)



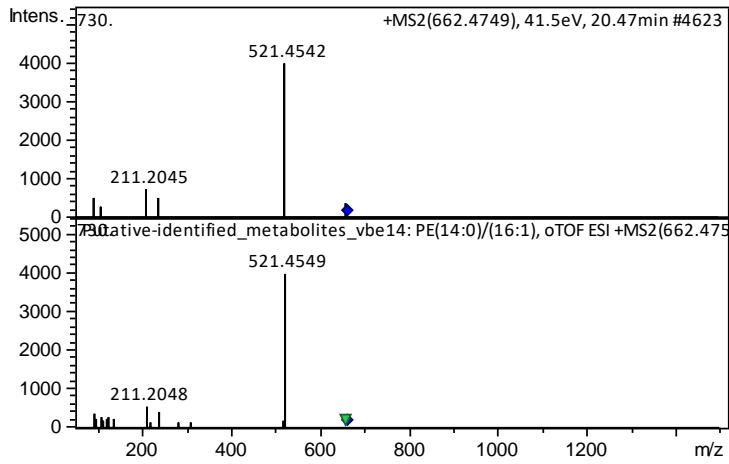
Nicotinate ST, RT, MS



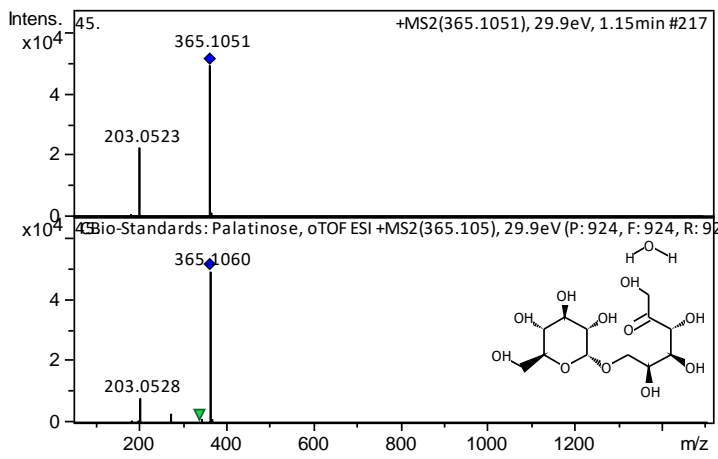
PE(16:1/14:0) MS/MS2



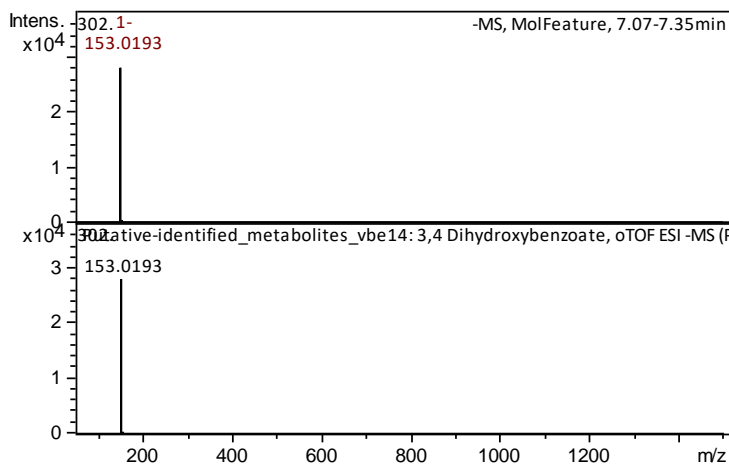
Trisaccharid MS/MS2



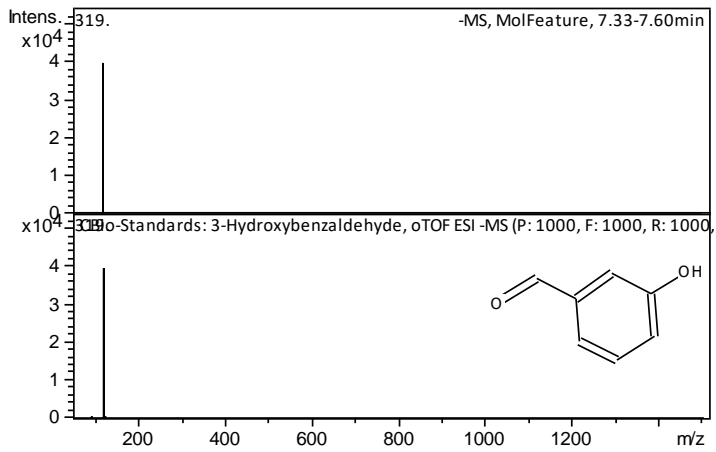
PE(16:1/14:0) MS/MS2



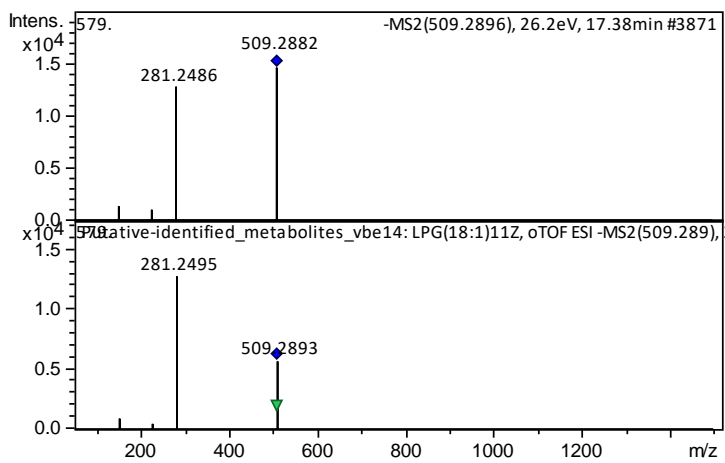
Palatinose ST, RT, MS, MS2



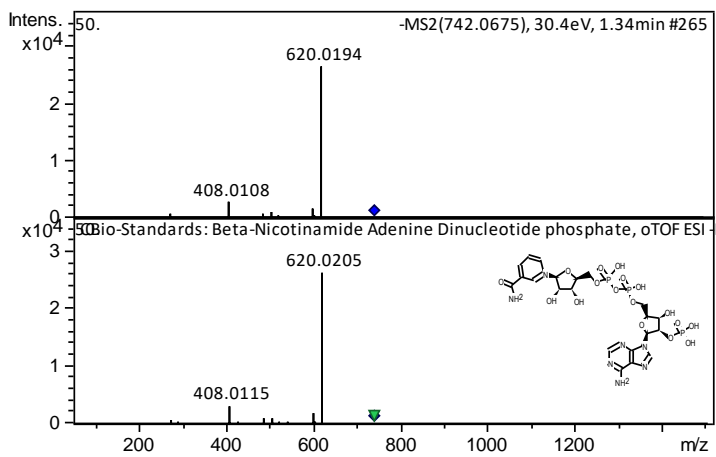
3,4 Dihydroxybenzoate ST, RT, MS



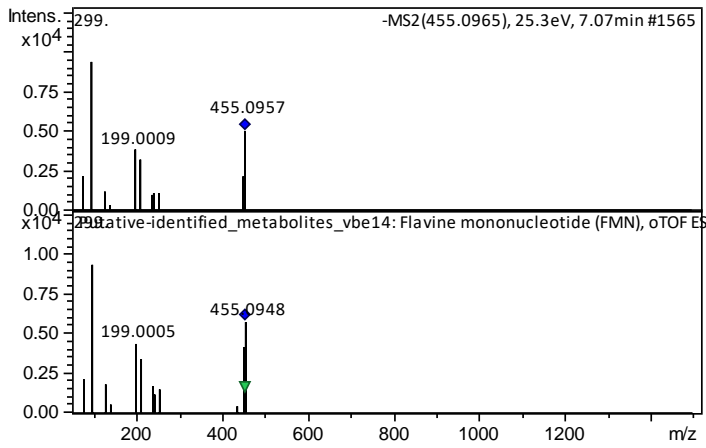
3-Hydroxybenzaldehyd ST, RT, MS



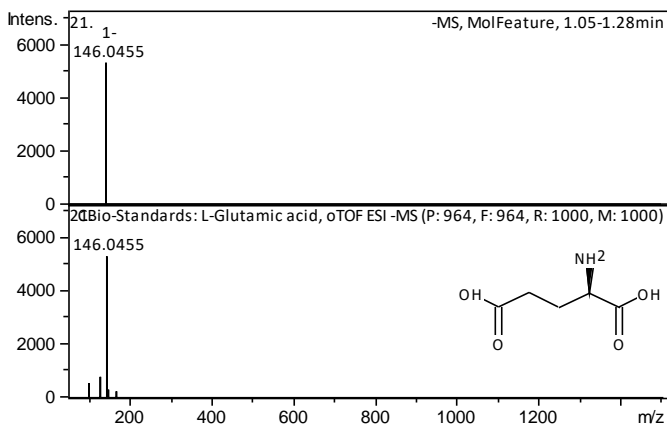
LPG(18:1) MS/MS2



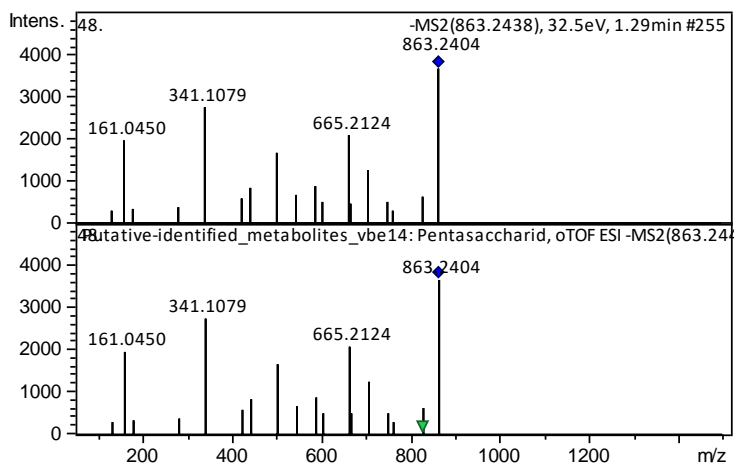
β-Nicotinamide Adenin Dinucleotid phosphate ST, RT, MS, MS2



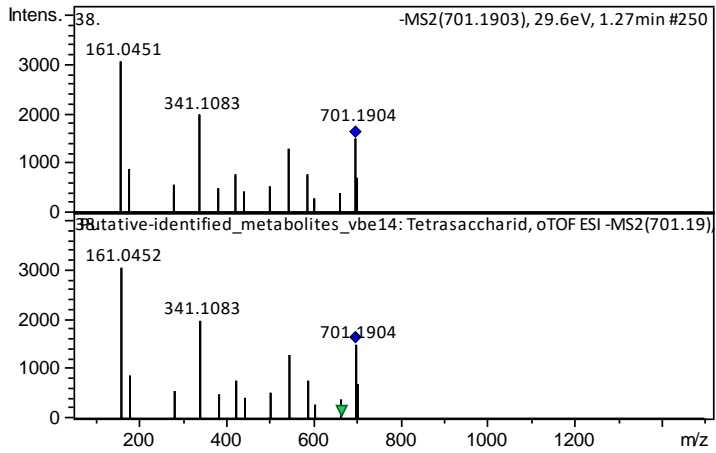
FMN ST, RT, MS, MS2



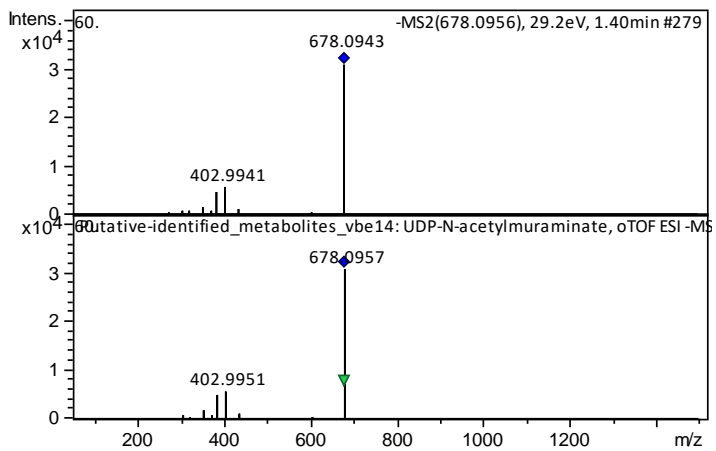
Glutamat ST, RT, MS



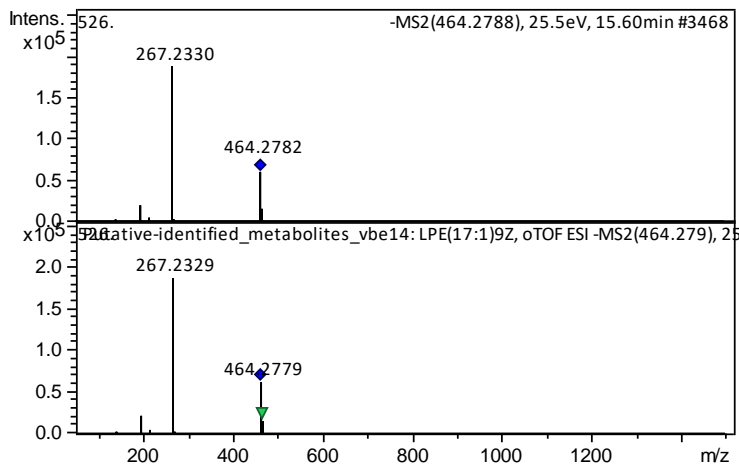
Pentasaccharid MS, MS2



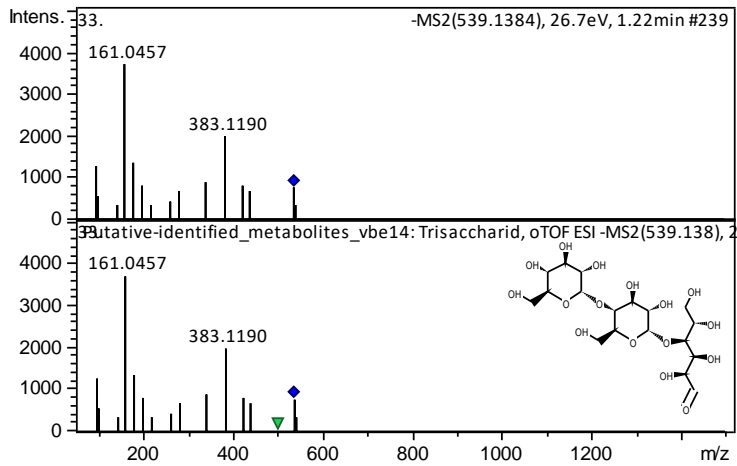
Tetrasaccharid MS/MS2



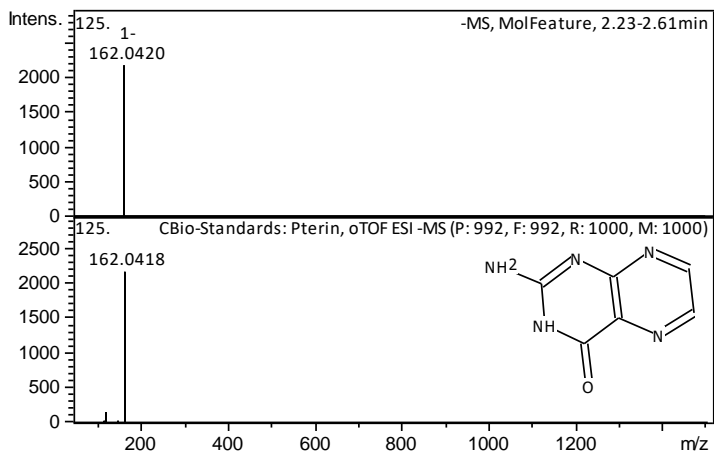
UDP-N-acetylmuraminate MS/MS2



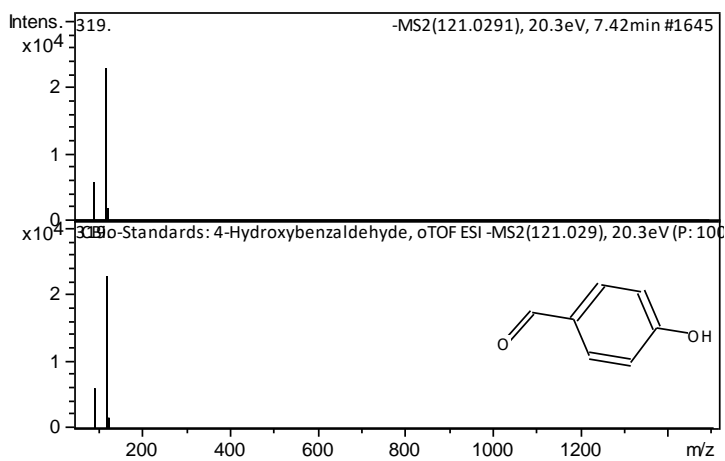
LPE(17:1) MS/MS2



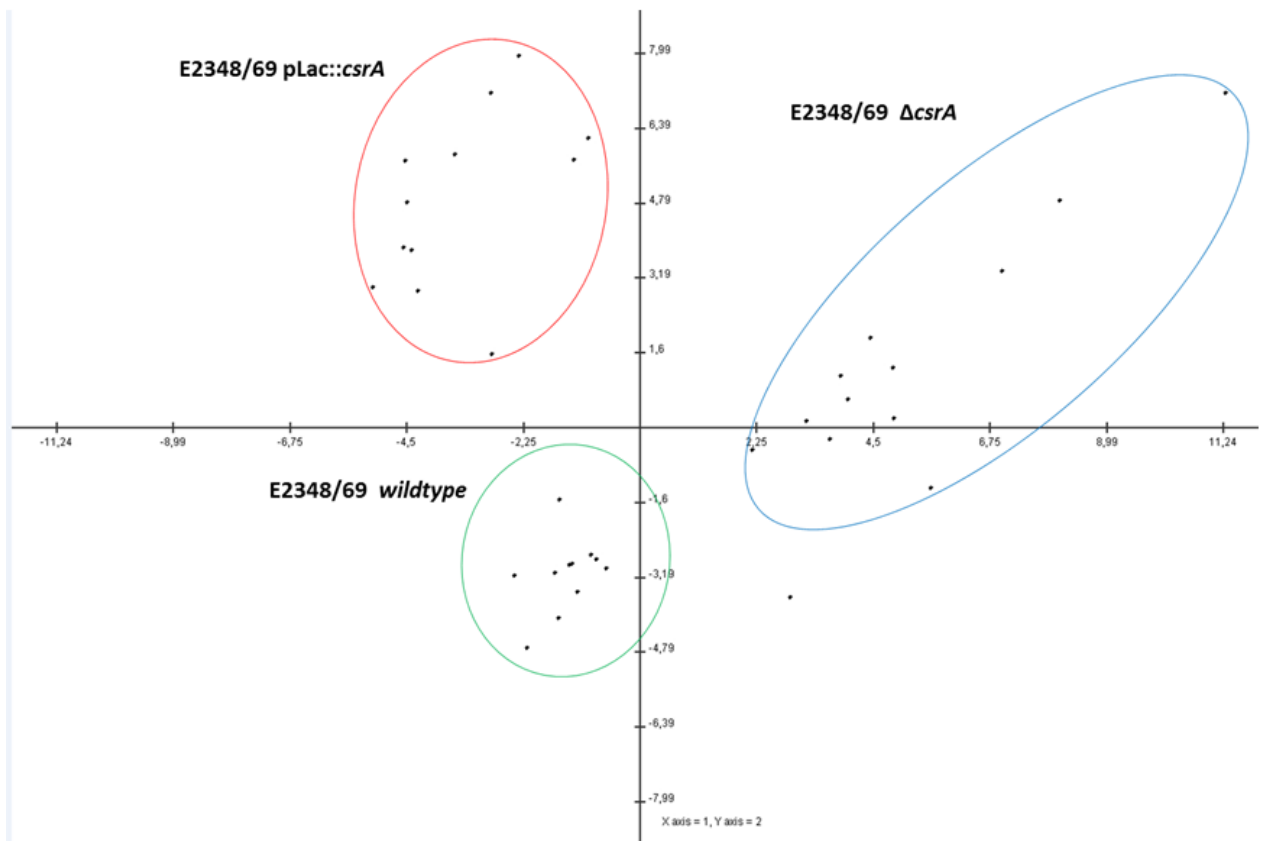
Trisaccharid MS/MS2



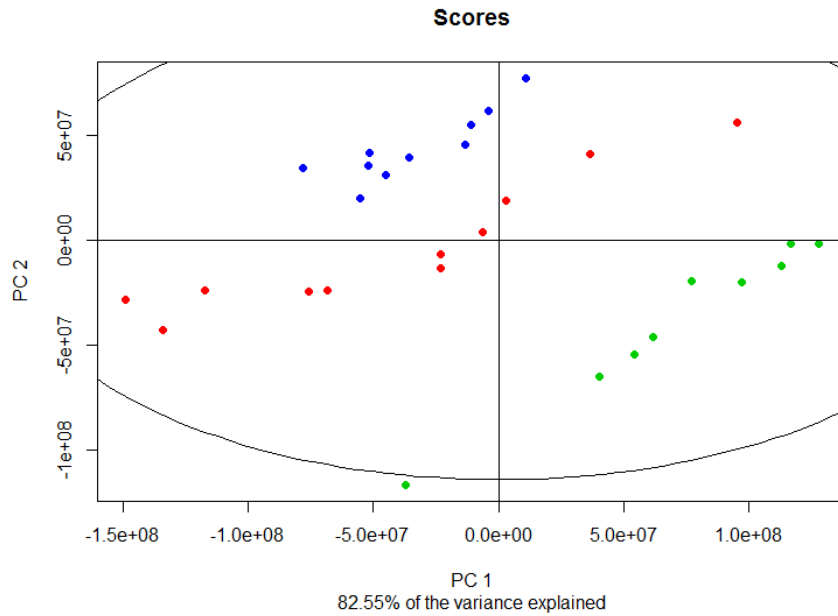
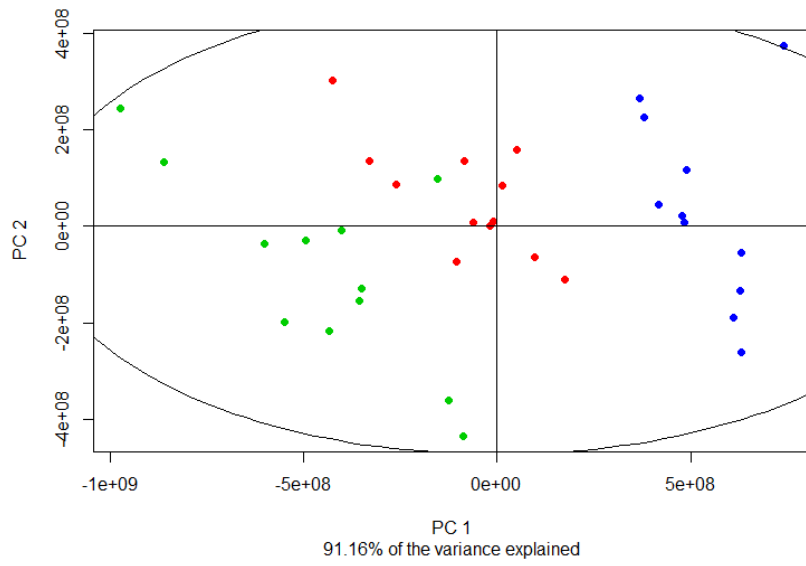
Pterin ST, RT, MS



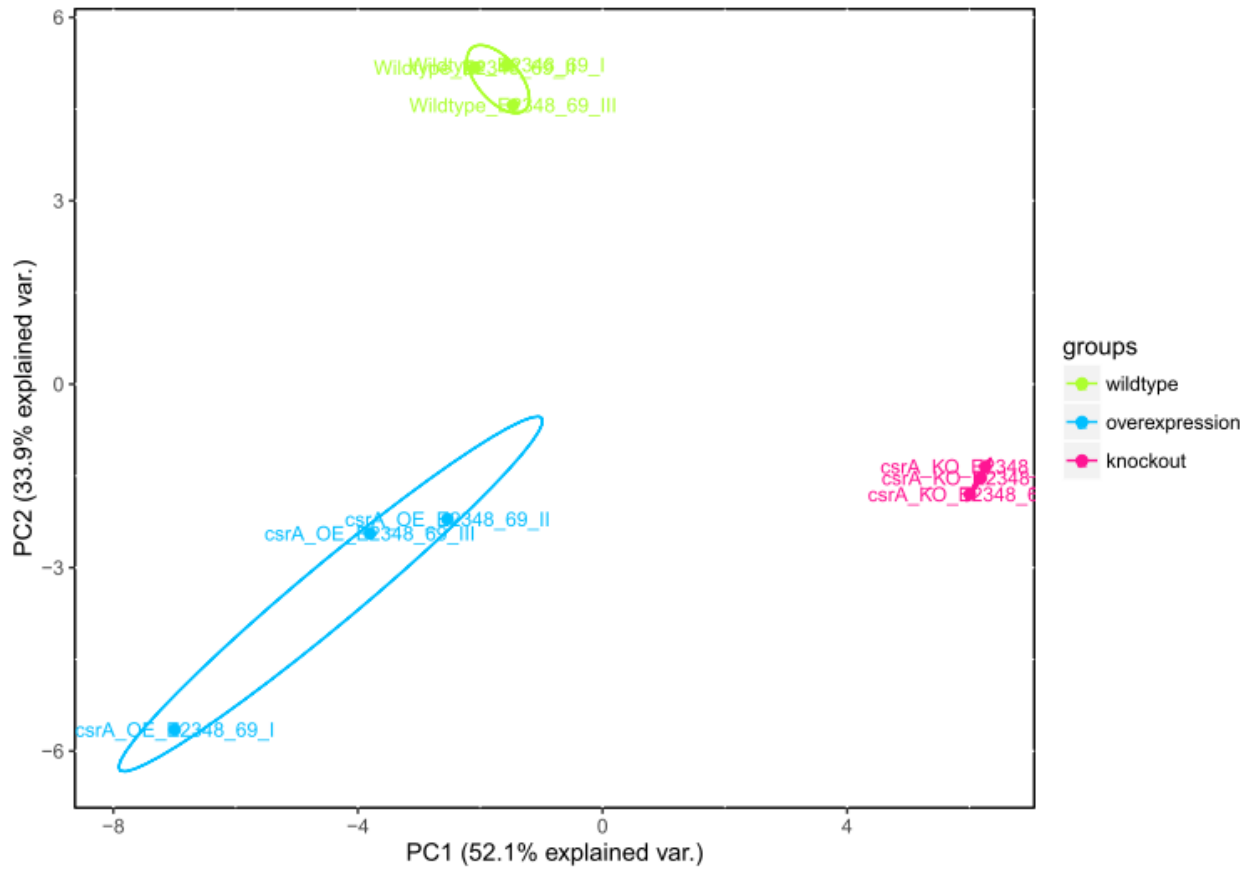
4-Hydroxybenzaldehyd ST, RT, MS

XIII. GC PCA Plot Polare Samples

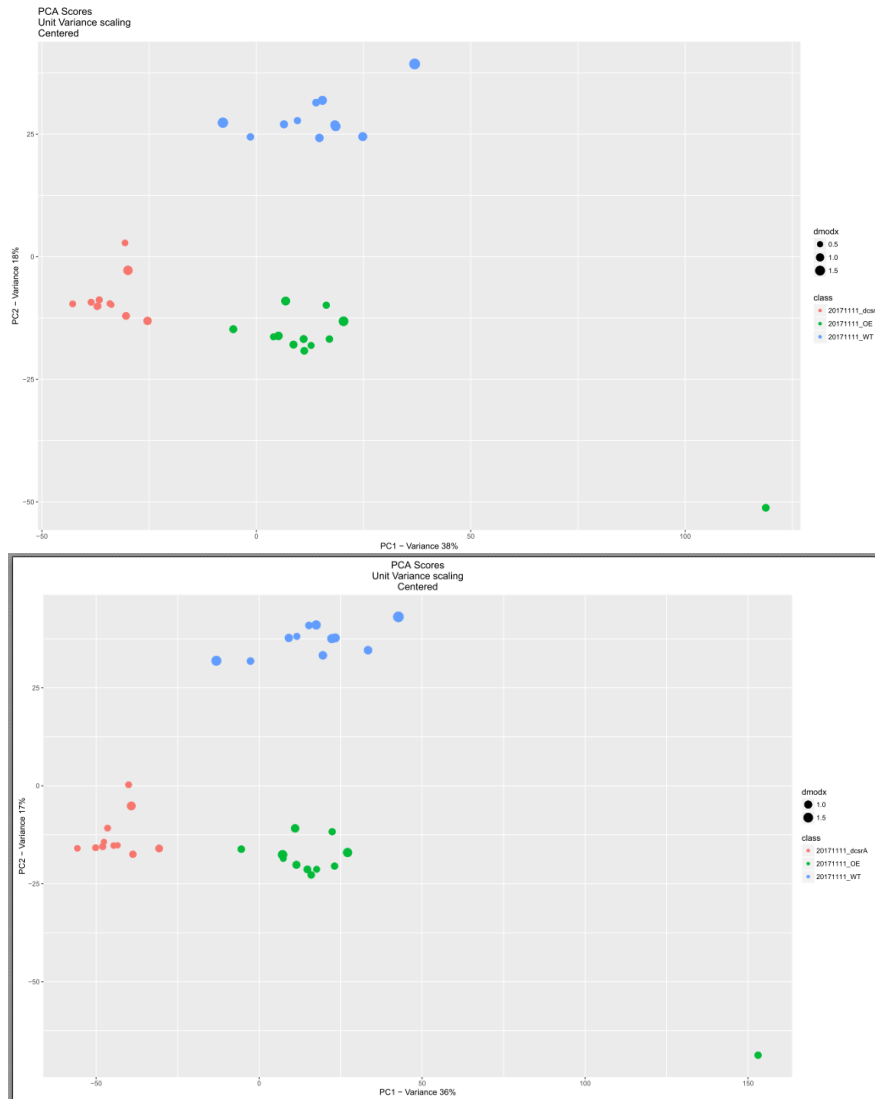
XIV. PCA Polare Extraktion Positive und Negative Modus Scores



Method: bayesian PCA
nPcs=10; 5 % missing values

XV. Transkriptom PCA Plot (Michael Beckstette)PCA of scaled and centered *r*/*log* transformed counts.

XVI. PCA Unpolare Extraktion Positive und Negative Modus

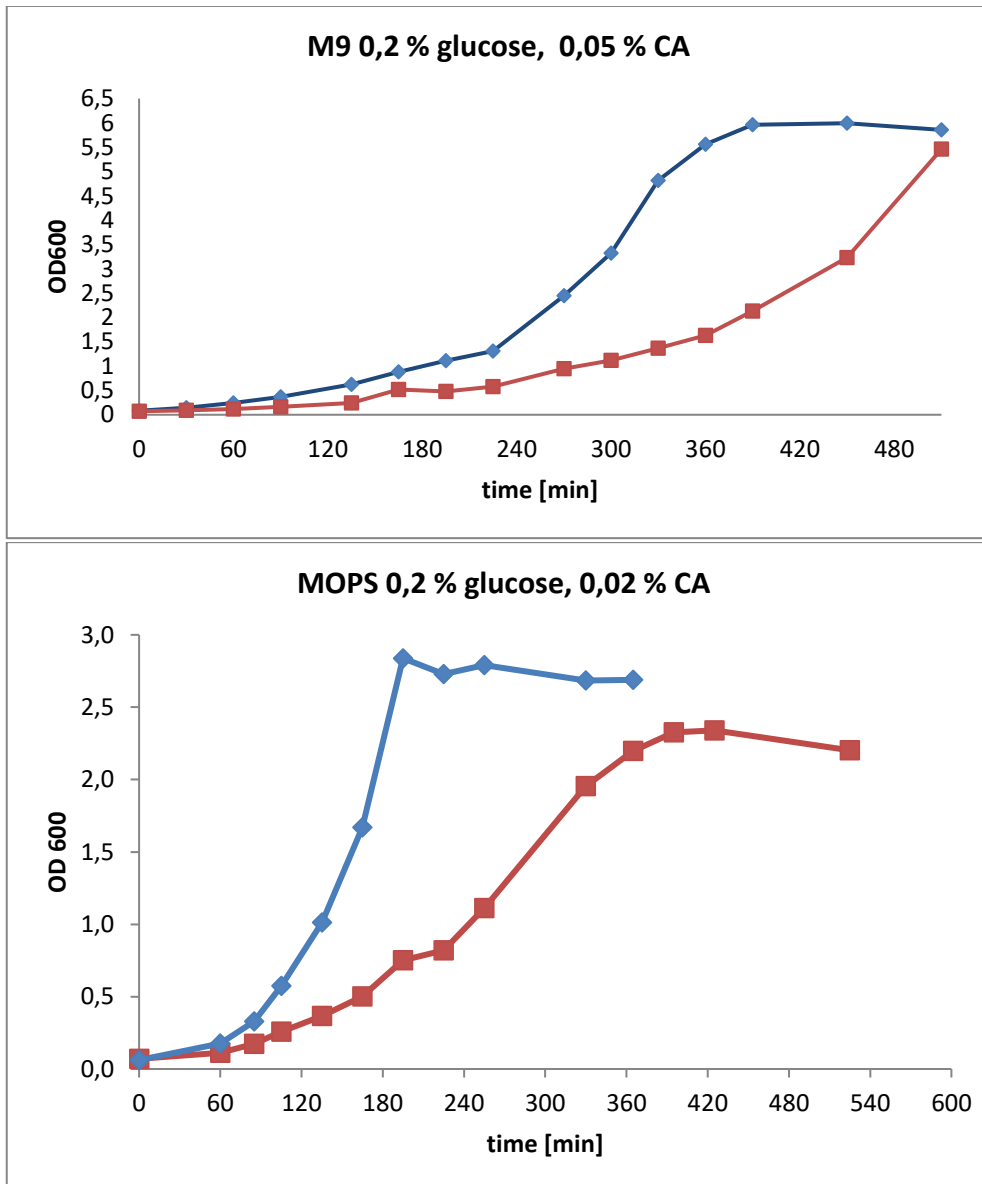


XVII. Zellgröße des Wildtyps und der CsrA Mutante

EPEC wildtype [μm]		EPEC ΔcsrA [μm]
1,45 \pm 0,07		1,18 \pm 0,18
EPEC wt [μm]		EPEC ΔcsrA [μm]
1.51		1.12
1.55		0.98
1.56		1.06
1.49		1.12
1.38		1.52
1.41		1.56
1.55		0.98
1.38		1.04
1.38		1.14
1.35		1.02
1.42		0.98
1.38		1.2
1.51		1.42
1.45		1.51
1.38		1.55
1.39		0.98
1.50		1.12
1.42		1.06
1.46		1.02
1.38		1.14
1.38		1.21
1.42		1.08
1.45		1.52
1.51		1.06
1.55		1.04
1.34		1.25
1.62		1.43
1.38		1.25
1.42		1.08
1.51		1.12
1.38		1.02
1.34		1.28
1.38		1.32
1.42		0.95
1.51		1.23
1.55		1.12
1.54		1.06
1.52		1.12

1.42		0.98	
1.38		1.42	
1.45		1.18	Durchschnitt
0.07		0.18	Standardabweichung
Ttest	1.40E-11		

XVIII. Wachstumskurven in MOPS und M9 Medium



Blau: E2348/69 Wildtyp

Rot: $\Delta csrA$ Mutante

XIX. Acquisition Parameter Report MS

Acquisition Parameter Report			
Analysis Info		AcquisitionDate 11.11.2018 00:53:46	
AnalysisName	Z:\walker\20171110\OE2B_GE2_01_20005.d	Operator	ube
Method	hplc_100-1000_thresh-150_4hz.m	Instrument	maXis HD 1820881.21299
SampleName	OE2B		
Comment			
AcquisitionParameter			
Source			
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V
Scan End	1500 m/z	Set Charging Voltage	2000 V
		Set Corona	4000 nA
		Set Nebulizer	4.0 Bar
		Set Dry Heater	200 °C
		Set Dry Gas	9.0 l/min
		Set Divert Valve	Waste
		Set APCI Heater	200 °C
Ion Optics		TOF	
Set Funnel RF	300.0 Vpp	Set Corrector Fill	55.5 V
n/a	n/a	Set Corrector Extract	595.4 V
ISCID Energy	0.0 eV	Set Corrector Lens	8427.9 V
n/a	n/a	Set Reflector	3300.0 V
n/a	n/a	Set Decelerator	722.0 V
n/a	n/a	Set Flight Tube	12000.0 V
n/a	n/a	n/a	n/a
n/a	n/a	Set Detector TOF	1710.4 V
n/a	n/a		
n/a	n/a	Processing	
n/a	n/a	Summation	1827 x
n/a	n/a	Guessed Noise	200
n/a	n/a	Peak Width	3 pts
n/a	n/a	Average Noise	1
n/a	n/a	Guessed Average	100
n/a	n/a		
n/a	n/a	Ion Cooler	
n/a	n/a	n/a	n/a
n/a	n/a	n/a	n/a
n/a	n/a	n/a	n/a
n/a	n/a	Set Transfer Time	80.0 µs
n/a	n/a	Set PrePulseStorage Time	5.0 µs
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
Quadrupole			
Set Ion Energy (MS only)	6.0 eV		
Set Isolation Mass (MS only)	50.00 m/z		
Collision Energy	7.0 eV		
Set Collision Cell RF	300.0 Vpp		
n/a	n/a		
n/a	n/a		
MassCalibration			
TOF Calibration Version	Version 2		
TOF1 Calibration Mode	Quadratic + HPC		
TOF2 Calibration Mode	Enhanced Quadratic		

OE2B_GE2_01_20005.d

Bruker Compass DataAnalysis 4.2

printed: 05.11.2018 6:01:09

by: vbe14

Page 1 of 1

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Mark Brönstrup und meiner Doktormutter Prof. Petra Dersch danken, die es mir ermöglicht haben meine Forschungsarbeit in beiden Arbeitsgruppen durchzuführen. Auch als Mitglieder des Thesis- Komitees zusammen mit Dr. Wolf-Rainer Abraham bedanke ich mich ganz herzlich für den wichtigen Input, die Kritik und viele Ideen.

Ein großer Dank gilt meinen Kollegen aus der Metabolomics Gruppe, Tobias Depke, Mariel Garcia, Raimo Franke, Aamna Habib und Ulrike Beutling, die mir mit wertvollen Tipps und Hilfen meine Arbeit erleichtert haben. Ein großes Dankeschön auch an Heike Overwin, die für alle Probleme des Laboralltags (und des Lebens!) immer eine Lösung und ein offenes Ohr hatte!

Aditya Shekhar, Jana Krull und Yi-Hui Lai möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung und die tolle Atmosphäre bei den CBIO-Bios danken!

Nicht zu vergessen, auch die Mitglieder der CBIO Arbeitsgruppe, die uns schon verlassen haben. Vielen Dank an Dr. Hans Prochnow, Dr. Michael Hensler, Dr. Kevin Ferreira und Manuel Rodriguez. Ihr wart tolle Kollegen und gute Freunde und ihr habt mein Leben und meine Arbeit sowohl fachlich auch als menschlich erweitert!

Auch den Mitgliedern der MIBI Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung und fachliche Beratung bei allen Problemen der Mikrobiologie danken. Ich danke Vanessa Knittel, Marcel Volk, Dr. Ann-Kathrin-Heroven, Dr. Sabrina Mühlen, Dr. Michael Beckstette und Dr. Jörn Hoßmann.

Ein besonderer Dank geht auch an Prof. Manfred Rohde für die Durchführung der Elektronenmikroskopie und den tollen Bildern meiner CsrA Mutante.

Natürlich danke ich auch allen weiteren Mitgliedern von CBIO und MIBI, die ich hier nicht einzeln aufgeführt habe!

Weiterhin möchte ich besonders Raimo, Jörn, Sven-Kevin, Jana und Michael für das lesen bzw. Abschnittsweise lesen der Dissertation danken!!

Zu guter letzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft!

Lebenslauf

Lebenslauf



Persönliche Daten:

Name: Volker Berndt
Geburtsdatum/-ort: 29.11.1987 in Wittlich

Studium und Ausbildung:

08/1998 – 03/2007 Cusanus Gymnasium Wittlich
Abschluss: allg. Hochschulreife

08/2007 – 07/2009 Berufsbildende Schule Naturwissenschaften
Ludwigshafen
Abschluss: Staatl. geprüfter technischer Assistent für
Biologie (Note:

10/2009 – 08/2012 Philipps Universität Marburg
Bachelor of Science Biologie
Titel der Arbeit:
Selektion und Charakterisierung von *S. oneidensis*
ApomAB „up-motil“ Mutanten
Etablierung und Charakterisierung einer Arbitrary-PCR
zur Identifikation von Transposon-Mutanten in
S. putrefaciens CN-32
Betreuer: Dr. Kai Thormann (Universität Marburg)

10/2009 – 09/2014 Philipps Universität Marburg
Master of Science Molecular and Cellular Biology
Titel der Arbeit:
The role of Hsp70s in host cell modification of
Plasmodium falciparum

Betreuer: Prof. Jude Przyborski (Universität Marburg)

01.10.2014 – heute

Promotion in der Arbeitsgruppe chemische Biologie
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Braunschweig
(Prof. Mark Brönstrup, Prof. Petra Dersch)

Volker Berndt