

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Experimentelle Untersuchung zur Rolle der angeborenen
Immunantwort und der Wirtsspezifität von
Salmonella enterica Serovaren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nicole Walk
Tierärztin aus Berlin

Berlin, 2011

Journal-Nr.: 3523

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunberg

Erster Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. vet. Lothar H. Wieler

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Hermann-Josef Rothkötter

Dritter Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Salmonella, Salmonella Typhimurium, Salmonella Dublin, Salmonella Enteritidis, cell invasion, infection, infectious diseases, pigs, mice, man, cell cultures, epithelium, macrophages, chemiluminescence immunoassays, immune response, transactivation, receptors, sequences, phylogeny, host parasite relationships

Tag der Promotion: 22. Dezember 2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-093-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden. Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Sebastian Kaulitzki - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Tsune ni shinenkofû seyo.
(Gichin Funakoshi)

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	2
2.1 Grundlagen zur Gattung <i>Salmonella</i>	2
2.1.1 Bedeutung der Gattung <i>Salmonella</i>	2
2.1.2 Taxonomie	3
2.1.3 Die Wirtsspezifität der Salmonellen.....	5
2.1.4 Ätiologie und klinische Symptomatik in den Wirten: Schwein, Maus und Mensch	7
2.1.5 Salmonelleninfektion: Pathogenese und Virulenzmechanismen	9
2.2 Immunologische Grundlagen	14
2.2.1 Das Immunsystem	14
2.2.2 Das angeborene Immunsystem	15
2.2.3 <i>Pattern Recognition Receptors</i> - PRRs	19
2.2.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	29
2.3 <i>Salmonella</i> und die immunologische Wirtsantwort	31
2.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	34
3. Material und Methoden	36
3.1 Verwendete Zelllinien	36
3.2 Zellbiologische Methoden.....	36
3.2.1 Standardzellkultur	36
3.2.2 Medien für die Zellkultur und Zellkulturmediumzusätze	36
3.2.3 Mykoplasmentest.....	37
3.2.4 Subkultivierung von Zellen	37
3.2.5 Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung.....	38
3.2.6 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	38
3.2.7 Infektionstest oder modifizierter <i>Gentamicin-Protection Assay</i>	39
3.2.8 Transiente Transfektion	40
3.2.9 Chemolumineszenz und Messung der NF- κ B-Aktivierung	43
3.3 Bakterienstämme.....	44
3.4 Mikrobiologische Methoden	45
3.4.1 Nährmedien für die Bakterienkultur	45
3.4.2 Bakterienanzucht	45
3.4.3 Bestimmung der Bakterienzahl.....	45
3.4.4 Kryokonservierung von Bakterien.....	46
3.4.5 Erstellung einer Wachstumskurve.....	46
3.4.6 Transformation von <i>E. coli</i> -Bakterien.....	46
3.4.7 UV-Inaktivierung von <i>S. Typhimurium</i> DT104	46
3.5 Mikroskopische Methoden.....	47
3.5.1 Fixierung von Zellen	47
3.5.2 Histochemische Färbung und Eindecken der Präparate.....	47
3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie	48

3.5.4	Quantitative Auswertung der Transfektionseffizienz und Invasivität von den <i>Salmonella</i> -Serovaren	48
3.6	Molekularbiologische Methoden	49
3.6.1	Isolierung von RNA	49
3.6.2	DNase-Behandlung der RNA-Proben	49
3.6.3	Reinigung der Nukleinsäure mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	49
3.6.4	Isolierung von Plasmid-DNA	50
3.6.5	Restriktionsendonukleaseverdau der Plasmid-DNA	50
3.6.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
3.6.7	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	51
3.6.8	Polymerasekettenreaktion	52
3.6.9	Agarosegelelektrophorese	53
3.6.10	Klonierung des porcinen NOD1 und NOD2 und Sequenzierung	53
3.6.11	Untersuchung der porcinen NOD1- und NOD2-Sequenz	56
3.6.12	Erstellung des porcinen NOD1 und NOD2 phylogenetischen Baumes	57
3.7	Materialien	57
3.7.1	Oligonukleotide	57
3.7.2	Plasmide	59
3.7.3	Chemikalien, Enzyme und Fluoreszenzfarbstoffe	59
3.7.4	Kits, Lösungen und Medien	60
3.7.5	Verbrauchsmaterial	60
3.7.6	Geräte	60
3.8	Statistische Methoden	62
4.	Ergebnisse	63
4.1	Ermittlung der <i>Salmonella</i> -Wachstumskurven	63
4.2	<i>Salmonella</i> -Infektionsversuch	64
4.2.1	KbE in porcinen Zellen	64
4.2.2	KbE in murinen Zellen	66
4.2.3	KbE in humanen Zellen	67
4.2.4	Berechnung der Steigung <i>m</i> aus den KbE-Kurven	69
4.2.5	Berechnung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 2h <i>p. i.</i>	71
4.2.6	Berechnung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 4h <i>p. i.</i> und 24h <i>p. i.</i>	73
4.2.7	Vergleich der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen in epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen	76
4.3	Mikroskopische Auswertung der GFP-Salmonelleninfektion	78
4.3.1	Berechnung der Anzahl intrazellulärer GFP-Salmonellen pro Einzelzelle	80
4.3.2	Darstellung der relativen Anzahl intrazellulärer GFP-Salmonellen	81
4.3.3	Darstellung der Gesamtzellzahl nach Salmonelleninfektion 4h <i>p. i.</i> und 24h <i>p. i.</i>	82
4.4	Transfektion der Zelllinien	83
4.5	Chemolumineszenzversuch (NF- κ B-Aktivierung)	84
4.5.1	RLU in porcinen Zellen	85
4.5.2	RLU in murinen Zellen	86
4.5.3	RLU in humanen Zellen	88
4.5.4	Weiterführende statistische Auswertung zum Chemolumineszenzversuch	89
4.6	Korrelation zwischen den Ergebnissen der Infektions- und Chemolumineszenzversuche	92
4.7	Nachweis der NOD-Expression	96
4.7.1	NOD-Expression in porcinen Zelllinien und porcinem Darmgewebe	96

4.7.2 NOD-Expression in murinen und humanen Zelllinien	97
4.8 Untersuchung der porcinen NOD-Sequenz	98
4.8.1 Das porcine NOD1 und NOD2 sowie die Sequenzvergleiche.....	98
4.8.2 Molekulare Phylogenie von porcinem NOD	98
4.8.3 Untersuchung der porcinen NOD1- und NOD2-Domänenstruktur	105
5. Diskussion	110
5.1 Die Rolle der <i>Salmonella</i> -Wachstumskurven	110
5.2 Die Serovare-Bedeutung und die Ergebnisse der <i>Salmonella</i> - Infektionsversuche.....	111
5.3 Die intrazellulären GFP-Salmonellen und Sifs.....	120
5.4 Welche Rolle spielen die GFP-markierten Salmonellen?.....	122
5.5 Die Bedeutung der <i>Salmonella</i> -Wirtsspezifität	130
5.6 Die NF- κ B-Aktivierung durch eine <i>Salmonella</i> -Infektion	133
5.7 Die Unterdrückung der zellulären NF- κ B-Aktivierung durch die <i>Salmonella</i> -Infektion	135
5.8 Die geringe NF- κ B-Aktivierung durch bakterielles LPS.....	136
5.9 Die Modifizierung von MAMPs um die NF- κ B-Aktivierung zu umgehen.....	138
5.10 Die Korrelation der Daten aus den Infektionsversuchen mit den NF- κ B- Aktivierungsversuchen und die Rolle des Faktors Zeit.....	140
5.11 Die NOD-Expression.....	142
5.12 Die Bedeutung des Sequenzvergleiches und Rolle des porcinen NOD	143
5.13 Salmonelleninfektion und CATERPILLER - ein wissenschaftlicher Ausblick ..	145
6. Zusammenfassung	151
7. Summary	153
Anhang	XII
Berechnete Steigung m anhand der intrazellulären Salmonellenvermehrung zwischen den Zeitpunkten 2h <i>p. i.</i> und 24h <i>p. i.</i> (THP-1s, Suspension)	XII
Berechnete Steigung m anhand der intrazellulären Salmonellenvermehrung zwischen den Zeitpunkten 4h <i>p. i.</i> und 24h <i>p. i.</i> (THP-1a und THP-1s).....	XIII
Darstellung der initialen Invasionsraten 2h <i>p. i.</i> (THP-1s, Suspension).....	XIV
Darstellung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 4h <i>p. i.</i> und 24h <i>p. i.</i> (THP-1s, Suspension).....	XV
Darstellung des Nukleotidsequenzvergleiches zwischen pNOD1 (diese Arbeit, (1)) und porcinem NOD1 (AB187219.1, (2))	XVII
Darstellung des Nukleotidsequenzvergleiches zwischen pNOD2 (diese Arbeit, (1)) und pNOD2 (AB195466.1 (2)).....	XIX
Darstellung der Sekundärstruktur des porcinen NOD1	XXI
Darstellung der Sekundärstruktur des porcinen NOD2	XXIII
Literatur	XXV
Verzeichnis eigener Publikationen.....	LXII
Danksagung	LXIII
Eidesstattliche Erklärung	LXIV

Tabellenverzeichnis

TAB. 1	EPITHELIALE REZEPTOREN FÜR DIE ANGEBORENE IMMUNITÄT	17
TAB. 2	VERWENDETE MEDIEN INKLUSIVE ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUREN.....	37
TAB. 3	ÜBERSICHT ZU EINGESÄTER ZELLMENGE UND DURCHSCHNITTLICHER ZELLMENGE NACH ERREICHTER KONFLUENZ FÜR DIE VERWENDETEN ZELLINIEN	39
TAB. 4	ÜBERSICHT ZU DEN ERMITTELTEN TRANSFEKTIONSEFFIZIENZEN IM 24-LOCH- ZELLKULTURPLATTENVERSUCH	42
TAB. 5	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME	44
TAB. 6	EPIFLUORESZENZMIKROSKOPÜBERSICHT ZU DEN EXZITATIONS- UND EMISSIONSMAXIMA.....	48
TAB. 7	ÜBERSICHT DER RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND ENTSPRECHENDER PUFFER.....	50
TAB. 8	REAKTIONSANSATZ FÜR DIE STANDARD-PCR	52
TAB. 9	PROGRAMMABLAUF DER STANDARD-PCR	52
TAB. 10	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE	58
TAB. 11	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN PLASMIDE	59
TAB. 12	VERGLEICH DER STEIGUNG m BEI THP-1S UND THP-1A	71
TAB. 13	VERGLEICH DER INITIALEN INVASIONSRATEN BEI THP-1S UND THP-1A	73
TAB. 14	DARSTELLUNG DER EPITHEL-MAKROPHAGEN-UNTERSCHIEDE FÜR ALLE VIER SEROVARE	77
TAB. 15	DARSTELLUNG DER KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R_s).....	92
TAB. 16	DARSTELLUNG DER KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R_s) FÜR 4H <i>P. I.</i> (OBEN) UND 24H <i>P. I.</i> (UNTEN)	93
TAB. 17	VERGLEICH pNOD1 (DIESE ARBEIT) MIT NOD1 ANDERER SPEZIES (TEIL 1)	99
TAB. 18	VERGLEICH pNOD1 (DIESE ARBEIT) MIT NOD1 ANDERER SPEZIES (TEIL 2)	100
TAB. 19	VERGLEICH pNOD2 (DIESE ARBEIT) MIT NOD2 ANDERER SPEZIES (TEIL1)	100
TAB. 20	VERGLEICH pNOD2 (DIESE ARBEIT) MIT NOD2 ANDERER SPEZIES (TEIL2)	101
TAB. 21	DARSTELLUNG DER MOLEKULATGENETISCHEN DISTANZEN FÜR NOD1	103
TAB. 22	DARSTELLUNG DER MOLEKULATGENETISCHEN DISTANZEN FÜR NOD2	104
TAB. 23	DARSTELLUNG VON DATEN ZUR SALMONELLENINFEKTION <i>IN VITRO</i>	116
TAB. 24	ZUSAMMENFASSUNG DER INFektionSERGEBNISSE FÜR <i>S. TYPHIMURIUM</i>	128
TAB. 25	ZUSAMMENFASSUNG DER INFektionSERGEBNISSE FÜR <i>S. CHOLERAESUIS</i>	129

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1 ÜBERSICHT ZUR TAXONOMIE DER SALMONELLEN	5
ABB. 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZELLULÄREN PATHOGENESE DER SALMONELLENINFEKTION IM TERMINALEN ILEUM.....	9
ABB. 3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SALMONELLENINFEKTION UND INTRAZELLULÄREN SIGNALTRANSDUKTION.....	11
ABB. 4 ÜBERSICHT ZUR ANGEBORENEN UND ADAPTIVEN IMMUNANTWORT	14
ABB. 5 RI-ÄHNLICHE LRR-STRUKTUR (ADAPTIERT AN KAJAVA, 1998).....	22
ABB. 6 SCHEMATISCHER ÜBERBLICK DER NOD-FUNKTION.....	24
ABB. 7 SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ZUM KLASSISCHEN NF-KB-SIGNALWEG	29
ABB. 8 SCHEMATISCHER ÜBERBLICK ZUM ZEITLICHEN ABLAUF DES INFektionsVERSUCHES..	40
ABB. 9 SCHEMATISCHER ÜBERBLICK ZUM ZEITLICHEN ABLAUF DER CHEMOLUMINESZENZMESSUNG.....	43
ABB. 10 AMPLIFIZIERUNG VON PORCINEM NOD1.....	54
ABB. 11 AMPLIFIZIERUNG VON PORCINEM NOD2.....	54
ABB. 12 SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ZUR KLONIERUNG VON PORCINEM NOD2.....	55
ABB. 13 DARSTELLUNG DER ERMITTELTEN <i>SALMONELLA</i>-WACHSTUMSKURVEN IN LB-MEDIUM (A, LINKS) UND ZELLKULTURMEDIUM (B, RECHTS).....	64
ABB. 14 INFektionsVERSUCH BEI PORCINEN EPITHELIALEN ZELLEN (IPEC-J2, LINKS) UND BEI PORCINEN MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN (3D4/31, RECHTS).....	65
ABB. 15 INFektionsVERSUCH BEI MURINEN EPITHELIALEN ZELLEN (MODE-K, LINKS) UND MURINEN MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN (RAW264.7, RECHTS).....	67
ABB. 16 INFektionsVERSUCH BEI HUMANEN EPITHELIALEN ZELLEN (LoVo).....	68
ABB. 17 INFektionsVERSUCH BEI HUMANEN MAKROPHAGENÄHNLICHEN ZELLEN (THP-1) IN SUSPENSION (LINKS, THP-1s) UND ADHÄRENT (RECHTS, THP-1A).....	69
ABB. 18 DARSTELLUNG DER STEIGUNG <i>m</i> ALS MESSWERT FÜR DIE INTRAZELLULÄRE VERMEHRUNGSRATE VON SALMONELLEN	70
ABB. 19 DARSTELLUNG DER INITIALEN INVASIONSRATEN 2H <i>P. I.</i>.....	72
ABB. 20 DARSTELLUNG DER INFektionsRATEN IN EPITHELIALEN (OBEN) UND MAKROPHAGENÄHNLICHEN (UNTEN) ZELLEN NACH 4H <i>P. I.</i>.....	74
ABB. 21 DARSTELLUNG DER INFektionsRATEN IN EPITHELIALEN (OBEN) UND MAKROPHAGENÄHNLICHEN (UNTEN) ZELLEN NACH 24H <i>P. I.</i>.....	75
ABB. 22 DARSTELLUNG DER INFektionsRATEN NACH ZELLART (EPITHEL UND MAKROPHAGEN) 2H <i>P. I.</i> (LINKS) UND 24H <i>P. I.</i> (RECHTS).....	76
ABB. 23 . DARSTELLUNG DER SALMONELLENINFEKTION IN PORCINEN ZELLEN NACH 24H <i>P. I.</i>	78
ABB. 24 DARSTELLUNG DER SALMONELLENINFEKTION IN MURINEN (OBEN) UND HUMANEN ZELLEN (UNTEN) NACH 24H <i>P. I.</i>.....	79
ABB. 25 ANZAHL INTRAZELLULÄRER GFP-MARKIERTEN SALMONELLEN PRO EINZELZELLE 4H (LINKS) UND 24H <i>P. I.</i> (RECHTS)	80
ABB. 26 RELATIVE ANZAHL INFIZIERTER ZELLEN PRO GESAMTZELLZAHL FÜR DIE GFP- MARKIERTEN SEROVARE <i>S. TYPHIMURIUM</i> (LINKS) UND <i>S. CHOLERAESUIS</i> (RECHTS) ...	82
ABB. 27 GESAMTZELLZAHL PRO MIKROSKOPISCHEM SICHTFELD FÜR DIE GFP-MARKIERTEN SEROVARE <i>S. TYPHIMURIUM</i> (LINKS) UND <i>S. CHOLERAESUIS</i> (RECHTS)	83
ABB. 28 TRANSFEKTION VON PORCINEN IPEC-J2 (OBEN) UND PORCINEN 3D4/31 (UNTEN)	84
ABB. 29 DARSTELLUNG DER RELATIVEN LUCIFERASEAKTIVITÄT NACH SALMONELLENINFEKTION IN PORCINEN IPEC-J2 (LINKS) UND PORCINEN 3D4/31 (RECHTS).....	86
ABB. 30 DARSTELLUNG DER RELATIVEN LUCIFERASEAKTIVITÄT IN MURINEN MODE-K (LINKS) UND MURINEN RAW264.7 (RECHTS)	87
ABB. 31 DARSTELLUNG DER RELATIVEN LUCIFERASEAKTIVITÄT IN HUMANEN EPITHELIALEN ZELLEN (LoVo) NACH SALMONELLENINFEKTION	88
ABB. 32 DARSTELLUNG DER LUCIFERASEAKTIVIERUNG 4H <i>P. I.</i>.....	89

ABB. 33 DARSTELLUNG DER LUCIFERASEAKTIVIERUNG 24H <i>P. I.</i>	90
ABB. 34 DARSTELLUNG DER LUCIFERASEAKTIVITÄT NACH ZELLART ZUM ZEITPUNKT 4H <i>P. I.</i> (LINKS) UND 24H <i>P. I.</i> (RECHTS)	91
ABB. 35 EINFLUSS DES FAKTORS ZEIT AUF EINE SALMONELLENINFEKTION (RECHTE SEITE) ..	94
ABB. 36 DARSTELLUNG DER EXPRESSION VON PORCINEM NOD1 UND NOD2.....	96
ABB. 37 DARSTELLUNG DER EXPRESSION VON MURINEN NOD1 UND NOD2	97
ABB. 38 DARSTELLUNG DER EXPRESSION VON HUMANEM NOD1 UND NOD2	97
ABB. 39 PHYLOGENETISCHER BAUM VON NOD1 UND NOD2	102
ABB. 40 DARSTELLUNG DES AMINOSÄURESEQUENZVERGLEICHES VOM PORCINEN NOD1	106
ABB. 41 DARSTELLUNG DER ARCHITEKTUR DES NOD1-PROTEINS VON VERSCHIEDENEN SPEZIES.	107
ABB. 42 DARSTELLUNG DER ARCHITEKTUR DES NOD2-PROTEINS VON VERSCHIEDENEN SPEZIES.	108
ABB. 43 DARSTELLUNG DER PORCINEN NOD1- (OBEN) UND NOD2-AMINOSÄURESEQUENZ (UNTEN) DER LRR-DOMÄNEN	109
ABB. 44 UNTERSCHIEDE IN DER LRR-DOMÄNE VON PORCINEM NOD1 UND HUMANEM NOD1	109
ABB. 45 DARSTELLUNG DER STEIGUNG <i>M</i> ALS MESSWERT FÜR DIE INTRAZELLULÄRE VERMEHRUNGSRATE	XII
ABB. 46 DARSTELLUNG DER STEIGUNG <i>M</i> ALS MESSWERT FÜR DIE INTRAZELLULÄRE VERMEHRUNGSRATE (THP-1A (OBEN) UND THP-1s (UNTEN))	XIII
ABB. 47 DARSTELLUNG DER INITIALEN INVASIONSRATEN 2H <i>P. I.</i>.....	XIV
ABB. 48 DARSTELLUNG DER INFektionsRATEN IN EPITHELIALEN (OBEN) UND MAKROPHAGENÄHNLICHEN (UNTEN) ZELLEN NACH 4H <i>P. I.</i>.....	XV
ABB. 49 DARSTELLUNG DER INFektionsRATEN IN EPITHELIALEN (OBEN) UND MAKROPHAGENÄHNLICHEN (UNTEN) ZELLEN NACH 24H <i>P. I.</i>.....	XVI
ABB. 50 DARSTELLUNG DES NUKLEOTIDSEQUENZVERGLEICHES ZWISCHEN PNOD1 (DIESE ARBEIT, (1)) UND PORCINEM NOD1 (AB187219.1, (2)).....	XVIII
ABB. 51 DARSTELLUNG DES NUKLEOTIDSEQUENZVERGLEICHES ZWISCHEN PNOD2 (DIESE ARBEIT, (1)) UND PORCINEM NOD2 (AB195466.1 (2)).....	XX
ABB. 52 DARSTELLUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DES PORCINEN NOD1.....	XXII
ABB. 53 DARSTELLUNG DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DES PORCINEN NOD2.....	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

α (alpha)	Signifikanzniveau
aa	Aminosäure/n (<i>amino acid/s</i>)
AAMPhi	alternativ-aktivierte Makrophagen
Abb.	Abbildung
AKT	auch als Proteinkinase B (PKB) bekannt (<i>thymoma viral proto-oncogene</i>)
Amp	Ampicillin
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
AP-1	Aktivierendes Protein - 1 (<i>activating protein-1</i>)
Apaf-1	Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1 (apoptotic protease activating factor 1)
APC	antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
Arp2/3	Aktin-ähnliches Protein 2/3 (<i>actin-related protein 2 and 3</i>)
ASC	Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein (<i>apoptosis-associated speck-like protein</i>)
AT	Adenin-Thymin (Nukleinbasen)
AvrA	Avirulenz Gen/Protein A (<i>avirulence gene/protein A</i>)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGBI	Bundesgesetzblatt
BIR	Baculovirus-Inhibitor des Apoptoseproteins Wiederholungsdomäne (<i>baculovirus Inhibitor of apoptosis protein repeat</i>)
bp	Basenpaare, auch kbp = Kilo-Basenpaare
CIITA	MHC-II-Transaktivatorgen/e
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAMPhi	klassisch-aktivierte Makrophagen
Caspase	Cystein-Aspartat spezifische Protease (<i>cysteinyI-aspartate specific protease</i>)
CARD	Caspaseaktivierende und -rekrutierende Domäne (<i>caspase activating and recruitment domain</i>)
CATERPILLER	CARD (<i>caspase-recruitment domain</i>) transcription enhancer, R (<i>purine</i>)-binding, pyrin, lots of leucine repeats
CD	cluster of differentiation (Oberflächenprotein), z. B. CD80, CD86
Cdc42	Zellteilungskontroll-Protein 42 (<i>cell division control protein 42 homolog</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
C/EBP	Transkriptionsfaktor der basischen Leucin-Zipperfamilie (<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>)
CED-4	Zelltod-Protein 4 (<i>cell death protein 4</i>)
ciAPs	zelluläres Apoptose-Inhibitorprotein (<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>)
CpG-DNA	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin - DNA
CREB/ATF	Transkriptionsfaktor (<i>cAMP response element binding/activating transcription factors</i>)
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure, z. B. Meso-Diaminopimelinsäure (mDAP, γ -D-Glutamyl-meso-DAP)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, auch DNS (<i>desoxyribonucleinacid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
ERK	extrazelluläre Signal-regulierende Proteinkinase (<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>)

ET	Elektrophoretischer Typ
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
<i>ex vivo</i>	außerhalb des lebenden Gewebes/Organismus
FKS	Fetales Kälberserum
Fos	Protoonkogen, auch Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ) Osteosarcoma
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GALT	darmassoziiertes Lymphgewebe (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GC	Guanin-Cytosin (Nukleinbasen), auch G/C
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GRIM-19	Zelltod-regulierendes Gen/Protein (<i>gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19</i>)
GRO α	<i>growth-related oncogene-α</i> (Chemokin)
GTP	Guanosintriphosphat
h (vor Gennamen)	human (<i>Homo sapiens</i>), im zoologischen Sinn: vom Menschen abstammend
H ₂ O _{bidest}	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
ICAM 1	Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>), auch CD54
ICE	Caspase-1, auch IL-1-konvertierendes Enzym (<i>IL-1 converting enzyme</i>)
IFN	Interferon, z. B. IFN- γ
IfSG	Infektionsschutzgesetz
I κ B	IKK β
IKK	Inhibitor des NF- κ B-Kinase-Komplexes (z. B. IKK α , IKK β IKK γ Untereinheiten)
IL	Interleukin, z. B. IL-6
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
InvH	Invasionsgen H, auch als <i>needle complex outer membrane lipoprotein precursor</i> bekannt
<i>in vivo</i>	innerhalb des lebenden Gewebes/Organismus
IPAF	ICE-Proteasen-aktivierender Faktor, auch CARD12 (<i>ICE protease activating factor</i>)
IPEC-J2	<i>Intestinal Porcine Epithelial Cell - Jejunum 2</i>
IRAK	IL-1-rezeptorassoziierte Kinase (<i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>)
IS	Immunsystem
ISCOVE's	ISCOVE's Zellkulturmedium
IST	Insulin-Transferrin-Selenit-A
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Jun	Teil eines Transkriptionsfaktors (<i>avian sarcoma virus 17</i>), vom japanischen <i>ju-nana</i> , dies bedeutet 17
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
KbE	Kolonie bildende Einheit auch cfu (<i>colony forming units</i>)
Km	Kanamycin
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
LB	Lysogenic Broth
LPS	Lipopolysaccharid
Lpf	länglich, polares Fimbrienprotein (<i>long polar fimbriae</i>)
LRR	Leucinreiche Wiederholungsdomäne (<i>leucine-rich repeat domain</i>)
m (vor Gennamen)	murin (<i>Mus musculus</i>), im zoologischen Sinn: von der Maus abstammend
<i>m</i>	Steigung, Maß für die Steilheit einer Gerade oder Kurve
M _{rel}	relative molekulare Masse
Mal	MyD88-ähnlicher Adaptor (<i>MyD88-adaptor like</i>)
MALT	Schleimhaut-assoziiertes Lymphgewebe
MAMPs	microbial associated molecular patterns
MANOVA	multivariate Varianzanalyse

MAPK	Mitogenaktivierende Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCP	Monozyten anlockendes Protein 1 (<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MDP	Muramyldipeptide (N-Azetilmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MicA/MicB	MHC-Klasse 1-ähnliche Sequenz A/B (<i>MHC class 1 polypeptide-related sequence A/B</i>)
MIP	Makrophagenstimulierendes Entzündungsprotein (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
MODE-K	<i>Murine Duodenal Epithelial Cell - Clone K</i>
MOI	Quotient aus Anzahl der Bakterien des Inokulums und Anzahl der zu infizierenden Zellen (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MyD88	Adaptorprotein (<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>)
M-Zellen	spezialisierte Epithelzelle (<i>microfold cells</i>)
NACHT	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (<i>nucleotid-binding oligomerization domain</i>)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAIP	Neuronal-Apoptose inhibierendes Protein (<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>)
Nal	Nalidixinsäure
NALP	NACHT, LRR und PYD Domänen-enthaltende Proteine (<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i>) z. B. NALP3
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEAS	nichtessentielle Aminosäuren
NEMO	NF-κB essentieller Modulator (<i>NF-κB essential modulator</i>), auch IKKγ
NF-κB	Transkriptionsfaktor (<i>nuclear factor – kappa B</i>)
NF-IL6	Transkriptionsfaktor (<i>nuclear factor – IL6</i>)
NIK	NF-κB-indizierende Kinase
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotidbindende Oligomerisationsdomäne (<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
<i>Nramp 1</i>	natürliches Makrophagen-Resistenzprotein 1 (<i>natural resistance associated macrophage protein 1</i>)
NRL	Nukleotidbindende Domäne - Leucinreiche Wiederholungsdomäne (<i>nucleotide binding domain - leucine-rich repeats</i>)
NTPase	Nukleosid-Triphosphatase z. B. ATPase (Adenosin-Triphosphatase)
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p (vor Gennamen)	porcin (<i>Sus scrofa</i>) auch porzin; im zoologischen Sinn: zur Familie der Schweine gehörend
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PagN	PhoP-aktivierendes Gen N (<i>PhoP-activating gene N</i>)
PAI	Pathogenitätsinsel, auch PI
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pef	Plasmid-kodiertes Fimbrienprotein (<i>plasmid-encoded Fimbria</i>)
PepT	Peptidtransporter, z. B. PepT1
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan, auch Murein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PipB	Pathogenitätsinsel-kodiertes Protein B (<i>pathogenicity island encoded protein B</i>)

PKB	Proteinkinase B (auch AKT)
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PP	Peyersche Plaques
PYD	Pyrimidomäne
Rac1	Ras-ähnliches C3 Botulinumtoxin Substrat 1 (<i>rat sarcoma (Ras)-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)
RANTES	Chemokin (<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>)
RI	Ribonuklease-Inhibitor
RICK	Rezeptor-interagierende Serin/Threonin Kinase (receptor-interacting serine/threonine kinase), auch RIPK2
RLU	Relative Lumineszenzeinheiten (<i>Relative Luminescence Units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure, auch RNS (<i>ribonucleinacid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
R-Protein	Resistenzprotein
rpoS	RNA-Polymerase Sigma Faktor (<i>RNA polymerase sigma factor</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription - PCR
S.	<i>Salmonella</i>
SARB	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung B
SCAMP	<i>Salmonella</i> -induzierendes sekretorisches Trägermembranprotein (<i>Salmonella-induced secretory carrier membrane protein</i>)
SCV	<i>Salmonella</i> -containing-vacuole
S. Enteritidis	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis
ser.	Serovar
Sif/s	<i>Salmonella</i> -induzierte Filamente (<i>Salmonella</i> -induced-filaments)
Sip	<i>Salmonella</i> -Invasionsprotein, z. B. SipA
SlrP	<i>Salmonella</i> -LRR-Protein (<i>Salmonella leucine-rich repeat protein</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNX	Sortier-Nexin (<i>sorting-nexin</i>)
Sop	äußeres <i>Salmonella</i> -Protein (<i>Salmonella outer protein</i>), z. B. SopD
SPF	spezifisch pathogenfrei (<i>specific pathogene free</i>)
SPI	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel
spp.	Spezies
SptP	<i>Salmonella</i> -Tyrosinphosphatase-Protein (<i>Salmonella protein tyrosine phosphatase</i>)
spv	Virulenzplasmid (<i>Salmonella plasmid for virulence</i>)
Sse	<i>Salmonella</i> -Sekretionssystem-Effektor (<i>Salmonella secretion system effector</i>), z. B. SseG
ssp.	Subspezies
SspH1/2	<i>Salmonella</i> -sezernierendes Protein H1/2 (<i>Salmonella secreted protein H1/2</i>)
ST	Sequenz Typ
STAND	Signaltransduktions-ATPase mit zahlreichen Domänen (<i>signal transduction ATPases with numerous domains</i>)
SteC	<i>Salmonella</i> -translozierender Effektor C (<i>Salmonella translocated effektor C</i>)
SCV	<i>Salmonellen</i> -enthaltende Vakuolen (<i>Salmonella</i> -containing-vacuole)
Tab.	Tabelle
TAK1	TGF- β -aktivierte Kinase 1
TBE	Pufferlösung (Tris/Borat/EDTA)
Tcps	Toxin-koregulierendes Pilus-Biosyntheseprotein (<i>toxin coregulated pilus biosynthesis protein</i>)
TE	Pufferlösung (Tris-EDTA)
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta (<i>transforming growth factor-β</i>)
THP-1a	THP-1 als adhärenzte Zelllinie
THP-1s	THP-1 in Suspension

TIRAP	Toll-Interleukin 1 Rezeptordomäne-enthaltendes Protein (<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein</i>)
TlpA	TIR-ähnliches Protein A (<i>TIR-like protein A</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor, z. B. TNF- α
Tollip	Toll-interagierendes Protein (<i>Toll-interacting protein</i>)
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRAM	TRIF-ähnliches Adaptormolekül (<i>TRIF related adaptor molecule</i>)
TREM	Rezeptor (<i>triggering receptor expressed on myeloid cells-1</i>)
TRIF	IFN- β -induzierende Toll-Interleukin 1 Rezeptor-enthaltende Adaptordomäne (<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-β</i>)
T3SS	Typ III Sekretionssystem (<i>type three secretionsystem</i>)
U	<i>unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolett
var.	Variante
wt	Wildtyp
XIAP	X-gekoppeltes Apoptose-Inhibitorprotein (<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>)

1. Einleitung

Salmonellen stellen weltweit ein großes Problem für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Eine Infektion mit *Salmonella* (*S.*) kann sowohl zu selbstlimitierenden gastrointestinalen Erkrankungen führen als auch zu akuten oder latenten generalisierten Salmonellosen (Meyer, 1999; Sander, 1993). Gewöhnlich gelangen die Erreger auf dem oralen Weg in den Wirtsorganismus. Dabei spielt in den industrialisierten Ländern vor allem der Infektionsweg über die Lebensmittelkette eine Rolle. Allein in Deutschland zählen Salmonellen neben den *Campylobacter*-Spezies zu den bedeutendsten bakteriellen Ursachen der humanen Lebensmittelinfektion. Nachweislich sind es europaweit vor allem die Serovare *S. Enteritidis* (58,0 %) und *S. Typhimurium* (21,9 %), welche für Erkrankungen von Menschen ursächlich sind. Diese Serovarhäufigkeiten korrelieren mit dem Vorkommen von Salmonellen in Lebensmittelprodukten, wie beispielsweise *S. Enteritidis* mit 34,1 % in Geflügelfleisch und *S. Typhimurium* mit 31,5 % und 26,3 % in Schweine- bzw. Rindfleisch (*European Food Safety Authority* (EFSA) Journal 2010). In diesem Zusammenhang spielen klinisch-inapparent infizierte Schlachttiere eine besondere Rolle. Nach Steinbach und Hartung (1999) liegt die Ursache von ~20 % der humanen Salmonelleninfektionen in kontaminiertem Schweinefleisch und Schweinefleischprodukten. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Diskrepanzen der Untersuchungsergebnisse der *European Food Safety Authority* (EFSA) und dem *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC) hinsichtlich des Vorkommens der *Salmonella*-Serovare im lebenden Tier und den zugehörigen Schlachtprodukten. Beispielsweise ist *S. Typhimurium* die am häufigsten nachgewiesene Serovar in untersuchten Schweinebetrieben (31,5 %) und im Schweinefleisch (33,1 %). Die zweithäufigste Serovar in Schweinen *S. Derby* (13,2-19,8 %) sowie die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* konnten jedoch bei humanen Krankheitsausbrüchen nur in 0,5 % bzw. <0,5 % der Fälle nachgewiesen werden. Diese Auffälligkeiten treffen im Übrigen auch für die rinderadaptierte Serovar *S. Dublin* zu. *S. Dublin* ist hierbei die zweithäufigste Serovar (23,1 %) in untersuchten Rinderbetrieben, wird jedoch bei den humanen Untersuchungsergebnissen aufgrund der geringen Fallzahl bereits nicht mehr aufgeführt (EFSA Journal 2010). Diese Diskrepanz belegt die Wirtsadaptation der verschiedenen Salmonellen.

Aufgrund dessen wird in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von wirtsadaptierten und nicht-wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovaren in drei untersuchten Wirtssystemen *in vitro* beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist eine vergleichende Analyse der Salmonelleninfektion in den Wirtssystemen Schwein, Maus und Mensch, wobei hier die zwei bedeutendsten Zellvertreter für den Infektionsweg gewählt werden: die intestinalen Epithelzellen sowie die Makrophagen. Hierzu werden die *Salmonella*-Serovare *in vitro* hinsichtlich ihrer Invasivität und der intrazellulären Vermehrung miteinander verglichen. Darüber hinaus wird die Aktivierung der angeborenen Immunmechanismen der Wirtssysteme mit Hilfe eines *in vitro* NF- κ B-Aktivierungstests bestimmt und miteinander verglichen. Hierfür werden verschiedene Systeme etabliert. Zusätzlich wird die Bedeutung wirtseigener Proteine der angeborenen Immunität, der NOD-Proteine, im Zusammenhang mit der Wirtsspezifität der Salmonellen diskutiert. Die ermittelten Daten sollen (1) einen Erkenntniszuwachs zur Pathogenese und der Wirtsspezifität von Salmonellen erbringen, (2) zu einem besseren Verständnis der Erreger-Wirt-Interaktion beitragen und (3) Anhaltspunkte für zukünftige Forschungsarbeiten bieten.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen zur Gattung *Salmonella*

2.1.1 Bedeutung der Gattung *Salmonella*

Salmonella-Spezies sind fakultativ intrazellulär parasitierende, meist peritrich begeißelte, fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchenbakterien (Le Minor und Bockemuhl, 1984; Selbitz, 1992). Ein Salmonellenwachstum ist bei +5,2 °C bis zu +46,2 °C möglich und zeigt in der mikrobiologischen Diagnostik folgende Stoffwechselcharakteristika: Schwefelwasserstoffbildung, Nitratreduktion, Propylenglykolabbau, Citratverwertung und eine negative Laktatverwertung (Baumgart *et al.*, 2005; Modak *et al.*, 1967; Nair *et al.*, 1967; Nair *et al.*, 1968;). Salmonelleninfektionen und auch Salmonellosen betreffen sowohl den Menschen als auch das Tier. Aufgrund dessen zählen Salmonelleninfektionen zu den Zoonosen, da sie vom Tier oder den tierischen Produkten auf den Menschen und umgekehrt übertragen werden können. Latent-manifeste Enteritiden werden zumeist als Salmonelleninfektionen bezeichnet, sie dienen in der Literatur jedoch auch als Sammelbegriff jeglicher Infektionen durch *Salmonella* (*S.*). Eine Salmonellose ist *per definitionem* eine Salmonelleninfektion einhergehend mit einer Septikämie und wird nochmals in primäre und sekundäre Salmonellosen unterschieden. In dieser Arbeit wird der Begriff Salmonelleninfektion als Sammelbegriff verwendet.

Die Salmonelleninfektionen werden hierzulande fast ausschließlich durch Lebensmittel und deren Zubereitungen hervorgerufen (Werner *et al.*, 1979). Die dabei am häufigsten nachgewiesenen Serovaren sind *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* (Hartung, 2009). Die Fähigkeit der Salmonellen zur Persistenz, also das Überleben der Pathogene in asymptomatischen Trägern, wie zum Beispiel *S. Dublin* in Rindern oder *S. Choleraesuis* in Schweinen, und die intermittierende Ausscheidung durch solche Träger beeinflusst in großem Maße die Verbreitung des Erregers (Kotova *et al.*, 1988). Die Krankheitsbilder können von einer selbstlimitierenden Diarrhö durch enteritische Salmonellen bis hin zu einer schweren systemischen, fieberhaften Allgemeinerkrankung wie beispielsweise dem Typhus durch typhoide Salmonellen sehr unterschiedlich ausfallen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass auch diese Einteilung nicht absolut ist, da einzelne Serovaren sowohl systemische als auch lokale Entzündungsreaktionen auslösen können. Nichtsdestotrotz sollte jedes *Salmonella*-Serovar aufgrund seiner Virulenz, bestimmt durch die Fähigkeit zur Adhäsion, Invasion, dem fakultativen intrazellulären Parasitismus und der zytotoxischen Effekte, zunächst als Zoonoseerreger betrachtet werden.

Nach Schätzungen der *World Health Organisation* treten jährlich rund 21,7 Millionen Fälle von Typhus auf, davon ~217.000 mit letalem Verlauf sowie 5,4 Millionen Fälle von Paratyphus (Crump und Mintz, 2010). Darüber hinaus werden circa 1,3 Milliarden Patienten mit Diarrhö durch so genannte nichttyphoide Salmonellen gezählt, davon ~3 Millionen mit tödlichem Verlauf (Pang *et al.* 1995). Neben diesen gesundheitlichen Auswirkungen sind auch die ökonomischen Folgeerscheinungen zu berücksichtigen, welche von der *World Health Organisation* allein in den USA auf rund 6,8 Milliarden US-Dollar geschätzt werden. In Großbritannien und den USA verursachen Salmonellen mehr letale Krankheitsverläufe als

irgendein anderer lebensmittelassoziierter Keim. Auch in Deutschland gehören Salmonellenerkrankungen mit zu den am häufigsten nachgewiesenen Erregern bei Lebensmittelkrankheiten und sind aufgrund der §§ 6,7 des Infektionsschutzgesetzes (Anonymus, 2000) meldepflichtig. Laut Jahresstatistik des Robert Koch-Institutes gab es in Deutschland im Jahr 2007 55.155, 2008 42.920, 2009 31.185 und 2010 insgesamt 25.228 gemeldete Salmonellosefälle in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2008, 2010 und 2011). Schätzungsweise machen die auf Grund des Bundesseuchengesetzes gemeldeten Zahlen in etwa nur 10-20 % der tatsächlichen Infektionszahlen beim Menschen aus. Man geht davon aus, dass rund jeder fünfte Mensch Salmonellenträger ist. Laut dem *European Center for Disease Prevention and Control* und der *European Food Safety Authority* gehören zu den am häufigsten nachgewiesenen Serovaren bei humanen Krankheitsfällen in Europa *S. Enteritidis* mit 58,0 %, gefolgt von *S. Typhimurium* mit 21,9 % (EFSA Journal 2010). Die Infektionszahlen bei Tieren basieren meist auf Stichprobenanalysen der veterinärmedizinischen Untersuchungsämter. Hierbei wurden im Rahmen einer Mastschweinbetriebsuntersuchung des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) in Deutschland 13 % der untersuchten Tiere positiv auf Salmonellen getestet. Insgesamt wurden 23 verschiedene Serovare nachgewiesen, wobei an erster Stelle *S. Typhimurium* mit 55,2 % vorkam (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2008). Ein Jahr später erschienen die Untersuchungsergebnisse für Zuchtschweinebestände. Hierbei waren 7,6 % der Kotproben aus Zuchtbetrieben und 5,8 % aus Ferkelbetrieben positiv auf Salmonellen. Auf Bestandesebene waren es jedoch 22,4 % positiv getestete Bestände und hierbei vor allem Zuchtbetriebe mit hohem Tieraufkommen (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2009). In Truthühnerbeständen hingegen wurden im Jahre 2007 10,3 % der untersuchten Mastbetriebe positiv auf *Salmonella* getestet. Die am häufigsten nachgewiesene Serovar mit 25,8 % war *S. Typhimurium* (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2008). In Broilerbetrieben wurden hingegen 17,5 % der untersuchten Betriebe positiv auf *Salmonella spp.* getestet (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2006). Der Tiergesundheitsjahresbericht des Friedrich-Löffler-Institutes (FLI) berichtete bei Rindern über 81 und 120 gemeldete Salmonellose-Fälle im Jahr 2009 und 2008. Hierbei wurden vor allem die Serovare *S. Typhimurium* var. Copenhagen mit 38,3 % (2009) sowie *S. Dublin* mit 19,7 % (2009) nachgewiesen (Friedrich-Löffler-Institut, 2010).

2.1.2 Taxonomie

Die Gattung *Salmonella* zählt neben den Gattungen *Escherichia* und *Yersinia* zu der Familie der *Enterobacteriaceae* und wird der Klasse der *Gamma-Proteobacteria*, dem Stamm der *Proteobacteria* des Reiches *Bacteria* zugeordnet (Brenner *et al.*, 2005). Erstmals beschrieben wurde der Erreger 1880 durch Eberth, damals jedoch noch unter einem anderen Gattungsnamen (Le Minor, 1994). Vier Jahre später gelang es Gaffky, die Mikroben erstmalig zu kultivieren (Kauffmann, 1978). Erst 1900 bekamen die von Salmon beschriebenen 'Hogcholera-Bazillen' ihre Gattungsbezeichnung *Salmonella* von Lignieres. Die Taxonomie der Salmonellen ist komplex und war oftmals Änderungen unterworfen. Zunächst wurden die Salmonellen nach rein klinischen Gesichtspunkten durch das Zusammensetzen des Namens der Krankheit und des Wirtes, wie z. B. in *Salmonella typhi-murium* (Mäusetyphus) eingeteilt und benannt (Kauffmann, 1966). Um 1941 unterlagen alle *Salmonella*-Isolate noch einem Speziesnamen. Aufgrund biochemischer Eigenschaften deklarierte Kauffmann 1966 das Vorkommen von vier *Salmonella*-Subgenera

(Kauffmann, 1966). Hierdurch wurde das taxonomische System im Kauffmann-White Schema (heute: White-Kauffmann-Le Minor-Schema) vereinheitlicht, jedoch jedes neue Serovar wurde aufgrund serologischer Befunde auch als neue Art deklariert (Guibourdenche *et al.*, 2010). Nachdem bekannt wurde, dass einige Serovare keine absolute Wirtsspezifität aufweisen, entwickelten sich die Ortsbezeichnungen, so dass neue Arten nach dem Ort der ersten Isolation benannt wurden, wie z. B. *Salmonella Dublin*. Erst ab 1982 entstand aufgrund erster DNA-Sequenzanalysen von Le Minor die Hypothese, die Gattung *Salmonella* bestehe nur aus einer Spezies *S. choleraesuis* (Le Minor *et al.*, 1982). Die Subspezies wurden in sechs Gruppen eingeteilt: *S. choleraesuis* ssp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* ssp. *salamae*, *S. choleraesuis* ssp. *arizonae*, *S. choleraesuis* ssp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* ssp. *houtenae* und *S. choleraesuis* ssp. *bongori*. Aufgrund von Verwirrungen bezüglich der gleichzeitigen Benennung von "Choleraesuis" als Spezies und Serovar erfolgte später die Umbenennung der Spezies in "Enterica" (Euzeby, 1999). Reeves bevorzugte jedoch die Einteilung in zwei Subspezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*, hierbei sollte *S. bongori* als eigene Spezies bezeichnet werden (Reeves *et al.*, 1989). Seit 2005 gelten die Vorschläge von Le Minor, Popoff und Reeves durch Beschluss des *International Committee on Systematics of Prokaryotes* offiziell, das heißt, nach geltender Nomenklatur beinhaltet die Gattung *Salmonella* zwei Spezies, *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica*, wobei *S. enterica* nochmals in sechs Subspezies gegliedert wird: *S. enterica* ssp. *enterica*, *S. enterica* ssp. *salamae*, *S. enterica* ssp. *arizonae*, *S. enterica* ssp. *diarizonae*, *S. enterica* ssp. *houtenae* und *S. enterica* ssp. *indica* (Guibourdenche *et al.*, 2010; Popoff *et al.*, 1992; Tindall *et al.*, 2005) (Abb.1).

Innerhalb der Subspeziesgruppen werden die Erreger auf Grundlage ihrer Oberflächen-, Geißel- und der Kapselantigene in Serovaren unterteilt. Demnach unterscheidet man heutzutage über 2500 Serovare, davon gehören rund 1500 Serovare zu der Subspeziesgruppe I *S. enterica* ssp. *enterica* (Robert Koch-Institut, 2009). Eine weitere Klassifizierung über die Serovar hinaus ist in Form von serologischen Varietäten, Biovaren, Biochemovaren, Lysotypen, mittels Bestimmung der Resistenzlage und auch durch molekularbiologische Methoden (Plasmidprofil, Restriktionsanalyse, Gennachweise, Ribotyping) möglich. Rund 99,5 % von den isolierten *Salmonella*-Serovaren aus Warmblütern gehören in die Subspeziesgruppe I (Boyd *et al.*, 1996). Die Subspezies *Salmonella enterica* ssp. *enterica* beinhaltet folgende, als Krankheitserreger für den Menschen und für warmblütige Tiere bedeutende Serovare (Auszug): *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Pullorum* und *S. Gallinarum*. Neben der Subspeziesgruppe I gehören auch die Gruppen IIIa und IIIb zu den medizinisch relevanten Salmonellen. In der Gruppe II und IV finden sich Serovare, welche meist aus Reptilien isoliert wurden. Obwohl *S. bongori* ursprünglich aus einer Echse isoliert wurde, besitzt es auch für homoiotherme Wirte eine gewisse Virulenz.

Es sei erwähnt, dass im Jahr 2004 über eine dritte Spezies *S. subterranea* diskutiert wurde, welche bisher noch nicht offiziell in die Nomenklatur aufgenommen worden ist (Guibourdenche *et al.*, 2010; Shelobolina *et al.*, 2004).

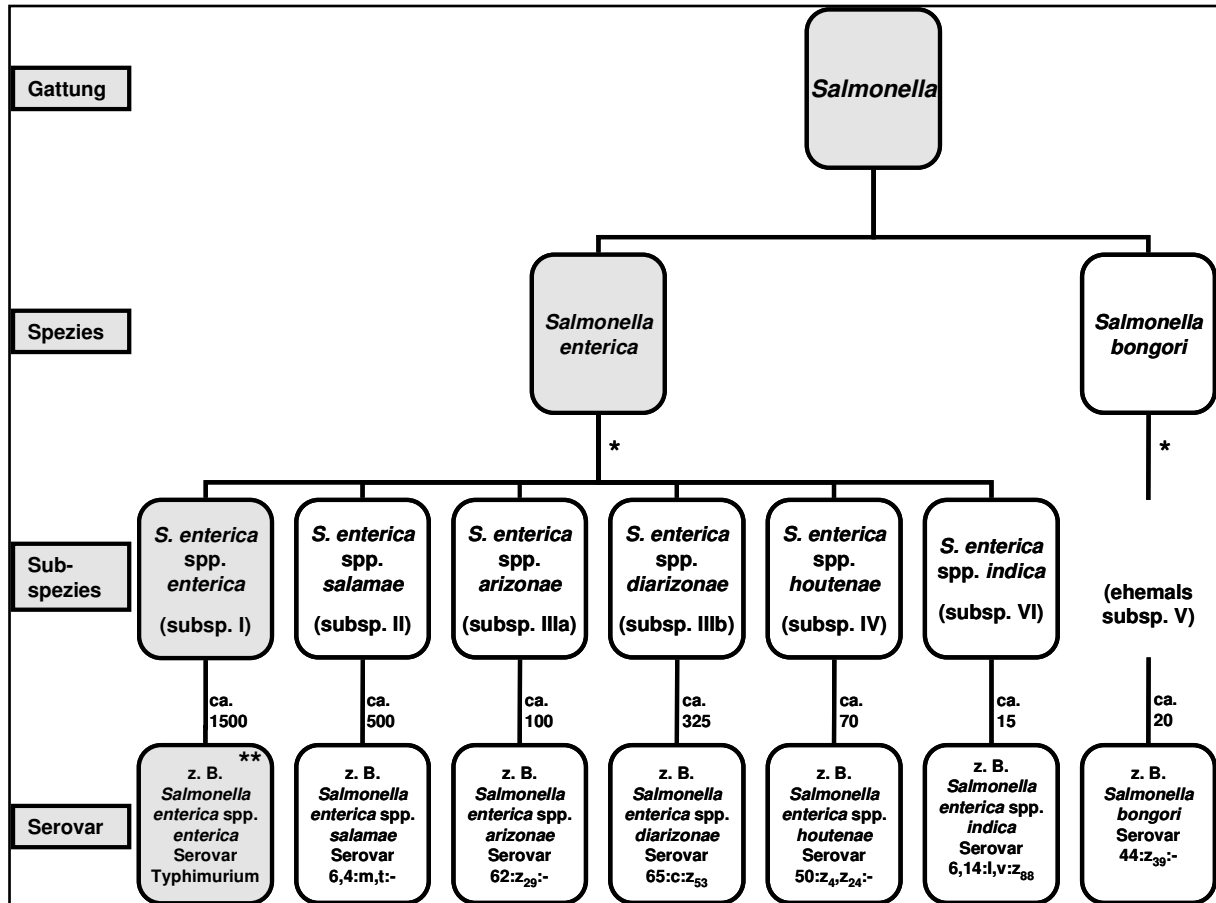


Abb. 1 Übersicht zur Taxonomie der Salmonellen

Der Großteil der aus Warmblütern isolierten Salmonellen zählen zur Subspezies *Salmonella enterica* ssp. *enterica*, wie beispielsweise *S. Typhi*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* (adaptiert aus Guibourdenche *et al.* (2010) und Robert Koch-Institut (2009)). * Gemäß den Oberflächenantigenen bilden die Serovare verschiedener Subspezies circa 50 gemischte Gruppen (z. B. O:51 oder O:67). ** Nur die Serovare der Subspezies I tragen krankheitsbeschreibende Personen- oder Ortsnamen (z. B. *S. Enteritidis* oder *S. Dublin*).

2.1.3 Die Wirtsspezifität der Salmonellen

Selbitz *et al.* (1995) klassifizierte die *Salmonella*-Serovare nach ihrer Wirtsanpassung und der klinischen Bedeutung für Mensch und Tier in vier große Gruppen:

(1) *S. Typhi* und *S. Paratyphi* sind adaptiert an den Menschen, stark invasiv und rufen eine septikämische Allgemeinfektion mit fieberhaftem Verlauf beim Menschen hervor (Typhus und Paratyphus). Eine große klinische Bedeutung für das Tier besteht nicht. Dennoch wurde bereits über Paratyphi B-Erkrankungen bei Rindern berichtet (Evans *et al.*, 2005; Thomas, 1978). Durch die Maskierung der Erreger in Gallenblase, Niere und Leber ist eine Latenz möglich (Menendez *et al.*, 2009).

(2) Die zweite große Gruppe zeigt eine deutliche Anpassung an bestimmte Tierspezies und bewirkt seuchenhafte und ausgeprägte Krankheitsverläufe, wie z. B. *S. Dublin* (Rind), *S. Choleraesuis* (Schwein) und *S. Gallinarum* (Huhn), aufgrund dessen zählen sie zu den primären Salmonellosen (Allan und Duffus, 1971; Gray *et al.*, 1996; Wallis *et al.*, 1995). Es wurden jedoch auch schwere Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen, vor allem durch

die Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*. Unter den wirtsadaptierten Serovaren der Gruppe 2 nach Selbitz *et al.* (1995) besitzen *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* in Hinblick auf humane Erkrankungsfälle eine größere Neigung zur Bakteriämie mit geringen oder keinen intestinalen pathologischen Anzeichen (Bhutta, 2007). So resultiert eine *S. Dublin* Infektion im Menschen in einer Bakteriämie, in Rindern jedoch kommt *S. Dublin* auch klinisch asymptomatisch vor oder führt dort zu Aborten (Dias *et al.*, 2009; Fang und Fierer, 1991; Pegues *et al.*, 2004). Die Infektion des schweineadaptierten Erregers *S. Choleraesuis* resultiert in Menschen ebenfalls in einer Bakteriämie mit hohen Fieberschüben. *S. Choleraesuis* beim Schwein hingegen äußert sich in perakuten, akuten oder chronischen Verlaufsformen mit Fieber, sowie pneumonischen oder enterischen Symptomen (Rabsch *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2001).

(3) *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* sind hingegen an keine Wirtsspezies im Besonderen adaptiert, besitzen jedoch eine ausgeprägte Invasivität und stellen somit die Haupterreger für die sekundären Salmonellosen dar. Diese äußern sich als akute, selbstlimitierende Gastroenteritiden oder lokal begrenzte Enterocolitiden, hierbei sind auch seuchenhafte, septikämische als auch latente Krankheitsverläufe möglich (Altekruse *et al.*, 1997; Rabsch *et al.*, 2001). So resultiert eine Infektion von *S. Typhimurium* in Rindern und im Menschen in einer Enteritis, im Gegensatz hierzu führt die *S. Typhimurium* Infektion in der Maus jedoch zu einem typhoiden Krankheitsbild (Jenkin und Rowley, 1963; Santos *et al.*, 2001). Der nicht-wirtsadaptierte Erreger *S. Enteritidis* resultiert im Menschen ebenfalls in einer selbstlimitierenden Gastroenteritis und in Ratten und Mäusen zu einer Bakteriämie und zu einer schweren systemischen Allgemeininfektion.

(4) In der letzten Gruppe finden sich ~2000 Serovare, welche vorwiegend latente Infektionen verursachen, meist keine Wirtsadaptation aufweisen, geringe bis keine Invasivität zeigen und nur eine punktuelle Bedeutung als Zoonoseerreger besitzen.

Obwohl die Anzahl von isolierten Serovaren aus humanen oder tierischen Krankheitsgeschehen je nach Zeit und Ort variiert, wird der Erreger *S. Typhimurium* am häufigsten nachgewiesen (Rabsch *et al.*, 2002). Diese Häufigkeit ist nach Rabsch *et al.* (2002) aus dem Tierreservoir heraus zu erklären und wird charakterisiert durch sporadische Ausbrüche von klon- oder auch phagentypspezifischen Epidemien. Hierzu wurden Phagentypen von *S. Typhimurium* beschrieben (DT2 und DT99), welche eine Wirtsadaptation in Schweinen aus Europa und Nordamerika aufwiesen (Rabsch *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde bereits 1994 nachgewiesen, dass Serovare, die generell als wirtsspezifisch angesehen werden, unter bestimmten Umständen eine breitere Wirtsfähigkeit aufweisen (Barrow *et al.*, 1994). Die Ursachen für diese Wirtsspezifität und die unterschiedlichen klinischen Ausprägungsformen sind bislang nicht bekannt. Vermutet wird, dass zusätzliche phagenkodierte Virulenzelemente, bisher unentdeckte *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI), Gene und Genabschnitte auf den SPI, Genneuordnungen oder die Aktivierung von Pseudogenen daran beteiligt sind (Figueroa-Bossi *et al.*, 2001). Trotz der hohen genetischen Homologien ist das Pathogenesepotential von den Serovaren sehr unterschiedlich (Jones *et al.*, 2008b).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Serovare sind zum einen wirtsadaptiert, wie beispielsweise *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Dublin (*S. Dublin*) und *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Choleraesuis (*S. Choleraesuis*) und zum anderen die Haupterreger der Diplonosen *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Enteritidis (*S. Enteritidis*) und *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*). Darüber hinaus wurde je ein Serovar aus beiden Gruppen (*S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis*) als genetisch veränderte, durch plasmidvermittelte *green fluorescent protein* (GFP)-Markierung, multiresistente Variante verwendet.

2.1.4 Ätiologie und klinische Symptomatik in den Wirten: Schwein, Maus und Mensch

Das Habitat der Salmonellen ist der Darm. Als Reservoir dienen Säugetiere, Insekten, Vögel und Reptilien sowie kontaminiertes Futter und Wasser (Bohm, 1993; Meerburg *et al.*, 2006). Salmonellen besitzen eine hohe Tenazität und können längere Zeit in der Umwelt überleben. Der niedrige Wassergehalt in Futter- und Lebensmitteln ermöglicht den Salmonellen ein Überleben über Monate bis Jahre. Eine Säuretoleranz ist möglich. Mildes Erhitzen der Lebensmittel kann durch die Bildung so genannter Hitzeschockproteine und den Einbau gesättigter Phospholipide in Membranen zur Hitzetoleranz der Salmonellen führen (Mackey und Derrick, 1990). Eine Infektion mit Salmonellen erfolgt meist oral über kontaminierte Futter- oder Lebensmittel, Trink- oder Tränkwasser und seltener auch über direkte Kontakte wie beispielsweise durch den engen Kontakt mit Heimtieren (Blaha, 1993; Krauss *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist eine Infektion auch auf dem konjunktivalen, aerogenen Weg und bei Vögeln auch germinativ möglich (Fedorka-Cray *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006). Eine besondere Bedeutung für die Zoonosenproblematik haben hierbei die häufig vorkommenden latent infizierten Wirte, so genannte Träger. Diese Keimträger scheiden Salmonellen auch über eine längere Zeit hinweg intermittierend aus, erscheinen aber nach klinischen Gesichtspunkten völlig gesund (Brown *et al.*, 1992; Ekperigin und Nagaraja, 1998; Sandvang *et al.*, 2000). Die Fähigkeit der Salmonellen zur Auslösung einer latenten Infektion und Erregerpersistenz ist somit ein wesentliches epidemiologisches Merkmal, wobei der Grad der Salmonellenpathogenität von verschiedensten Faktoren abhängt. Salmonellen, welche die saure Magenpassage überstanden haben, heften sich an die Dünndarmschleimhaut und vermehren sich in den Krypten des Epithels (Selbitz *et al.*, 1995). Der Infektionsverlauf hängt von drei entscheidenden Faktoren ab: erstens der Resistenzlage des Individuums, bestimmt durch biotische und abiotische Umweltfaktoren, zweitens der Pathogenität und Virulenz der Erreger und deren Wirtsspezifität sowie drittens der Höhe der Infektionsdosis. Die Salmonelleninfektion entwickelt sich meist in drei Phasen: Als erstes findet die Kolonisation im Darm statt, darauf folgt die Adhäsion, die Invasion der Enterozyten und letztendlich die systemisch Streuung (Berends *et al.*, 1996).

(1) Beim Schwein sind grundsätzlich zwei Aspekte bei einer Salmonelleninfektion zu unterscheiden: erstens der fleischhygienische Aspekt und zweitens die klinische Betrachtung des Einzeltieres. Im ersten Fall sind eine Vielzahl von Serovaren beteiligt, wie beispielsweise *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Infantis* und *S. Agona*. Die Serovar *S. Typhimurium* zeigt hier eine eindeutige Latenz in Schweinen und wird aus diesem Grund vor allem über die Lebensmittelkette auf den Menschen übertragen (EFSA Journal 2010). Klinische Erkrankungen beim Schwein werden hingegen durch die schweineadaptierten Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Typhisuis* hervorgerufen. Die schweineadaptierte Serovar

S. Choleraesuis kann hierbei in Blutphagozyten persistieren und somit systemisch streuen (Foley *et al.*, 2008; Moxley und Duhamel, 1999). Aber auch eine porcine Erkrankung durch *S. Typhimurium* ist möglich. In Deutschland wird das derzeitige Infektionsgeschehen im Schwein von *S. Typhimurium* beherrscht, hier vor allem vom Lysotyp DT104 (Szabó, 2008). Erkrankte Tiere zeigen meist eine septikämische Allgemeininfektion mit Zyanosen der Rüsselscheiben, Ohrmuscheln und der Bauchdecke. Pneumonien, aber auch Diarrhö, Abmagerung und Aborte sind möglich. Betroffen sind vor allem Absetzer und Jungschweine (< 60 kg). Eine Manifestation oder ein erneuter Ausbruch von Keimträgertieren wird durch Stress begünstigt (Waldmann *et al.*, 2004). Hierzu zeigten bereits mehrere Studien mit experimentell infizierten Tieren eine hohe Ausscheidungsrate im Kot, insbesondere bei der akuten Phase der Infektion mit bis zu 10^6 bis 10^7 Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro Gramm Kot (Gutzmann *et al.*, 1976; Scherer *et al.*, 2008).

(2) Die klinischen Ausprägungen einer Salmonelleninfektion bei der Maus variieren erheblich je nach betrachtetem Serovar (Hsu, 1989). Die erkrankten Tiere leiden zumeist an Diarrhö, Exsikkose und zunehmender Kachexie. Das Bild der septikämischen, typhoiden Allgemeininfektion, ähnlich dem Typhus des Menschen (Salmonellenenteritis oder auch *Typhus abdominalis*) durch *S. Typhimurium*, war Grundlage für die Erhebung des Mausmodells als experimentelles Studiendesign zur Untersuchung zum typhoiden Krankheitsgeschehen (Mittrucker und Kaufmann, 2000; Santos *et al.*, 2001). Der nicht-wirtsadaptierte Erreger *S. Enteritidis* führt in Mäusen ebenfalls zu einer Bakteriämie und zu systemischen Infektionen. *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* wurden in klinischen Studien vor allem im Magen-Darm-Trakt (MDT) rekultiviert, wobei *S. Dublin* auch in Zellen des retikuloendothelialen Systems nachweisbar war (Heffernan *et al.*, 1987; Smith und Halls, 1968).

(3) Die Salmonelleninfektion des Menschen zählt zu den klassischen, zoonotischen Lebensmittelinfektionen. Zunächst gelangen die Salmonellen über die orale Aufnahme in den Wirtsorganismus, vor allem durch Schlachtgeflügelprodukte, Fleischprodukte wie Hackfleisch und Schweinefleisch, durch Eier, Milch und deren Zubereitungen sowie durch Kräuter- und Gewürzmischungen. Die minimale Infektionsdosis beträgt hierbei 10^5 bis 10^6 Salmonellen/g Lebensmittel. Diese Infektionsdosis erklärt mit der oben erwähnten hohen Ausscheidungsrate von Salmonellen mit dem Kot aus infizierten Tieren, die große Bedeutung der Salmonellen im aktuellen Infektionsgeschehen. Es wurden jedoch auch Erkrankungsfälle mit 10^2 Salmonellen/g Schokolade (*S. Eastborne*) oder ~1/100 g Cheddarkäse (*S. Typhimurium*) beschrieben (Craven *et al.*, 1975; D'Aoust, 1985). Hier gelang es den Bakterien, durch den hohen Fettgehalt der Lebensmittel einen protektiven Effekt gegenüber der Magensäure aufzubauen und an den Ort des Infektionsgeschehens zu gelangen, den MDT. Nach einer 12- bis 36-stündigen Inkubationszeit zeigen sich meist die Symptome einer klassischen Gastroenteritis: Diarrhö, Erbrechen, Unwohlsein, Kopf- und Leibschmerzen sowie mildes Fieber für die Dauer von rund zwei bis fünf Tagen. Es besteht Exsikkosegefahr. Eine Manifestation der Infektion und damit das Phänomen der Dauerausscheider bis zu einem Jahr ist möglich (Buchwald und Blaser, 1984). Selten ist auch eine Septikämie mit Organabsiedlung möglich, z. B. als Cholezystitis, Endocarditis, Pneumonie, Pyelonephritis und Meningitis. Besonders betroffen sind jüngere, ältere, schwangere und immunsupprimierte Patienten (Baird-Parker, 1990; Mossel und Struijk, 1993; Robert Koch-Institut, 2009). Folgesymptome der Salmonelleninfektion wie eine Urethritis, Konjunktivitis

und eine aseptische Polyarthritiden werden als Reiter-Syndrom bezeichnet (Maki-Ikola und Granfors, 1992). Bakteriämien wurden jedoch auch im Zusammenhang mit humanen *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* Infektionen beschrieben (Chiu *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2009).

2.1.5 Salmonelleninfektion: Pathogenese und Virulenzmechanismen

Die Pathogenität der Salmonellen begründet sich auf ein breites Spektrum von virulenzassoziierten Proteinen, welche im Wirtsorganismus zellbiologische Störungen, Modifikationen und Blockaden auslösen. Diese Interaktionen äußern sich im klinischen Bild als choleraähnliche Durchfälle mit hohen Wasser- und Elektrolytverlusten, entzündlichen Darmwandveränderungen und gegebenenfalls in der Besiedlung des retikuloendothelialen Systems und weiteren inneren Organen. Über die orale Aufnahme gelangen die Salmonellen zunächst in den MDT und hier an den Ort des Infektionsgeschehens, in das terminale Ileum (Carter und Collins, 1974). Die epitheliale Darmbarriere kann von den Salmonellen in unterschiedlicher Art und Weise überwunden werden. Dazu gehören: (1) die am häufigsten beschriebene Aufnahme der Salmonellen über *microfold* Zellen (M-Zellen), (2) die Invasion von Enterozyten, (3) parazellulär oder (4) über dendritische Zellen und über CD18⁺-phagozytierende Zellen (Giannella *et al.*, 1973; Jones *et al.*, 1994; Kohbata *et al.*, 1986; Vazquez-Torres *et al.*, 1999) (Abb. 2).

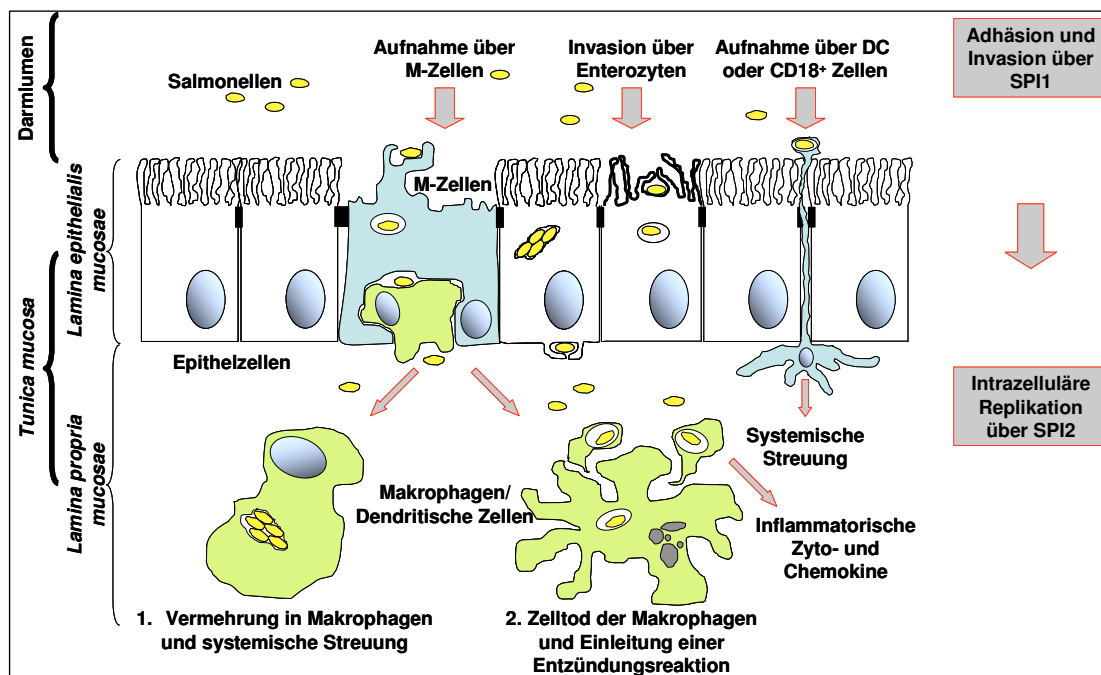


Abb. 2 Schematische Darstellung der zellulären Pathogenese der Salmonelleninfektion im terminalen Ileum

Die epitheliale Darmbarriere im terminalen Ileum wird von den Salmonellen über M-Zellen, über die Invasion der Enterozyten, parazellulär (nicht gezeigt), über dendritische Zellen oder durch CD18⁺-phagozytierende Zellen überwunden. In der frühen Phase der Infektion sind vor allem Proteine der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) für eine effiziente Invasion der Wirtszellen notwendig (Galan, 1996). Die Virulenzgene der SPI2 hingegen werden vermehrt für das intrazelluläre Überleben und die Replikation benötigt (Shea *et al.*, 1996 und 1999). Die Abbildung ist modifiziert nach Galan (1996).

Die erste Phase des Infektionsprozesses durch Salmonellen ist die Adhäsion an die Enterozyten. Diese wird vermittelt über Fimbrien und das Invasionsgen *InvH* (Altmeyer *et al.*, 1993). Fimbrien besitzen eine filiforme Eiweißstruktur und binden über Lektinstrukturen an Mannose oder andere kohlenhydratenthaltende Rezeptoren sowie an Fibronektine der Zielzellen. *Salmonella*-Spezies sind in der Lage, neun verschiedene Fimbrientypen zu produzieren, hierbei sind es die *long-polar-fimbriae* (Lpf), welche die Adhäsion bewerkstelligen. Die *plasmid-encoded-fimbria* (Pef) vermitteln nachweislich die Adhäsion an die murinen Dünndarmepithelien, die mannosensitiven Fimbrien vom Typ I dagegen wurden für die erfolgreiche Adhäsion an einer Vielzahl an Zellen beschrieben (Althouse *et al.*, 2003; Baumler *et al.*, 1996a,b,c; Lindquist *et al.*, 1987). Darüber hinaus besitzen Salmonellen Hämagglutinin-ähnliche Proteine wie das PagN (PhoP-aktivierendes Gen N), welches ebenfalls die Adhäsion an Enterozyten vermittelt (Lambert und Smith, 2008). Bereits innerhalb von wenigen Minuten (2-5min *post infectionem* (*p. i.*)) können Salmonellen intrazellulär nachgewiesen werden (Brown und Price, 2007; Jones *et al.*, 1994). Die bakterielle Internalisierung steigt dann innerhalb von 15-60min *p. i.* kontinuierlich an, um anschließend wieder abzunehmen. Der Prozess der Invasion beinhaltet den engen Kontakt mit der Wirtszelle, die Umordnung des Wirtsskelettes und damit einhergehend die Bildung von sogenannten *Ruffles*, gefolgt von der Makropinozytose (Cossart und Sansonetti, 2004; Takeuchi, 1967).

Nach dem Kontakt von *Salmonella* mit der epithelialen Zellmembran werden Effektormoleküle über ein auf der SPI1-kodiertes Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) innerhalb von Sekunden in die Wirtszelle geschleust (Guiney und Lesnick, 2005; Schlumberger *et al.*, 2005; Schlumberger und Hardt, 2006; Wallis und Galyov, 2000). Einige der Effektorproteine induzieren die zytoskelettale Umgestaltung (*membrane ruffling*) und führen somit zur erleichterten Aufnahme der Salmonellen in die Zielzelle über Makropinozytose.

Bisher wurden 13 Effektorproteine beschrieben, welche über das T3SS der SPI1 in die Zielzellen geschleust werden: AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE2, SptP und SspH1 (Galan, 1996) (Abb. 3).

Salmonella-Invasion-Protein (Sip) A und SipC fördern die Aktinneubildung und Reorganisierung des Zytoskelettes (Hayward und Koronakis, 1999; McGhie *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1999). *Salmonella-Outer-Protein* (Sop) E und SopE2 sind GTP-ähnliche Faktoren und führen zur Aktivierung von Cdc42/Rac1¹ und somit zur zytoskelettalen Aktinpolymerisation über den Arp2/3-Komplex² (Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000). Nachweislich erhöht das Genprodukt SopE1 aus *S. Typhimurium* über Cdc42/Rac1 die Pathogenität der Salmonellen *in vivo* (Zhang *et al.*, 2002). SopB/SigD ähnelt einer Phosphatidylinositol-Phosphatase und induziert die Loslösung des Aktinzytoskelettes von der Zellmembran (Norris *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001). Nach der erfolgreichen Internalisierung der Salmonellen durch die Wirtszelle stellt *Salmonella-protein-tyrosine-phosphatase* (SptP) den Ausgangszustand des Zytoskelettes der Wirtszelle wieder her (Kaniga *et al.*, 1996; Stebbins und Galan, 2000). Die Salmonellen befinden sich nun in einer *Salmonella-containing-vacuole* (SCV). Eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Reifung der SCV spielen die Rab-Proteine (*small* GTPasen) und das SopB (Bakowski *et al.*, 2008).

¹ Cdc42 = cell division control protein 42 homolog; Rac1 = rat sarcoma (Ras)-related C3 botulinum toxin substrate 1

² Arp2/3 = actin-related protein 2/3

Salmonellen in der SCV sind in der Lage, über Effektorproteine und das T3SS der SPI2 die zelleigenen Abwehrmechanismen zu umgehen. Durch Verhinderung der Endosom-Lysosom-Fusion, der Ansäuerung des Phagosoms, der Oxidasebildung und Induktion der NO-Synthase (iNOS) sind die Erreger in der Lage, sich in der SCV zu vermehren (Brumell und Grinstein, 2004; Garvis *et al.*, 2001; Govoni *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2004; Shea *et al.*, 1996 und 1999; Tsolis *et al.*, 1995; Vazquez-Torres *et al.*, 2000). Salmonellen in der SCV beeinflussen das wirtszelleigene Mikrotubuli-Netzwerk und treten mit dem Golgi-Komplex in Verbindung (Ramsden *et al.*, 2007). Parallel hierzu bilden sich die sogenannten *Salmonella-induced-filaments* (Sifs). Die Entstehung der Sifs wird maßgeblich durch SPI1 und SPI2 verursacht, hierzu gehören das SPI1-Effektorprotein SopD2 sowie folgende SPI2-Effektorproteine: *Salmonella-secreted-protein H2* (SspH2), *Salmonella-translocated-effektor C* (SteC), *Salmonella-secretion-system-effector* (Sse) F und SseG (Bakowski *et al.*, 2008). Rajashekar *et al.* (2008) konnten zeigen, dass sich Sifs unabhängig von der Zellart sowohl in Makrophagen als auch in Epithelzellen bilden.

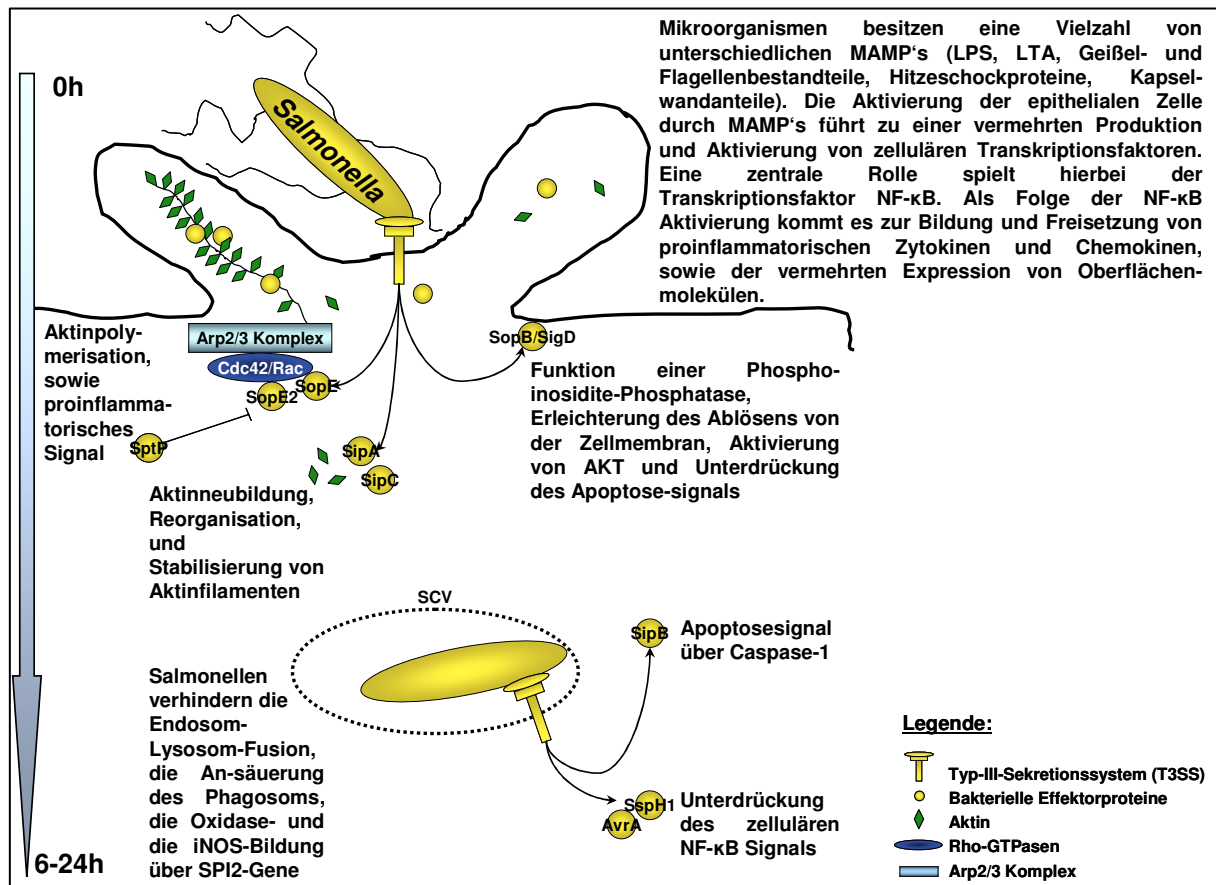


Abb. 3 Schematische Darstellung der Salmonelleninfektion und intrazellulären Signaltransduktion

Durch eine Vielzahl an mikrobiellen Strukturmerkmalen kann die Wirtszelle die Erreger erkennen und als pathogen einstufen, um angemessen proinflammatorisch darauf zu reagieren. *Salmonella*-Spezies produzieren verschiedene Effektorproteine (AvrA, SopB/SigD und SspH1), die diese erste Immunantwort unterdrücken können. Die Abbildung ist angelehnt an Ly und Casanova (2007).

Die Salmonelleninvasion hat jedoch abhängig von der Zellart unterschiedliche Konsequenzen, so scheinen Enterozyten die bakterielle Transzytose meist zu "überleben", wohingegen M-Zellen nach bereits 30min *p. i.* Apoptosezeichen aufweisen (Giannella *et al.*, 1973; Jones *et al.*, 1994; Kohbata *et al.*, 1986). Zu den von *Salmonella* ausgelösten Apoptosesignalen gehört beispielsweise das Effektorprotein SipB, welches ebenfalls über ein T3SS in die Wirtszelle geschleust wird und an das proapoptotisch-regulatorische Protein Caspase-1 bindet (Chen *et al.*, 1996; Guiney, 2005). Die zelluläre Wirtsimmunantwort kann jedoch auch durch *Salmonella*-Proteine unterdrückt werden. Hierzu gehören die Effektorproteine AvrA, SspH1 und SopB/SigD. Das *avirulence-protein A* (AvrA) ist eine Cysteinprotease, das die zelluläre NF- κ B-Antwort der Wirtszelle vermindert und die Integrität des epithelialen Layers stabilisiert (Collier-Hyams *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2008a; Liao *et al.*, 2008). SspH1 vermindert über die Aktivierung der Proteinkinase N1 die wirtszelleigene NF- κ B-Aktivierung (Haraga und Miller, 2003). SopB/SigD kann neben vielen weiteren Funktionen auch die Proteinkinase B (PKB) der Wirtszelle aktivieren und somit die Apoptose der Wirtszelle verhindern (Knodler *et al.*, 2005).

Nach der erfolgreichen Invasion des Wirtsorganismus können mit Salmonellen-infizierte Immunzellen wie dendritische Zellen, Lymphozyten und Makrophagen in den Peyerschen Plaques (PP), den Mesenteriallymphknoten und auch in der Niere und der Leber nachgewiesen werden (Reed *et al.*, 1986; Wells, 1990). Die systemische Streuung der Salmonellen wird zumeist durch Makrophagen realisiert. Hierbei können die Erreger das darmassoziierte Lymphgewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) verlassen und eine systemische Allgemeininfektion verursachen (Guiney, 2005; Kingsley und Baumler, 2000; Uzzau *et al.*, 2000).

Kennzeichnend für eine Infektion durch Salmonellen ist also die Fähigkeit der Salmonellen (1) nicht-phagozytierende als auch phagozytierende Zellen zu infizieren, (2) in diesen Wirtszellen intrazellulär zu überleben, (3) sich in diesen Wirtszellen zu vermehren und (4) darüber hinaus Einfluss auf die Abwehrmechanismen der Wirtszellen zu nehmen.

Hierzu besitzen *Salmonella* spp. eine große Anzahl von chromosomalen Virulenzgenen und Virulenzplasmiden. Chromosomale Virulenzgene liegen meist dicht gepackt auf Segmenten des Genoms, den sogenannten SPI (Ochman und Groisman, 1996). Bisher wurden 17 verschiedene SPI beschrieben, welche sich in ihrem G/C-Gehalt vom übrigen Genom unterscheiden (Hensel, 2004; Vernikos und Parkhill, 2006). Die bekanntesten SPI1 und SPI2 kodieren für je ein T3SS, sezernierende Effektorproteine, akzessorische Proteine und Regulatoren. Damit nehmen die SPI1 und SPI2 für die *Salmonella*-Wirtszell-Interaktion und die Modifizierung von Wirtszellfunktionen eine zentrale Rolle ein (Hensel, 2004). In der frühen Phase der Infektion sind vor allem Effektorproteine der 40 kbp großen SPI1 für eine effiziente Invasion der Wirtszellen notwendig (Galan, 1996). Die Expression der SPI1-Gene wird durch Umweltfaktoren wie der O₂-Konzentration, der Osmolarität und auch durch das entsprechende Wachstumsstadium der Salmonellen beeinflusst (Lundberg *et al.*, 1999). Die Virulenzgene der ebenfalls 40 kbp großen SPI2 werden hingegen vermehrt für das intrazelluläre Überleben und die intrazelluläre Replikation benötigt. Die Aktivierung der SPI2-Gene wird durch pH-Wert-Reduktion, wie es in den Phagosomen der Wirtszelle geschieht,

eingeleitet (Shea *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen ergaben, dass diese strikte Einteilung der Rolle der SPI1 und SPI2 nicht gegeben ist, da einige Effektorproteine der SPI1 wiederum bei der SCV-Reifung und auch bei der intrazellulären Replikation wichtig sind (Brawn *et al.*, 2007; Steele-Mortimer *et al.*, 2002). Die 17 kbp große SPI3 kodiert für ein Magnesiumtransportsystem und ist bedeutend für das Überleben der Salmonellen in Makrophagen und die hohe *in vivo* Virulenz (Retamal *et al.*, 2009). Die SPI4 umfasst insgesamt 28 kb. Bisher wurden den SPI4-Virulenzgenen eine Rolle beim Überleben in Makrophagen und bei der Adhäsion an Epithelien zugeschrieben (Gerlach *et al.*, 2007). Die 9 kbp große SPI5 kodiert für Effektorproteine, wie beispielsweise das bereits erwähnte SopB und das *pathogenicity-island-encoded-protein B* (PipB), welches bei der Entstehung und Funktion der Sifs mitwirkt. Der SPI5 ist vor allem bei der Enteropathogenese essentiell (Miroid *et al.*, 2001).

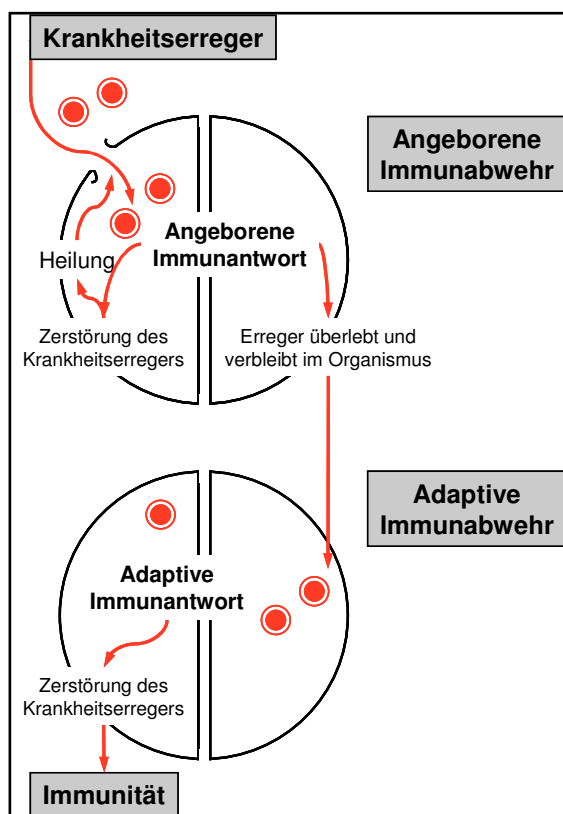
Neben den SPI besitzen einige *Salmonella* spp. Virulenzplasmide wie z. B. das 90 kbp große Plasmid von *S. Thyphimurium* LT2 (pSLT). Das *spv*-Operon des pSLT ist bedeutsam für die vollständige Virulenz in *in vivo* Mäuseinfektionsversuchen. Die Expression der *spv*-Gene wird durch Stress, Nährstoffmangel, stationäre Wachstumsphasen und intrazellulären Parasitismus reguliert (Gulig *et al.*, 1997; McClelland *et al.*, 2001). *S. Choleraesuis* besitzt zwei Virulenzplasmide pSC138 und pSCV50, welche in ihrer Größe variieren (Chiu *et al.*, 2005). Auch für die Serovare *S. Dublin* pCT02021853_74 und *S. Enteritidis* wurden Plasmide beschrieben (Chu *et al.*, 1999; Montenegro *et al.*, 1991). Die Rolle von Virulenzplasmiden in der Wirtsadaptation und Virulenz der Salmonellen bleibt jedoch unklar. In Mäusen sind die Virulenzplasmide der Salmonellen nicht essentiell, um die mukosale Barriere zu durchbrechen, aber nachweislich bedeutend bei der intrazellulären Replikation (Gulig und Doyle, 1993; Heffernan *et al.*, 1987; Manning *et al.*, 1986; Pardon *et al.*, 1986). Eine Bedeutung von Virulenzplasmiden wurde außerdem beschrieben bei der systemischen Infektion von aviären Wirten und bei Schweinen (Barrow *et al.*, 1987; Danbara *et al.*, 1992).

Dies zeigt, dass die Virulenzmechanismen von Salmonellen bisher zwar gut definiert und untersucht worden sind, aber auf Grundlage der Genetik bis dato keine eindeutigen Mechanismen für die Wirtsspezifität von den unterschiedlichen Serovaren gefunden werden konnten. Vielmehr ist die Translokation von pathogenen Keimen aus dem Darm in andere Organe von der Fähigkeit des Immunsystems abhängig, diese pathogenen Erreger zu kontrollieren.

2.2 Immunologische Grundlagen

2.2.1 Das Immunsystem

Zum Immunsystem gehören Gewebe, Zellen und auch Zellprodukte, welche das Eindringen infektiöser Agentia verhindern, das Überleben des Organismus sichern, an der ständigen Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen maßgeblich beteiligt sind und auch bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle spielen. Das Immunsystem erkennt und schützt vor einer Infektion durch Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten und unterscheidet somit zwischen Selbst und Fremd. Es antwortet dementsprechend mit Apoptose (Zelltod), Entzündung oder auch Anergie (Nichtreagieren auf ein Antigen) (Janeway *et al.*, 2002). Durch die Verhinderung der Erregervermehrung und auch deren Eradikation ist das Überleben eines jeden Organismus gesichert.



Das Immunsystem besteht erstens aus einem angeborenen Anteil, der phylogenetisch ältere Teil, welcher relativ unspezifisch aber schnell auf Eindringlinge reagiert und bei allen Metabionta zu finden ist. Zweitens aus dem erworbenen Anteil, welcher sich vor rund 400 Millionen Jahren entwickelte und in Knorpel- und Knochenfischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern vorkommt. Die erworbene Immunität reagiert verzögert, aber dafür spezifisch auf eine Erregereinwirkung. Beide Teile ergänzen sich gegenseitig, arbeiten sowohl mit humoralen als auch zellulären Komponenten und unterscheiden sich elementar in der Art und Weise, wie sie mögliche Erreger detektieren (Fearon und Locksley, 1996; Janeway, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002; Thompson, 1995) (Abb. 4).

Abb. 4 Übersicht zur angeborenen und adaptiven Immunantwort

Das Immunsystem sichert das Überleben eines jeden mehrzelligen höheren Organismus. Der angeborene Anteil reagiert zwar unspezifisch aber schnell auf Eindringlinge und kommt bei allen Metabionta vor. Der erworbene Anteil reagiert hingegen verzögert, aber spezifisch auf eine Erregereinwirkung. Beide Teile ergänzen sich gegenseitig und führen zur Immunität. Abbildung nach Janeway *et al.* (2002).

Zu den zellulären Komponenten zählen vor allem Leukozyten, die aus einer pluripotenten Knochenmarkstammzellpopulation hervorgehen. Hierzu gehören z. B. neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, welche bis zu ihrer Aktivierung im Blut zirkulieren und sich anschließend im Infektions- bzw. Entzündungsherd beteiligen. Mastzellen und Makrophagen beenden ihre Differenzierung aus Blutvorläuferzellen erst im Gewebe, wo sie

Entzündungsreaktionen auslösen können und an erster Front der immunologisch-zellulären Abwehr stehen. Hierbei erkennen Oberflächenrezeptoren der phagozytierenden Makrophagen bakterielle Bestandteile und induzieren folgend die Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen. Zytokine sind Proteine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die wiederum das Verhalten und den Aktivierungszustand anderer Immunzellen beeinflussen können. Chemokine, wie das Monozyten-anlockende Protein-1 (MCP-1) und IL-8, führen zur Migration von Blutzellen (neutrophile Granulozyten und Monozyten) zum Infektions- und Entzündungsort.

Diese lokal eingeleitete Entzündungsreaktion kann aber auch durch das Komplementsystem ausgelöst werden. Als Komplement werden eine Reihe von Gewebe- und Plasmaproteinen benannt, welche sich an die bakterielle Oberfläche binden können und proteolytische Folgereaktionen auslösen. Die Markierung mit Komplementbestandteilen allein wiederum erhöht zusätzlich die Phagozytoserate der eingedrungenen Erreger und wird als Opsonierung bezeichnet. Ebenfalls phagozytotische aber auch makropinozytotische Aktivität besitzen die dendritischen Zellen, diese können Antigene aufnehmen. Nach Antigenkontakt reifen sie und wandern meist in periphere lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten und mukosaassoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT)) aus, um diese Antigene folglich Lymphozyten (T- und B-Zellen) zu präsentieren. Erkennt eine patrouillierende T-Zelle ihr spezifisches von dendritischen Zellen präsentiertes Antigen, wird eine weiterführende adaptive Immunreaktion eingeleitet (Janeway *et al.*, 2002; Romagnani, 1992). Es ist hervorzuheben, dass die frühen angeborenen Abwehrsysteme auf unveränderlichen Rezeptoren beruhen, welche allgemein vorkommende Merkmale von Krankheitserregern erkennen. Deshalb setzen angeborene Mechanismen auch sofort ein, gefolgt von einer frühen induzierten Entzündungsreaktion. Die angeborenen Abwehrstrategien sind durch gefäßerweiternd wirkende Mediatoren, die zu einer Erhöhung der Flussrate der Lymphflüssigkeit und einem erhöhten Anteil an Komplementfaktoren führen, sowie durch die induzierte Aktivierung weiterer Immunzellen entscheidend für den weiteren Infektionsverlauf. Darüber hinaus sind ihre zellulären und humoralen Bestandteile zusätzlich in der Lage, die Infektion während der vier bis sieben Tage, die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen, in Schach zu halten (Janeway *et al.*, 2002; Medzhitov und Janeway, 2002). Im Laufe der Evolution entwickelten sich jedoch Pathogene, die diese erste immunologische Barriere überwinden konnten. Die angeborene Abwehr ist darüber hinaus nicht in der Lage, sich am Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses zu beteiligen. Die erworbene Immunität wiederum beruht auf der klonalen Selektion der Lymphozyten über antigenspezifische Rezeptoren. Sie besitzen also die Fähigkeit, die Pathogene spezifisch zu erkennen. Somit wird im Verlaufe eines Abwehrprozesses das Immunsystem selbst verändert und bietet damit einen stärkeren Schutz, vor allem bei einer erneuten Infektion (Medzhitov und Janeway, 1998; Jiang und Chess, 2009).

2.2.2 Das angeborene Immunsystem

Die allererste Hürde der Infektion und Besiedelung eines Organismus spiegelt sich im angeborenen Immunsystem wider, welches schon ab der Geburt vorhanden ist und nicht erst erlernt werden muss. Die angeborene Immunität beruht auf keimbahnkodierten Rezeptoren, der Detektion von hoch-konservierten Molekularstrukturen möglicher Erreger und der Expression von kostimulatorischen Molekülen und Entzündungsmediatoren. Diese verschiedenartigen Komponenten funktionieren in einer spezifisch aufeinander

abgestimmten Art und Weise, um eine Infektion erfolgreich zu verhindern. Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören zum einen myeloide Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen), natürliche Killerzellen als auch Epithel-, Endothelzellen sowie prinzipiell jede andere Körperzelle eines jeden Organismus. Hierzu zählen auch die physikalischen und chemischen Barrierefunktionen der Epidermis und Mukosa, wie beispielsweise die Ziliaraktivität, Motilität, Desquamation und die Mukussekretion. Eine Aktivierung dieser zellulären Komponente führt gleichzeitig auch zur Expression inflammatorischer Mediatoren, zur Opsonierung, zur Komplementaktivierung, zur Initiierung der Koagulationskaskade, zur Steuerung der Phagozytose und zur Apoptoseinduktion (Medzhitov und Janeway 2000; Janeway und Medzhitov, 2002).

Als natürliche Adaptionsantwort auf die sich verändernden Umwelt- und auch Wirtsbedingungen entwickelten sich potentielle Erreger, die diese erste Abwehrstrategie der Epithelien umgehen und somit Körperbarrieren überwinden können. Im Idealfall sorgen dann vor allem Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen für eine schnelle Neutralisation und Zerstörung des Eindringlings. Ein gesunder Organismus trifft genau genommen zeitlebens auf unzählige Mikroorganismen, nur wenige davon führen jedoch zu einer erkennbaren Erkrankung. Die meisten werden bereits nach wenigen Minuten bis Stunden vom angeborenen Immunsystem erkannt und zerstört, da es keine längerfristige Induktionszeit benötigt, wie bei der klonalen Expansion antigenspezifischer Lymphozyten. Die angeborenen Mechanismen setzen sofort ein (Zeitpunkt 0 bis zu 4 Stunden) und werden nach 4 bis zu 96h begleitet von der frühen induzierten Reaktion, welche zwar aktiviert wurde, jedoch ebenfalls nicht zu einer dauerhaften Immunität führen kann. Die keimbahnkodierten Rezeptoren der angeborenen Immunität erkennen vor allem häufig vorkommende Merkmale der Erreger, hier vor allem Saccharidstrukturen. Funktionell unterscheidet man hierbei: Rezeptoren, welche die Phagozytose stimulieren (Mannose-Rezeptoren, *Scavenger*-Rezeptoren), chemotaktische Rezeptoren (f-Met-Leu-Phe-Rezeptoren der Neutrophilen) sowie Rezeptoren, die eine Erzeugung von Effektormediatoren (ausschließlich signalgebende Rezeptoren) zur Folge haben (Janeway *et al.*, 2002; Janeway und Medzhitov, 2002). Beispielhaft sei dieses Phänomen in den nächsten Kapiteln an den auch in dieser Arbeit verwendeten Epithelzellen und Makrophagen als erste zelluläre Abwehrbarrieren eines jeden höheren tierischen Organismus kurz erläutert (Kap. 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Die Relevanz der angeborenen Immunität lässt sich an folgenden Beispielen verdeutlichen: Einerseits kommen Defekte im angeborenen Immunsystem in der Klinik sehr selten vor und sind häufig letal im Gegensatz zu Defekten des erworbenen Immunsystems (Autoimmunerkrankungen), andererseits fehlen den Invertebraten und Pflanzen die essentiellen Gene und die entsprechende Gewebearchitektur für eine adaptive Immunität. Dennoch gibt es mehr Invertebraten- und Pflanzenspezies als Vertebraten, was für die erfolgreiche Funktionalität des angeborenen Immunsystems spricht (Janeway und Medzhitov, 2002).

2.2.2.1 Abwehrstrategien der Epithelzellen und das Schleimhautimmunsystem

Epithelien bilden die erste physikalische Barriere und werden durch *Tight Junctions*, welche die Integrität des Epithellayers sichern, zusammengehalten. Innere Epithelien sind mit Glykoproteinen bedeckt, so genannten Muzinen, die eine Anhaftung von Mikroorganismen an das Epithel vermindern können (Gendler und Spicer, 1995). In den Atemwegen wird der

Mucus und damit mögliche Fremdbestandteile über die Ziliarakktivität der Epithelien ständig nach außen abtransportiert. Im Gastrointestinaltrakt ist es vor allem die Peristaltik, die eine Ansiedlung infektiöser Agenzien herabsetzt. Neben der Motilität ist auch eine Desquamation der Epithelzellen möglich sowie chemische Abwehrstrategien. Hierzu gehört das antimikrobiell-wirksame Lysozym, das in Tränen- und Speichelflüssigkeit zu finden ist. Auch der saure pH-Wert des Magens und die Verdauungsenzyme können das mikrobielle Wachstum verhindern. In der Tiefe der Dünndarmkrypten finden sich zusätzlich Panethzellen, welche antimikrobiell-wirksame Peptide wie Cryptine oder α -Defensine synthetisieren. Auch in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2), die in dieser Arbeit verwendet wurden, konnte die Expression von porcinen β -Defensinen als Antwort auf eine Salmonelleninfektion nachgewiesen werden (Veldhuizen *et al.*, 2009). Antimikrobielle Peptide wirken aufgrund ihrer amphipatischen Struktur sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien. Zu diesen antimikrobiellen Peptiden gehören neben den bereits erwähnten Defensinen auch das Dermcidin, Cathelicidin (LL37), Prophenin, Indolicidin und das Protegrin (Brogden *et al.*, 2003; Bulet *et al.*, 2004; Eckmann, 2005; Ouellette und Selsted, 1996; Schroder und Harder, 2006; Yang *et al.*, 2001).

Darüber hinaus besitzen Epithelzellen auf ihrer Oberfläche auch eine Vielzahl von Rezeptoren, welche für die angeborene Immunität essentiell sind. Einige hiervon wurde in Tab. 1 kurz zusammengefasst.

Tab. 1 Epitheliale Rezeptoren für die angeborene Immunität

Name	Bezeichnung	Funktion	Referenz
CD14, CD21 (C3dR), und CD35 (C3bR)	<i>Cluster of Differentiation</i> 14	Antigen-Präsentation und Metabolismus von Immunkomplexen	Martín-Villa <i>et al.</i> , 1997
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>	Antigen-Präsentation	Buning <i>et al.</i> , 2006
CD1d	<i>Cluster of Differentiation</i> 1d	MHC-I-ähnliches Molekül	Nieuwenhuis <i>et al.</i> , 2009; Perera <i>et al.</i> , 2007
TLR2	Toll- <i>like</i> Rezeptor 2 (TIL-4; CD282)	Erkennung von Lipoproteinen, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure	Friis <i>et al.</i> , 2009; Lee <i>et al.</i> , 2010; Tohno <i>et al.</i> , 2005
TLR3	Toll- <i>like</i> Rezeptor 3 (CD283)	RNA-Erkennung	Cario und Podolsky, 2000
TLR4	Toll- <i>like</i> Rezeptor 4 (Ly87, Rasl2-8, CD284)	Lipopolysaccharid (LPS)-Erkennung	Vamadevan <i>et al.</i> , 2010
TLR5	Toll- <i>like</i> Rezeptor 5 (TIL-3)	Flagellin-Erkennung	Bambou <i>et al.</i> , 2004
TLR9	Toll- <i>like</i> Rezeptor 9 (A6RP, CD289)	CpG-Oligodeoxynukleotid-Erkennung	Khorramizadeh <i>et al.</i> , 2007; Pedersen <i>et al.</i> , 2005
PAF-R	<i>platelet-activating factor receptor</i>	Rezeptor für <i>platelet-activating factor</i> , mukosale Entzündung	Merendino <i>et al.</i> , 1999
$\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptor	<i>alpha5beta1 integrin receptor</i>	Zelladhäsion	Guignot <i>et al.</i> , 2001

Das komplexe Schleimhautimmunsystem kann in eine Reihe unterschiedlicher funktioneller und anatomischer Kompartimente geteilt werden (Pabst, 1987). Das GALT im Speziellen beinhaltet den lymphatischen Rachenring, die PP im Dünndarm und Blinddarm sowie vereinzelt Lymphfollikel im Dickdarm. Zusätzlich finden sich in der *Lamina propria* des Darmes vereinzelt Lymphozyten und Plasmazellen.

Den PP kommt eine essentielle Bedeutung für immunologische Vorgänge im Gastrointestinaltrakt zu. Sie haben eine kuppelförmige, ins Lumen hineinragende Struktur und ein follikelassoziiertes Epithel mit spezialisierten Epithelzellen, den M-Zellen. Im Gegensatz zu den absorptiven Epithelzellen des Darmes besitzen M-Zellen keine apikalen Mikrovilli, sondern haben lediglich Mikrofalteln. Zudem fehlt ihnen die dicke Oberflächenglykokalyx. Sie sind kleiner, ragen nicht bis an die apikale Grenze der absorptiven Epithelzellen und produzieren keine schützende Schleimschicht. M-Zellen sind demnach darauf ausgerichtet, direkt mit Molekülen und Partikeln des Darmlumens in Kontakt zu treten. Diese werden phagozytotisch aufgenommen und über Transzytose an basal gelegene Lymphozyten und antigenpräsentierende Zellen abgegeben (Vighi *et al.*, 2008). Innerhalb eines Kompartimentes bleiben Immunantworten weitestgehend begrenzt, da sich meist spezifische Lymphozytenpopulationen in den unterschiedlichen Kompartimenten befinden.

Bei der Besprechung der Schleimhautimmunologie sind zwei entscheidende Faktoren zu beachten: Erstens ist die Schleimhautoberfläche ein Leben lang einem breiten Spektrum an Nahrungsantigenen ausgesetzt und zweitens wird der Darm von $\sim 10^{14}$ kommensalen Mikroorganismen besiedelt, welche zum einen mit den Pathogenen im Darm um ökologische Nischen und Anheftungsstellen konkurrieren und zum anderen dem Wirt durch beispielsweise die Synthese von Vitamin-K- oder Vitamin-B-Komplex-Bestandteilen von Nutzen sind (Alwis und Thomlinson, 1973 und 1975; Dhillon und Dhillon, 1981; Sanchez *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Abwehrstrategien der Makrophagen

Makrophagen reifen kontinuierlich aus zirkulierenden Blutmonozyten heran, sind im Vergleich zu den neutrophilen Granulozyten langlebig und kommen vor allem im Bindegewebe des Gastrointestinal- und Atmungstraktes, in der Milz und als Kupffer-Zellen in der Leber vor. Zu den spezialisierten Makrophagen gehören beispielsweise die Lipophagen und Siderophagen, die Langerhans-Zellen in der Haut, die Osteoklasten und Chondroklasten, die Neuronophagen (z. B. Mikroglia), die Hofbauer-Zellen der Plazenta sowie die A-Synoviozyten (Janeway *et al.*, 2002). Durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose und der daraus resultierenden Aktivierung weiterer phagozytischer Zellen kommt ihnen eine besondere Rolle bei der Immunabwehr zu. Bakterien beispielsweise werden nach Überwinden der Oberflächenepithelien sofort von Zellen und Molekülen des angeborenen Immunsystems angegriffen. Makrophagen gehören hierbei zu den ersten Phagozyten im Entzündungsgeschehen (Medzhitov und Janeway, 2000). Als spezialisierte Phagozyten besitzen sie spezifische Oberflächenrezeptoren, wie die Makrophagen-Mannoserezeptoren (C-typspezifisches Lectin), die *Scavenger*-Rezeptoren für geladene Liganden, die Glukanrezeptoren, das CD14-Molekül (*cluster of differentiation-14*) und CD11b/CD18 (CR3-Komplementrezeptor) für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Mikroorganismen

können aber auch über die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR4 (CD11c/CD18), CR3a und 5a erkannt und folglich phagozytiert werden (Ferluga *et al.*, 1976; Huber-Lang *et al.*, 2002; Husemann *et al.*, 2001; Riedemann *et al.*, 2002; Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). Phagozytierte Mikroorganismen werden daraufhin durch Ansäuerung im Phagosom oder durch die Bildung eines Phagolysosoms abgetötet oder in ihrem Wachstum gehemmt. Dafür geht die Zelle einen sauerstoffverbrauchenden Prozess ein, der auch Respiratorische Entladung (*respiratory burst*) genannt wird und zur Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen wie dem Superoxid O_2^- , dem Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder auch dem Stickstoffmonoxid NO führt. Die Fähigkeit der Wirtszellen, NO zu produzieren, stellt einen wachstumsinhibierenden Faktor für intrazelluläre Salmonellen dar (Eriksson *et al.*, 2000). Zusätzlich werden von den Makrophagen Defensine und Enzyme (hier vor allem Lysozym, saure Hydrolasen) sowie Lactoferrin, welches mit den Mikroorganismen um essentielle Nährstoffe wie Eisenionen konkurriert, synthetisiert (Ganz *et al.*, 1986; Hiemstra und van Furth, 1994). Zweiter wichtiger Bestandteil der Makrophagenabwehr ist die durch deren Aktivierung ausgelöste Sezernierung von Zytokinen und anderen Mediatoren sowie die Expressionsinduktion kostimulatorischer Moleküle. Zu den von Makrophagen freigesetzten Zytokinen gehören das IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α und das chemotaktisch wirksame IL-8 (Cavaillon, 1994; van der Meide und Schellekens, 1996). Die eingeleitete Entzündungsreaktion durch die Mediatoren beinhaltet: erstens eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers und damit verbunden ein vermehrter Blutfluss mit einer verringerten Flussgeschwindigkeit; zweitens eine Erhöhung der Gefäßwanddurchlässigkeit für Zellen und auch für Komplementmoleküle; drittens eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche sowie eine dadurch vermittelte Extravasation; viertens eine Einleitung der Akuten-Phase-Reaktion und fünftens eine Aktivierung von weiteren Entzündungszellen. Dadurch wird deutlich, dass die von den Makrophagen freigesetzten Immunmodulatoren jeweils die nächste Phase der Immunabwehr bestimmen (Janeway *et al.*, 2002).

Es sei erwähnt, dass zwischen unterschiedlichen Makrophagen-Subpopulationen unterschieden wird. Hierbei spricht man von klassisch-aktivierten Makrophagen, auch CAMPhi- oder M1-Makrophagen genannt, und alternativ-aktivierten Makrophagen, auch AAMPhi- oder M2-Makrophagen. Erstere entstehen durch die Stimulation mit LPS oder Interferon- γ (IFN- γ), man spricht hier von der Typ I-Aktivierung über so genannte T_H1 -Zytokine. Die Typ II-Aktivierung über T_H2 -Zytokine (IL-4, IL-13) oder auch Glukokortikoide führt zu den M2-Makrophagen. Die Subpopulationen unterscheiden sich in ihren Genexpressionsmustern sowie in der Verschiedenartigkeit der Expression von Mediatoren und Oberflächenrezeptoren (Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008). Unterschiedliche Genexpressionen zeigten Makrophagen auch auf verschiedenartige Stimulationen wie durch LPS, IFN- γ und *Leishmania chagasi* Infektion (Rodriguez *et al.*, 2004). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass auch Makrophagen eine selektierende Reifungsphase besitzen, so dass einzelne spezialisierte Subpopulationen entstehen, welche wiederum nicht in der Lage sind, ihr volles früheres funktionelles Spektrum auszuschöpfen.

2.2.3 Pattern Recognition Receptors - PRRs

Die keimbahnkodierten Rezeptoren der angeborenen Immunität, welche zu den verschiedensten Proteinfamilien gehören, werden als *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) bezeichnet. Diese Rezeptoren detektieren hoch-konservierte Molekularstrukturen von

möglichen Erregern, auch *microbial-associated molecular patterns* (MAMPs) genannt. Da MAMPs nur von Mikroben und nicht vom Wirtsorganismus produziert werden, führt die Detektion von MAMPs direkt zur Aktivierung von Effektormechanismen wie der Phagozytose, der Opsonierung, der Aktivierung der Komplement- oder Koagulationskaskade, der Synthese von antimikrobiellen Peptiden, der Aktivierung der Stickstoffoxid-Synthetase in Makrophagen, der vermehrten Expression von Zytokinen, Chemokinen sowie von kostimulatorischen Molekülen und der Induktion der Apoptose (Janeway und Medzhitov, 2002; Lavelle *et al.*, 2010). Zu den PRRs zählen:

(1) lösliche Rezeptoren wie das LPS-bindende Protein (LBP) im Plasma, die Pentraxine wie z. B. C-reaktives Protein (CRP) und Serumamyloid-Proteine, die Komplementfaktoren, die Kollektine wie das mannanbindende Lektin (MBL, C1q),

(2) aber auch membranassoziierte Rezeptoren wie die Toll-*like* Rezeptoren (TLR, Kap. 2.2.3.1), die *Scavenger*-Rezeptoren der SR-A-Familie (Detektion von polyanionischen Liganden, dsRNA, LPS und Lipoteichonsäure) wie MARCO-Rezeptoren und die Makrophagen-Mannose-Rezeptoren (MMR, membrangebundenes Lektin vom C-Typ),

(3) sowie die intrazellulären Rezeptoren, zu denen die Proteinkinase PKR (Detektion von dsRNA), der 2'-5'-Oligoadenylatsynthase-(OAS)/RNaseL-Pfad, die NOD-Proteine (Kap. 2.2.3.2), die *retinoic-acid-inducible gene 1* (RIG-I)-ähnlichen Proteine und das *melanoma-differentiation associated gene-5* (MDA-5) zählen (Andrejeva *et al.* 2004; Bertin *et al.*, 1999; Clemens und Elia, 1997; Eckmann, 2004; Fraser *et al.*, 1998; Holmskov, 2000; Hornung *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2006; Medzhitov und Janeway, 2002; Meylan *et al.* 2006; Pearson, 1996; Schwalbe *et al.*, 1992).

In der Literatur wird vermehrt der Begriff *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) für MAMPs verwendet. PRRs sind jedoch von ihrem funktionellen und strukturellen Aufbau her nicht dazu in der Lage, zwischen pathogenen und kommensalen Mikrobenbestandteilen zu unterscheiden, deshalb wird in dieser Arbeit der Begriff MAMPs bevorzugt. Zu den MAMPs zählen beispielsweise LPS, Lipoteichonsäure, Flagellin, Nukleinsäuren und Peptidoglykane (PGN). Diese führen nach ihrer Detektion zur sofortigen Aktivierung von Effektormechanismen (Akira *et al.* 2006; Basset *et al.* 2003; Takeda *et al.* 2003).

2.2.3.1 Toll-*like* Rezeptoren - TLRs

Im Zusammenhang mit embryonalen Untersuchungen an der dorsoventralen Achsenformierung der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurde das erste Mitglied der Toll-Familie entdeckt (Belvin und Anderson, 1996; Hashimoto *et al.*, 1988; Rock *et al.*, 1998). Spätere Untersuchungen ergaben auf Grundlage der Strukturäquivalenz zwischen *Drosophila* Toll und humanem IL-1-Rezeptor eine Rolle von Toll bei der angeborenen Immunabwehr der Taufliege (Anderson, 2000; Lemaitre *et al.*, 1996). Selbst bei Pflanzen und Säugern fand man später Toll-ähnliche Proteine, weshalb Toll als ein evolutionsbiologisch älterer Signalübertragungsweg des angeborenen Immunsystems gilt (Janeway und Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2001). TLRs werden vor allem von Zellen der angeborenen Immunantwort exprimiert, hierzu zählen Makrophagen, dendritische Zellen aber auch Endo-

und Epithelzellen. Nachweislich exprimieren intestinale epitheliale Zellen TLR2, 4, 5, 7 und 9 und auch NOD2 (Cario *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007; Palazzo *et al.*, 2008; Swerdlow *et al.*, 2006).

Da die TLRs transmembranäre Moleküle sind, erfolgt die Erkennung von Selbst oder Fremd direkt an der Zelloberfläche oder aber in endosomalen und vesikulären Kompartimenten der Zelle (Akira *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2003). MAMPs interagieren mit der extrazellulären *leucine-rich repeats* (LRR)-Domäne der TLRs, anschließend wird durch die Wechselwirkung des Rezeptors mit weiteren Proteinen die Signaltransduktion initiiert (Eckmann, 2004). Derzeit werden 15 TLRs in humanen und murinen Geweben unterschieden, welche in ihrer Ligandspezifität, dem Expressionsmuster und den Zielgenen differieren (Eckmann, 2006; Forchielli und Walker, 2005; Heine und Ulmer, 2005; Higgs *et al.*, 2006; Jann *et al.*, 2009; Kawai und Akira, 2005; Medzhitov *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2009). TLR4 signalisiert das Vorhandensein von LPS durch Assoziation mit CD14, dem Makrophagenrezeptor für LPS, und dem MD-2-Protein (Hornef *et al.*, 2002). Hierbei bindet CD14 über leucinreiche Struktur motive an LBP-gebundenes LPS. Dieser CD14:LPS-Komplex wird von TLR4 und der extrazellulären Domäne MD-2 detektiert und führt zur Induzierung einer Signalkaskade, welche schließlich den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (da Silva *et al.*, 2001; Lien *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; Shimazu *et al.*, 1999). Die Aufnahme und die Translokation von LPS in intestinale Epithelzellen über CD14 und TLR4 von der apikalen Seite wurde von Tomita *et al.* (2004) und Neal *et al.* (2006) belegt. Im Gegensatz zur Homodimerisation von TLR4 bildet TLR2 Heterodimere mit dem TLR1 oder TLR6 für die Detektion von Peptidoglykanen, Lipoproteinen, Zymosan (Zellwandbestandteil von Hefen) und dem LPS von *Porphyromonas* und *Leptospira* Spezies (Aliprantis *et al.*, 1999; Ozinsky *et al.*, 2000; Schwandner *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2001; Werts *et al.*, 2001). Der TLR5 erkennt Flagellin, den Proteinbestandteil bakterieller Flagellen, hingegen TLR9 identifiziert vorrangig in intrazellulären Zellkompartimenten unmethylierte CpG-DNA (Hayashi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2000; Krieg, 2000; Shimosato *et al.*, 2005).

TLRs besitzen eine zytoplasmatische Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, welche bei Rezeptor-Ligand-Interaktion an die TIR-Domäne eines Adaptorproteins bzw. *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) bindet (Medzhitov *et al.*, 1998). Solch aktiviertes MyD88 interagiert mit seiner Todesdomäne daraufhin mit der Serin/Threonin-Kinase der Proteine der angeborenen Immunität, welche auch als *interleukin-1 receptor associated kinase* (IRAK) bezeichnet werden (Wesche *et al.*, 1997). Diese Anregungsreaktion führt zur Autophosphorylation der Moleküle IRAK-1, IRAK-4 und damit zur Induktion vom TNF-Rezeptor-assoziierten-Faktor 6 (TRAF6) und der TGF- β -aktivierten-Kinase 1 (TAK1) (Deng *et al.*, 2000; Irie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Lomaga *et al.*, 1999). TAK1 aktiviert daraufhin zum einen die c-Jun-Kinase (JNK), Anteil der *mitogen-activated-protein kinase* (MAPK)-Kaskade, den *NF- κ B essential modulator* (NEMO) und moduliert somit die I κ B-Kinasen (IKK α ,- β ,- γ) (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999). Schließlich führt dies zur Bildung eines I κ k α - und I κ k β -Kinasendimers, welcher wiederum das inhibitorische Molekül I κ B phosphoryliert. Die Phosphorylierung von I κ B bedingt eine Dissoziation vom zytosolisch vorkommenden I κ B-Komplex und führt somit zur Freisetzung von NF- κ B. Freies NF- κ B dringt wiederum in den Zellkern ein und bindet dort an verschiedene Promotoren, wodurch Gene aktiviert werden, die vor allem bei der angeborenen aber auch bei der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen. Neuere Untersuchungen zeigten, dass eine

TLR-Aktivierung auch über MyD88-unabhängige Signalkaskaden möglich ist. Dies erfolgt über die TIR-Domänen tragenden Proteine: *TIR domain-containing adaptor protein* (TIRAP)/*MyD88-adaptor like* (Mal), *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF related adaptor molecule* (TRAM) und *Toll-interacting protein* (Tollip) (Akira, 2006; Burns *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002).

NF- κ B wiederum induziert die Expression von Entzündungsmediatoren (TNF- α , IL-1,-12, E-Selektin), antimikrobiellen Peptiden, kostimulatorischen Molekülen und auch MHC-Molekülen (Ghosh *et al.*, 1998). Neben NF- κ B werden meist noch weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert, darunter (1) die zur *activating-protein-1* (AP-1)-Familie gehörenden Jun- und Fos-Mitglieder, welche an die 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate-*response-elements* oder über CREB/ATF an *cAMP-response-elements* binden (Karin *et al.*, 1997), (2) außerdem das NF-IL6, welches zur Gruppe der C/EBP-Transkriptionsfaktoren gehört und an den IL-6 Genpromotor im Zellkern bindet, (3) sowie Mitglieder der IRF-Familie (Poli, 1998; Taniguchi *et al.*, 2001).

2.2.3.2 Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) - Proteine

Die *nucleotide-binding-oligomerization-domain* (NOD)-Proteine zählen zu der Gruppe der *nucleotide-binding-domain-leucine-rich-repeats* (NLR)³-Proteine, welche ein immunologisches, intrazelluläres Detektionsystem der Zellen darstellen. Phylogenetisch gehören sie zur Proteinfamilie der CATERPILLER⁴, wie auch die strukturell homologen R-Proteine der Pflanzenabwehr sowie die MHC-II-Transaktivatorgene (CIITA), Naip- und die Nalp-Proteine der Mammalia (Athman und Philpott, 2004; Chamaillard *et al.*, 2003a; Murray, 2005). Die NLRs werden aufgrund ihrer Effektor-domänen: (1) *caspase-activating-and-recruitment-domain* (CARD), (2) *pyrin-domain* (PYD) oder (3) *baculovirus-inhibitor-of-apoptosis-repeats* (BIR) klassifiziert (Sirard *et al.*, 2007; Ting *et al.*, 2008). Aufgrund von genomischen Sequenzdaten und dem Vergleich mit dem Nematodenprotein CED-4 und dem dazugehörigen Säugerhomologon Apaf-1 wurde durch Inohara *et al.* (1999) erstmals das NOD1-Protein beschrieben.

NOD-Proteine weisen einen typischen dreiteiligen NLR-Aufbau auf, bestehend aus einer C-terminalen *leucine-rich-repeat* (LRR)-Domäne, einer zentralen *nucleotide-binding oligomerization* (NACHT⁵)-Domäne und einer N-terminalen Proteininteraktionskassette CARD. Die LRR-Domäne gehört zur Gruppe der Ribonuklease-Inhibitor (RI)-ähnlichen LRR und formiert sich als nicht globuläre, hufeisenförmige Struktur. Die LRR-Domänen von NOD1 und NOD2 besitzen folgende in der Abb. 5 dargestellte Sekundärstruktur mit der Konsensussequenz: xxxLxxLxLxxNxLxxxgoxxLxxoLxx (Kajava, 1998; Kobe und Kajawa, 2001).

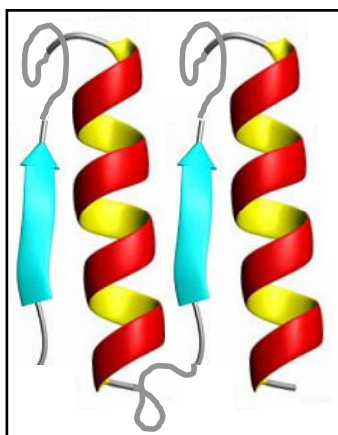


Abb. 5 RI-ähnliche LRR-Struktur (adaptiert an Kajava, 1998)

³ NLR steht auch für NB-LRR-*related gene family* in Anlehnung an die NB-LRR Proteine der Pflanzen

⁴ CATERPILLER = CARD(*caspase-recruitment domain*) *transcription enhancer*, **R**(*purine*)-*binding*, **pyrin**, *lots of leucine repeats*

⁵ NACHT = *neuronal apoptosis inhibitor protein* (NAIP), MHC class II *transcription activator* (CIITA), *incompatibility locus protein from Podospora anserina* (HET-E), *telomerase-associated protein* (TP-1)

Die zentrale NACHT-Domäne ist eine P-Schleife und gehört zur Klasse der STAND⁶-Moleküle der NTPasen (Leipe *et al.*, 2004). Bisher wurden aufgrund genomischer Vergleichsuntersuchungen 25 humane NLR-Varianten entdeckt (Franchi *et al.*, 2006b; Wagner *et al.*, 2009).

NOD1, auch als *caspase-recruitment-domain 4* (CARD4) bezeichnet, wird ubiquitär im adulten Organismus exprimiert, hier vor allem in antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Epithelzellen. In unstimulierten haematopoetischen Zellen gelang im Gegensatz zu Lymphozyten bislang kein NOD1-Expressionsnachweis (Gutierrez *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001b). Die Expression von NOD1 wird durch IFN- γ , nicht jedoch durch TNF- α hoch reguliert (Hisamatsu *et al.*, 2003a).

Im Gegensatz zu NOD1 besitzt NOD2, auch *caspase-recruitment-domain 15* (CARD15) genannt, zwei N-terminale CARD-Domänen (Inohara *et al.*, 2003). NOD2 wird vermehrt in Zellen der myeloiden Reihe exprimiert. Die Expression kann jedoch auch in intestinalen Epithelzellen induziert werden. In primären epithelialen Zellkulturen scheint die NOD2-Expression auf die Panethzellen, welche erwiesenermaßen durch die Defensinproduktion eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr spielen, beschränkt zu sein (Ogura *et al.*, 2003a). Im Jahr 2009 wurde erstmals die Expression von NOD2 in humanen CD34⁺-Knochenmarkszellen, in Mikroglia und Astrozyten des Zentralen Nervensystems beschrieben (Chauhan *et al.*, 2009; Sioud und Fløisand, 2009). Die basale Expression wird durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ verstärkt (Rosenstiel *et al.*, 2003).

NOD1- und NOD2-Moleküle detektieren intrazytoplasmatisches bakterielles Peptidoglykan (PGN) (Inohara *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2005a). Bakterielles PGN der Zellwand besteht aus N-Acetylglukosamin-(β 1 \rightarrow 4)-N-Acetylmuraminsäuremolekülen, welche untereinander durch kleine Peptidketten verbunden sind. Bezogen auf die Aminosäure an der dritten Stelle der Peptidkette werden die Peptidoglykane von verschiedenen NOD-Proteinen erkannt: Meso-Diaminopimelinsäure (mDAP, γ -D-Glutamyl-meso-DAP), ausschließlich in gramnegativen Mikroorganismen vorkommend, wird von NOD1 detektiert. NOD2 hingegen interagiert mit Muramyldipeptiden (MDP, N-Azetilmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin), ein Zellwandbestandteil von gramnegativen und -positiven Bakterien (Chamaillard *et al.*, 2003b; Girardin *et al.*, 2003a; Girardin *et al.*, 2003b; Inohara *et al.*, 2003). Wolfert *et al.* (2007) zeigten hierzu in transfizierten HEK293T-Zellen eine deutliche NF- κ B-Aktivierung durch die Stimuli MDP oder DAP. Durch Bindung von PGN an die LRR-Domäne kommt es jedoch zunächst zur Homooligomerisation der zentralen NACHT-Domäne im NOD-Protein, hierbei spielt die NACHT-assoziierte ATP-Hydrolyseaktivität eine essentielle Rolle (Ting und Davis, 2005). Eine Heterooligomerisation der NACHT-Domäne mit anderen NLR kann bis dato nicht ausgeschlossen, konnte jedoch auch noch nicht experimentell bewiesen werden (Damiano *et al.*, 2004). Die Aktivierung der zentralen NACHT-Domäne ermöglicht die homophile Protein-Protein-Interaktion der CARD-Domäne mit dem Zielprotein. Eines dieser Zielproteine ist z. B. *receptor-interacting-serine/threonine-kinase* (RICK, oder Rip2) (Nembrini *et al.*, 2009). Neueste Untersuchungen zeigten, dass Mitglieder der *inhibitor-of-apoptosis-protein* (IAP)-Familie wie z. B. XIAP oder cIAPs zwischen NOD und Rip2 vermittelt (Bertrand *et al.*, 2009; Krieg *et al.*, 2009). Aktiviertes Rip2 wiederum führt über die Polyubiquitylierung am Lysin₂₈₅ von IKK γ , Bestandteil von NEMO, zur Phosphorylierung von I κ B und damit zur

⁶ STAND = *signal transduction ATPases with numerous domains*

Freisetzung von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Chin *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2002) (Abb. 6).

Freies NF- κ B transloziert in den Zellkern und führt dort zur vermehrten Expression proinflammatorischer Gene, wie Zytokinen (IL-1 α , IL-6, TNF- α und vor allem IL-8), und von antimikrobiellen Peptiden (Defensine). Die Expression von IL-1 β und IL-18 in APC hingegen wird vornehmlich durch die Interaktion von NOD2 mit dem Zielprotein Procaspase-1 verwirklicht (Yoo *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die NOD1-Aktivierung nachweislich essentiell für die Immunzellrekrutierung in das entzündete Gewebe (Masumoto *et al.*, 2006).

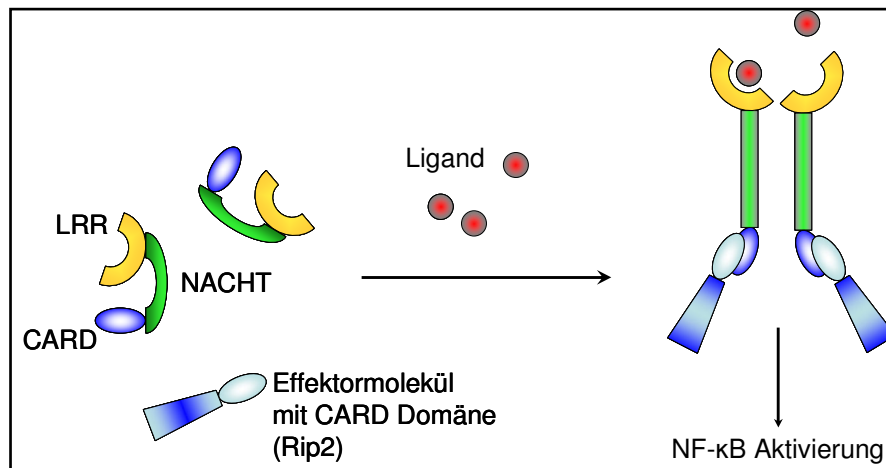


Abb. 6 Schematischer Überblick der NOD-Funktion

Die Ligandenbindung an die LRR-Domäne führt zur Homooligomerisation der zentralen NACHT-Domäne und ermöglicht somit die homophile Protein-Protein-Interaktion der CARD-Domäne mit dem Zielprotein. Adaptiert an Inohara und Nunez (2003).

Neben der NF- κ B-Aktivierung wird auch eine Stimulation des MAPK-Signalweges durch NOD-Proteine diskutiert, da NOD2-defiziente Makrophagen im Gegensatz zum Wildtypstamm keine p38MAPK- und ERK-Aktivierungen hervorrufen können (Pauleau und Murray, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005). Zusätzlich konnten Girardin *et al.* (2001) nachweisen, dass eine NOD1-Aktivierung im Zusammenhang mit invasiven Bakterien den JNK-Signalweg stimulieren kann. Inohara *et al.* (1999) zeigten, dass NOD1 ebenfalls mit der CARD-Domäne der Caspase-9 interagieren kann, ohne direkt den Apoptosemechanismus auszulösen. Allerdings kommt es zu verstärkten Apoptosereaktionen, wenn beide Moleküle koexprimiert werden. Mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung gelang der Nachweis, dass NOD1 sowohl im Zytosol als auch kolokalisiert mit der Plasmamembran in humanem Zellmaterial vorkommt. Hierbei ist die Membraninteraktion abhängig von der Proteinintegrität, der Signalkapazität und einem intakten zytoskelettalen Aktingerüst (Kufer *et al.*, 2008). Über zytoplasmatisch vorkommende MAMPs werden die Moleküle NOD1, NOD2 und Nalp3 aktiviert (Martinon *et al.*, 2004; Philpott und Girardin, 2004). Obwohl Inohara *et al.* (2001) für NOD zeigten, dass das Vorhandensein einer LRR-Domäne für deren Aktivierung mit MAMPs essentiell ist, existiert bis dato kein experimenteller Nachweis für die direkte Interaktion von bakteriellen Produkten an die LRR-Domäne, so dass mögliche Komplexe bei der Signaltransduktion und Aktivierung von NOD-Molekülen nicht ausgeschlossen werden können. Von Kobe und Kajawa (2001) wurde vermutet, dass die LRR-Domäne als Protein-Protein-Interaktionsdomäne fungiert. Vergleicht man jedoch die Signaltransduktion der R-Proteine bei Pflanzen, die Verwendung von *cis-acting* Kofaktoren bei der LPS-Signalisierung oder auch der *trans-acting* Kofaktoren beim Spätzle-Protein von *Drosophila*, so erscheint eine indirekte Interaktion der NOD mit den Agonisten viel wahrscheinlicher als eine direkte Interaktion (Akira und Takeda, 2004; Meyers *et al.*, 1999).

Da NOD-Proteine kein Signalpeptid besitzen, kommen sie rein zytosolisch in der Zelle vor (Inohara und Nunez, 2003; Tohno *et al.*, 2008a und 2008b). Für die Detektion der MAMPs durch NOD-Proteine, müssen die PGN in das Zytosol der Wirtszellen gelangen. In *Drosophila* konnte diese Aufgabe der NOD-vermittelten PGN-Erkennung nur dem *peptidoglycan recognition protein* zugesprochen werden (Choe *et al.*, 2002; Leulier *et al.*, 2003). Durch die Arbeiten von Philpott und Girardin (2004) und Martinon *et al.* (2004) konnten für die Moleküle NOD1, NOD2 und Nalp3 der Nachweis über deren Aktivierung durch zytoplasmatisch vorkommende MAMPs erbracht werden. Nach Viala *et al.* (2004) und auch Girardin *et al.* (2001) ist eine intrazelluläre NLR-Aktivierung auch über das Einschleusen von bakteriellen Muropeptiden mit Hilfe von Typ III- oder IV-Sekretionssystemen möglich. Darüber hinaus wurde in humanen intestinalen Zellen ein apikales Transmembranprotein, der Peptidtransporter 1 (PepT1) identifiziert, welches die Aufnahme von Di- und Tripeptiden in die Zellen ermöglicht. In diesem Zusammenhang wiesen Vavricka *et al.* (2004) und Ismail *et al.* (2006) nach, dass durch humanes PepT1 bakterielles Muramyldipeptid intrazellulär zu einer NOD2-abhängigen IL-8 Freisetzung führte. Die Arbeitsgruppe um Swaan *et al.* (2008) konnte für den transmembranären Transport von γ -iE-DAP den protonenabhängigen Transporter PepT2 in epithelialen Zellen identifizieren. Die Translokation über PepT2 führte zu einer NOD1- und Rip2-abhängigen Aktivierung der angeborenen Immunmechanismen der Zelle. Darüber hinaus ist eine NOD-Ligandentranslokation durch einen Clathrin-Dynamin-abhängigen Endozytoseprozess reguliert über das SLC15A4, ein Oligopeptidtransporter der frühen Endosomen möglich (Lee *et al.*, 2009; Marina-Garcia *et al.*, 2009). DAP-haltige Mikroben sezernieren NOD-Liganden in die Umwelt, diese wiederum könnten folglich über Endozytose intrazellulär aufgenommen werden und eine angeborene Immunantwort auslösen (Pradipta *et al.*, 2010). Für die in dieser Arbeit verwendeten sechs verschiedenen Zellkulturen existieren derzeit keine Literaturhinweise zum Vorkommen von PepT1/2 und/oder SLC15A4.

Die entscheidende Rolle der NOD-Proteine und auch anderer NLR-Proteine für den Organismus lässt sich am Eindrucksvollsten verdeutlichen bei einem Funktionsverlust (Delbridge und O’Riordan, 2007). So sind beispielsweise die Genmutationen in der CARD4-Domäne (NOD1) assoziiert mit Asthma und atopischer Dermatitis beim Menschen (Joosten *et al.*, 2008; Macaluso *et al.*, 2007). Eine mutationsbedingte Anomalie im Bereich der LRR-Domäne im CARD15 (NOD2) führt zu einer Schädigung dieser entsprechenden Erkennungsstrukturen. Diese Mutationen finden sich vermehrt bei Patienten mit der familiären Form der Morbus-Crohn-Krankheit. Zwar zeigte sich durch *in vitro* Überexpressionsversuche an NOD2 eine deutliche Steigerung der NF- κ B-Aktivierung, doch die humanen Mutationen von NOD2 führten wiederum zu einer gestörten Funktion der NOD2-Proteine. Die Unempfindlichkeit gegenüber Muramyldipeptiden, ausgelöst durch die NOD-Mutation, bewirkt eine verstärkte Reaktion und damit die intestinale Entzündung. Ebenfalls mit einer NOD2-Mutation geht nach Miceli-Richard *et al.* (2001) das Blau-Syndrom einher (Chamaillard *et al.*; 2003c; Hugot *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2005; Negroni *et al.*, 2009; Ogura *et al.*, 2001a).

Darüber hinaus zeigten NOD2-defiziente Mäuse keine pathologisch-morphologischen Veränderungen nach MDP-Stimulus und auch keinen Sensibilisierungseffekt mehr auf LPS-Stimuli durch die vorherige Gabe von geringen Dosen MDP (Kobayashi *et al.*, 2005). NOD2

ist über die MDP-Stimulierung vermutlich eher für die Zytokinproduktion und Entzündungsantworten zuständig und besitzt nur einen geringeren Einfluss auf die Zellapoptose (Bodar *et al.*, 2008). Chauhan *et al.* (2009) wiesen nach, dass NOD2-Moleküle in Mikroglia und Astrozyten für eine inflammatorische Antwort auf Infektionen mit *Neisseria meningitidis* und *Borrelia burgdorferi* verantwortlich sind. Kobayashi *et al.* (2005) konnten bei NOD2-defizienten Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer oralen, nicht aber systemischen *Listeria*-Infektion nachweisen. Gleichzeitig wiesen die infizierten NOD2-defiziente Mäuse eine abweichende Defensin-Produktion auf. In diesem Zusammenhang zeigten Zilbauer *et al.* (2007), dass NOD1 für die Immunabwehr bei *Campylobacter jejuni* essentiell ist und dass die Anzahl intrazellulärer Erreger durch siRNA gegen NOD1 vermehrt wurden. NOD1- und NOD2-defiziente Tiere reagieren darüber hinaus empfindlicher auf eine *Chlamydomphila pneumoniae* Infektion (Shimada *et al.*, 2009). NOD-Proteinen kommt bei der ersten immunologischen Abwehr eine bedeutende Rolle zu. Auch bei parasitären Infektionen mit *Plasmodium berghei*, als Modell für eine zerebrale Malariainfektion, konnte nachgewiesen werden, dass NOD1/NOD2-defiziente Tiere zwar keine veränderten klinischen Symptome, jedoch geringere IFN- γ Mengen *p. i.* aufwiesen (Finney *et al.*, 2009). Shaw *et al.* (2009) konnten darüber hinaus zeigen, dass NOD2 essentiell bei der T-Zellantwort auf eine *Toxoplasma gondii* Infektion ist. CATERPILLER stellen somit einen essentiellen Beitrag zur immunologischen Abwehr dar.

2.2.3.3 Interaktionen von PRRs

Nachfolgend seien weitere NLR-Proteine, welche mögliche Interaktionen mit NOD eingehen, kurz erläutert: **CARD9** wurde bis dato in Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen und ist an der Aktivierung der p38MAPK und JNK beteiligt. Hsu *et al.* (2007) gelang der Nachweis, dass CARD9 mit NOD2- und Rip2-Molekülen interagiert und zu einer MDP-abhängigen Aktivierung dieser MAPK, jedoch nicht des NF- κ B führte. CARD9 könnte in diesem Zusammenhang ein Kontrollelement bei der Regulierung der angeborenen Immunantwort innerhalb eines betrachteten Zellsystems sein. Darüber hinaus wird dem CARD9 ebenfalls eine Rolle bei der antimykotischen Immunabwehr zugeschrieben (Gross *et al.*, 2006). Das Protein **Erbin** interagiert nachweislich mit NOD2 und fungiert hierbei als negativer Regulator der NOD2-abhängigen NF- κ B-Aktivierung. Eine Shigelleninfektion hat Einfluss auf die Erbin/NOD2-Komplexbildung (Kufer *et al.*, 2006; McDonald *et al.*, 2005b). Erbin ist eigentlich bekannt bei Zelldifferenzierungs- und Zellwachstumsprozessen und auch beim MAPK-Signalweg (Huang *et al.*, 2003; Kolch, 2003). **CARD12** (auch **IPAF**, *ICE-protease-activating-factor*) hingegen besitzt eine NOD1-ähnliche Struktur und spielt eine Rolle bei der Detektion von intrazellulären Pathogenen, wie z. B. *S. Typhimurium*. Im Gegensatz zu NOD wird Flagellin als Agonist für eine IPAF-Aktivierung vermutet (Franchi *et al.*, 2006a; Miao *et al.*, 2008; Sutterwala *et al.*, 2009). Als Effektormolekül benutzt IPAF das Apoptose-assoziierte Speck-ähnliche Protein (ASC), welches wie Rip2 zur Aktivierung von NF- κ B führt. Andere Arbeitsgruppen vermuteten, dass IPAF die NOD-abhängige NF- κ B-Aktivierung und IL-1 β -Produktion hemmen kann und somit als Regulator der NOD-Antwort fungiert (Damiano *et al.*, 2001; Damiano *et al.*, 2004; Strober *et al.*, 2006). Das **GRIM-19**-Protein (*gene-associated-with-retinoid-IFN-induced-mortality-19*) interagiert spezifisch mit NOD2, nicht jedoch mit NOD1, und stimuliert folglich eine NF- κ B-Aktivierung. Salmonelleninfektionen, jedoch nicht eine Infektion mit nicht-invasiven *E. coli*, führen nachweislich zur GRIM-19-Expressionssteigerung (Barnich *et al.*, 2005). Im Gegenzug

konnte in der Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass die Überexpression von GRIM-19 die intrazelluläre Überlebensrate von *S. Typhimurium* um bis zu 30 % verringert. GRIM-19 scheint somit für die Überlebensrate nach intestinalen Salmonelleninfektionen essentiell zu sein. Dies ist umso bedeutsamer, wenn man beachtet, dass GRIM-19 im Darm von Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (z. B. Morbus-Crohn-Krankheit) weniger exprimiert wird (Barnich *et al.*, 2005). GRIM-19 gehört ebenfalls zum Komplex I der Atmungskette, der mitochondrialen NADPH:Ubiquinon Oxidoreduktase. Somit ist es ebenfalls denkbar, dass GRIM-19 über die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen intestinal infizierte Epithelzellen schützt. Allerdings wurde bis dato weder diese strukturelle Interaktion noch der eigentliche Mechanismus ausreichend dargestellt. Auch **CARD6**-Proteine sind durch ihre Interaktion mit NOD1 und Rip2, vermeintliche Repressoren der NOD1-abhängigen Wirkung (Stehlik *et al.*, 2003). **Centaurin- β 1** interagiert direkt mit NOD1 und NOD2 und bewirkt somit eine selektive Herunterregulation der NOD-abhängigen NF- κ B-Aktivität (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2006). Das Molekül **Monarch-1** (auch **NALP12**) wiederum kommt in vier Splicevarianten vor, welche sich vorrangig in der LRR-Domäne, der Ligandenerkennungsdomäne, unterscheiden. Stimulierung der TLR2 und TLR4 resultiert in einer Expressionsminderung. Jedoch führt NO zur Expressionsteigerung des Monarch-1 (Lord *et al.*, 2009). Somit wird im Verlauf einer Infektion zwar anfangs Monarch-1 als negativer Feedbackregulator vermindert, jedoch später durch die Erzeugung von NO wieder vermehrt exprimiert und hemmt über seine Interaktion mit IRAK-1 und NIK den nicht-kanonischen NF- κ B-Weg (Lich und Ting, 2007; Lord *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2005) (Kap. 2.2.4). Hierbei ist eine spezifische ATP-Bindung für die Funktion des Monarch-1 als negativer Regulator der NF- κ B-Antwort essentiell (Ye *et al.*, 2008). Auch NOD2 vermindert die TAK1-abhängige NF- κ B-Aktivierung und besitzt somit eine negative regulatorische Wirkung auf NF- κ B (Chen *et al.*, 2004). Ebenfalls für NALP2, 7 und 12 wurden modulierende Regulationsmechanismen bestimmt (Bruey *et al.*, 2004). Darüber hinaus interagieren NALP1, NALP4, NALP3 mit Bestandteilen des Zellapoptose-Signalweges als Folge bakterieller Infektionen (Bruey *et al.*, 2007; Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Toma *et al.*, 2010; Willingham *et al.*, 2007). **NALP3** (auch **Cryopyrin**) besitzt bis auf die Pyrin-Domäne Strukturähnlichkeiten zum NOD2. In diesem Zusammenhang beschrieben Martinon *et al.* (2004) die Aktivierung von NALP3 durch MDP und wiesen nach, dass Makrophagen eines Patienten mit Muckle-Wells-Syndrom Mutationen im NALP3-Gen besaßen und eine überschießende IL-1 β Antwort auf MDP Stimuli gaben. Im Gegensatz dazu stehen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass NALP3 bakterielles RNA, synthetische Purinanaloge aber auch Mononatriumureate detektiert (Kanneganti *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2006). Harder *et al.* (2009) beschrieben die Caspase-1-Aktivierung und IL-1 β -Sekretion über NLRP3 durch *Streptococcus pyogenes* und dessen Streptolysin O (Harder *et al.*, 2009). Die NALP-Proteinfamilie umfasst 14 Mitglieder und ist nachweislich die ausschlaggebende Molekülgruppe im Inflammasom (Tschopp *et al.*, 2003). Das Inflammasom ist ein inflammatorischer caspasenaktivierender Proteinkomplex, bestehend aus den Molekülen Caspase-1 und -5, ASC, NALP1-3, IPAF und NAIP5 und ist damit wichtiger Bestandteil des unspezifischen Immunsystems (Lamkanfi *et al.*, 2007; Martinon *et al.*, 2002; Mariathasan und Monack, 2007). Durch die Aktivierung der Caspase-1 (auch *IL-1 converting enzyme*, ICE) wird die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-1 α , IL-18 und IL-33 angeregt (Dinarello, 2002), aber auch der Zelltod (Autophagie) eingeleitet (Suzuki und Nunez, 2008). Zwar wurde diskutiert, dass die Korrelation aus Makrophagenschädigung und Salmonellenvirulenz in Mäusen abhängig vom Inflammasom ist, jedoch konnte im Gegenzug

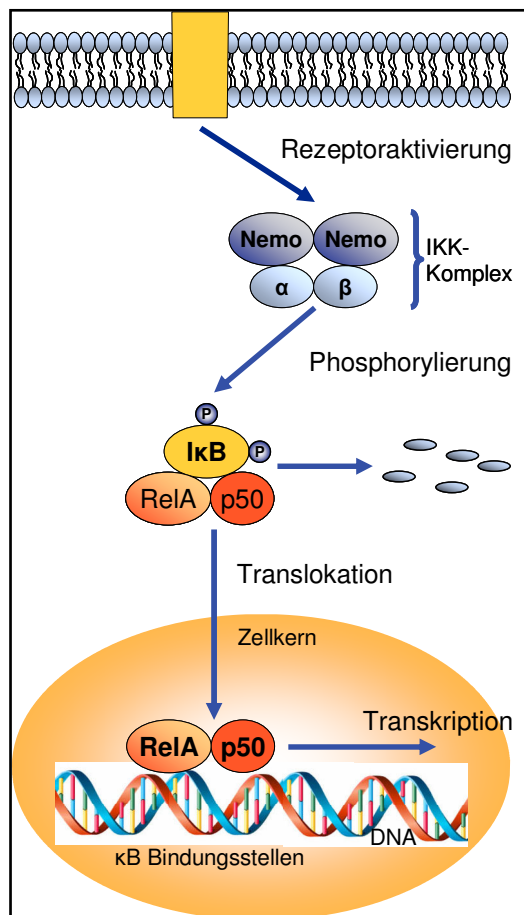
nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Konzentration von Kalium und das ATP/dATP Verhältnis in infizierten Zellen zur alleinigen Aktivierung des Inflammasomes führen (Duncan *et al.*, 2007; Franchi *et al.*, 2007; Petrilli *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigten Netea *et al.* (2006), dass **TREM-1** (*triggering receptor expressed on myeloid cells-1*), welches mit NLR synergistisch aktiviert wurde, eine bis zu 10-fache Steigerung der Zytokinproduktion bewirkte und deren Expression durch NLR-Liganden gesteigert werden konnte. Im Jahre 2009 zeigten Lipinski *et al.* eine Interaktion und Kolokalisation der NADPH-Oxidase DUOX2 mit NOD2 und daraufhin eine NOD2-abhängige reaktive Sauerstoffradikal-Produktion. Tattoli *et al.* (2008) wiesen nach, dass ein NLR-Protein **NLRX1** kolokalisiert mit Mitochondrien vorkommt und die ROS-Produktion stimulieren kann (Abdul-Sater *et al.*, 2010). Eine Interaktion zwischen NLR-Familienmitgliedern und der Produktion von ROS wurde auch von Arnoult *et al.* (2009) am Beispiel des Moleküles NLRX1 beschrieben. Caspase-12 kann über Bindung an Rip2 die NOD-abhängige NF- κ B-Aktivierung unterdrücken (LeBlanc *et al.*, 2008).

Die Lokalisierung, Struktur und Funktion der meisten CATERPILLER-Mitglieder sind nicht ausreichend charakterisiert. Hinzu kommt, dass CATERPILLER sowohl aktivierende als auch inhibierende Eigenschaften, abhängig vom Expressionslevel oder vom kostimulatorischen Protein, besitzen. Hierbei kommt den auch inhibitorisch wirksamen Molekülen: NOD3, NALP2, PYPAF3 und Monarch-1 eine besondere Rolle zu (Lich und Ting, 2007; Ting *et al.*, 2006). Die NLR-Proteine stehen in einem komplexen, bis dato nicht vollständig verstandenen Netzwerk miteinander in Verbindung. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Mikroben wiederum aus einer Vielzahl an unterschiedlichen MAMPs bestehen, welche auch eine Vielzahl an verschiedenen CATERPILLER aktivieren können. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein reger Informationsaustausch zwischen den NLR-Proteinen stattfindet. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass eine Kostimulation von TLR- und NOD-Signalwegen auch zu einer verstärkten Zellreaktion führte. Allerdings gilt dies nicht in allen untersuchten Zellsystemen, was auf synergistische und antagonistische Interaktionen hinweist und somit das Gesamtbild um einiges komplexer erscheinen lässt (Akira und Takeda, 2004; Strober *et al.*, 2006; Takada und Uehara, 2006). Ein synergistischer Effekt von TLR2-, TLR4-, NOD-Signaltransduktionswegen auf die Genexpression und Zytokinproduktion wurde von Tang *et al.* (2011) gezeigt. Wolfert *et al.* (2002) wiesen nach, dass eine MDP-Stimulation allein nur zur TNF- α -Transkription, nicht aber zu dessen Translation führte. Dieser Translationsblock konnte durch Koexpression mit LPS aufgehoben werden, was ebenfalls auf einen synergistischen Effekt beider Signaltransduktionswege schließen lässt. Bereits 2007 gab es erste Überlegungen zu den komplexen Regulierungs- und Interaktionsmechanismen innerhalb der NOD-Signalwege. Hierbei zeigten Untersuchungen, dass die NOD1-abhängige Apoptose Caspase-8 und Rip2 bedingt ist. Im Gegensatz dazu benötigt die NOD1-abhängige IL-8-Produktion kein Caspase-8, jedoch die Aktivierung von TAK1 und Rip2 (da Silva *et al.*, 2007). Fritz *et al.* (2007) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass NOD1 nur in Kombination mit einer TLR-Stimulierung zur Aktivierung der Th1-, Th2- und Th17-Immunantwort nötig ist. NOD2-defiziente Mäuse zeigten sich unempfindlich gegenüber MDP-Stimulationen, überraschenderweise jedoch waren sie auch resistent gegenüber Endotoxinen (Pauleau und Murray, 2003). Dies könnte ebenfalls auf mögliche Interaktionen zwischen den TLR- und NOD-Signalwegen hindeuten. Hierbei moduliert NOD2 die Signaltransduktion durch TLR4 und TLR3, nicht jedoch durch TLR5, 7 und 9 (Netea *et al.*, 2005). Weiss *et al.* (2004) zeigten hierzu, dass TLR4 und TLR2 für die Abwehrreaktionen

von murinen Makrophagen nach einer Salmonelleninfektion essentiell sind. Hier waren es vor allem die TLR4-Moleküle, die für eine frühe TNF- α -Produktion verantwortlich waren und die TLR2-Moleküle in der späteren Entzündungsphase. Bakteriellies Flagellin, exprimiert von kommensalen aber auch von pathogenen Mikroorganismen, dient nachweislich als primärer Aktivator für TLR5 und führt zur nachgelagerten NF- κ B-Aktivierung und der Expression von MIP-2 und murinem KC. Es sind besonders die α - und ϵ -Proteobakterien, welche das intestinale Lumen kolonisieren können, jedoch im Gegensatz zu Pathogenen wie *Salmonella*-Spezies keine TLR5-Aktivierung hervorrufen (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). Möglicherweise ist die zytologische Regulation auf Basis der NLR eine Überlebensstrategie der Kommensalen.

2.2.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor der Rel-Familie, welcher beteiligt ist bei Entwicklungsprozessen, Entzündungsreaktionen, Immunantworten, beim Zellwachstum, der Kanzerogenese und auch der Arteriosklerose. Es existieren derzeit über 150 identifizierte extrazelluläre Stimuli für eine NF- κ B-Aktivierung, dazu gehören neben Mikroorganismen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren auch verschiedenste Stressfaktoren der Zelle (Ghosh *et al.*, 1998; Pahl, 1999; Perkins und Gilmore, 2006). In Säugern finden sich verschiedene NF- κ B-Varianten, welche über die Rel-Homologiedomäne klassifiziert werden und als Dimere im Organismus vorliegen. Hierbei ist vor allem das p50/RelA-Heterodimer, welches aufgrund der Transaktivierungsdomäne des RelA aktivierend wirkt, am häufigsten zu finden (Hayden und Ghosh, 2004). Fünf verschiedene NF- κ B/Rel-Proteine bringen mehr als 12



verschiedene Dimere hervor, welche wiederum 9 bis 11 unterschiedliche κ B-Bindungsstellen im Genom erkennen (Saccani *et al.*, 2003). Im inaktivierten Zustand liegt NF- κ B im Zytoplasma an inhibitorischen Proteinen der I κ B-Familie gebunden vor. Proinflammatorische und stressassoziierte Signalkaskaden führen zu einer Phosphorylierung sowie einer proteosom-abhängigen Degradierung von I κ B bzw. einer partiellen Degradierung der Vorläufer. Der klassische NF- κ B-Aktivierungsweg besteht in der Aktivierung des IKK-Komplexes, bestehend aus den Kinasen IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit *NF- κ B essential modulator* (NEMO, auch IKK γ) (Abb. 7).

Abb. 7 Schematische Übersicht zum klassischen NF- κ B-Signalweg

Eine Aktivierung des IKK-Komplexes führt zur Phosphorylierung und proteosomabhängigen Degradierung von I κ B. Das degradierte inhibitorische Molekül I κ B α führt zur Freisetzung und damit zu Translokation von NF- κ B (hier p50/RelA-Heterodimer) in den Zellkern. Abbildung ist adaptiert an Perkins und Gilmore (2006).

Serinphosphoryliertes IKK β wiederum phosphoryliert I κ B α , welches daraufhin als Substrat für einen Ubiquitinligasekomplex dient. Ubiquitiniertes I κ B α wird rasch vom Proteasom abgebaut. Das degradierte inhibitorische Molekül I κ B α führt daraufhin zur Freisetzung von NF- κ B. Freies NF- κ B wiederum lagert sich innerhalb von Minuten an κ B-Bindungsstellen in Promotorregionen an und initiiert somit die Transkription z. B. von proinflammatorischen Genen (Ghosh *et al.*, 1998; Perkins und Gilmore, 2006; Mercurio und Manning, 1999). Hierbei erlauben Variabilitäten der Dimere und des κ B-Motives eine gewisse Feinregulation (Saccani *et al.*, 2003). Transloziertes NF- κ B wirkt im Zellkern auf über 150 verschiedene Gene (Pande und Ramos, 2005).

Charakteristisch sind hierbei die schnelle, innerhalb von Minuten einsetzende Aktivierung und die geringe Spezifität von NF- κ B hinsichtlich der aktivierten oder reprimierten Gene. Zu den Zielgenen zählen Gene für die Akute-Phase-Proteine, Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine wie IL-1, -2, -6, -8, IFN- γ , TNF- α und - β , Enzyme, Wachstumsfaktoren, Apoptoseregulatoren und Transkriptionsfaktoren (Pahl, 1999). Gleichzeitig werden aber auch kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 sowie Zytokinrezeptoren vermehrt exprimiert. Diese wiederum sind essentiell bei der Präsentation von Antigenen durch APC und damit für die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen verantwortlich (Hayden und Ghosh, 2004; Lenschow *et al.*, 1996).

Enteroinvasive Pathogene führen innerhalb von zwei bis drei Stunden in intestinalen Epithelzellen zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Genen. Hierzu gehören vor allem verschiedene Zytokine (TNF- α , IL-8, *growth-related-oncogene- α* (GRO α)), das *monocyte-chemoattractant-protein-1* (MCP-1), die Cyclooxygenase-2, die Prostaglandine E₂ und F_{2 α} , die NO-Synthase sowie das Adhäsionsmolekül *intercellular-adhesion-molecule-1* (ICAM-1) (Eckmann *et al.*, 1993; Eckmann *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Witthoft *et al.*, 1998). Unabhängig von der Pathogenese der enteroinvasiven Erreger ist der Satz an hochregulierten proinflammatorischen Genen im Epithel limitiert, was auf einen zentralen Regulationsmechanismus hindeutet. In diesem Zusammenhang konnten Elewaut *et al.* (1999) zeigen, dass NF- κ B in verschiedenen intestinalen Epithelzellen eine zentrale Regulation der proinflammatorischen Genexpression darstellt. Somit gilt NF- κ B im Stressgeschehen als zentraler Transkriptionsfaktor und als Vermittler der Immunantwort.

Es existieren weitere mögliche Aktivierungskaskaden durch die NF- κ B indizierende Kinasen (NIK), welche spezifisch IKK α -Dimere aktivieren und typischerweise zur Bildung von p52/RelB-Heterodimeren führen sowie auch IKK-unabhängige Mechanismen (Perkins und Gilmore, 2006). Der klassische und der nicht-klassische NF- κ B-Signalweg führen zur Aktivierung von unterschiedlichen Zytokinen und Chemokinen (Bonizzi und Karin, 2004; Saccani *et al.*, 2003). Die p50-Untereinheiten können auch durch die Aufbereitung aus dem Molekül p105/NF- κ B1 entstehen. Hierbei ist durch Linkermoleküle auch eine Aktivierung des MAPK-Signalweges beobachtet worden, dies stellt somit ein Verbindungsglied zwischen beiden Signalwegen dar (Beinke *et al.*, 2004). Inwieweit dies bei der Signalkaskade von NOD-Proteinen eine Rolle spielt, wurde bisher nicht untersucht.

Lawrence *et al.* (2001) beschrieben darüber hinaus eine antagonistische Wirkung von NF- κ B im späteren Inflammationsgeschehen. Liegt NF- κ B zu diesem Zeitpunkt im aktivierten Zustand vor, so geht dies zumeist mit der Induktion antiinflammatorischer Gene und der Induktion des Zelltodes einher. Im Gegenzug scheint die Inhibierung der NF- κ B-Aktivität im

späteren Inflammationsgeschehen die immunologische Reaktion weiter hinauszuzögern und die Apoptose zu verhindern (Kucharczak *et al.*, 2003).

2.3 *Salmonella* und die immunologische Wirtsantwort

Grundsätzlich können bakterielle Erreger auf unterschiedlichste Art und Weise mit eukaryotischen Zellen in Wechselwirkung treten, zum einen passiv durch Oberflächenmoleküle wie LPS, Lipoteichonsäuren, Geißeln, Flagellen, aber auch durch Hitzeschockproteine und Kapselwandbestandteile. Durch die Bindung dieser mikrobiellen Moleküle an Wirtszellrezeptoren wird eine Signalkaskade in das Zellinnere weitergeleitet, was wiederum zur Freisetzung von Zytokinen und anderen Botenstoffen führt. Zum anderen können Bakterien aber auch aktiv mit den Wirtszellen in Interaktion treten z. B. durch die Übertragung von Effektorproteinen in das Zytosol über ein T3SS oder die Freisetzung von Toxinen (Janeway und Medzhitov, 2002). Der erste Kontakt zwischen gastrointestinalen Erregern und dem Wirt entsteht an der epithelialen Oberfläche des MDT, an der es zur Anheftung und Vermehrung der Erreger sowie zum Durchdringen der Epithelbarriere kommt. Das intestinale Epithel stellt die größte Grenzschicht zwischen dem Wirtsorganismus und der Umwelt dar und ist folglich Hauptort der mikrobiellen Invasion. Salmonellen gelangen nach oraler Aufnahme zur Dünndarmschleimhaut und vermehren sich in den Darmkrypten (Carter und Collins, 1974). Als Folge der Salmonelleninfektion entwickelt sich eine lokale Entzündungsreaktion der Darmmukosa mit einer gesteigerten Flüssigkeitsabsonderung in das Darmlumen. Eine Salmonelleninfektion ist auch über spezialisierte Epithelzellen, den M-Zellen möglich. Die M-Zellen unterstützen die Translokation der Salmonellen in die immunaktive Schicht der Darmwand, den PP des GALT (Kohbata *et al.*, 1986; Clark *et al.*, 1994). Intestinale Epithelzellen können auf MAMPs, wie beispielsweise das bakterielle LPS, reagieren (Backhed *et al.*, 2002). Vor allem für intrazelluläre Erreger wie *Salmonella* werden die T3SS für die Translokation von beispielsweise bakteriellem Flagellin oder weiteren bakteriellen Zellwandbestandteilen aus der SCV direkt in das Zytosol der Wirtszelle diskutiert (Sun *et al.*, 2007). Die intrazellulären Salmonellen reifen und vermehren sich in der SCV, formieren die Sifs und modifizieren wirtseigene intrazelluläre Signalkaskaden (Brumell *et al.*, 2002). Eine Aktivierung der epithelialen Zelle durch MAMPs führt zu einer vermehrten Produktion oder der Aktivierung von zellulären Transkriptionsfaktoren. Eine zentrale Rolle im immunologischen Geschehen spielt hierbei der Transkriptionsfaktor NF- κ B. NF- κ B führt hierbei zur Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Kucharczak *et al.*, 2003; Pahl, 1999). Infizierte Enterozyten signalisieren eine Infektion vor allem über das Chemokin IL-8 und über MCP-1, die MIP-1 α , -1 β , -2 und RANTES sowie durch eine vermehrte Produktion von TNF- α , IFN- γ , IL-1, -6, -12 und IL-18 (Eckmann und Kagnoff, 2001; Mavris und Sansonetti, 2004; McCormick *et al.*, 1998). Nachweislich wird die Expression von Defensingenen, hier humanes β -Defensin2, und die Lysozymproduktion durch eine Salmonelleninfektion herunterreguliert (Islam *et al.*, 2001; Salzmann *et al.*, 2003). Veldhuizen *et al.* (2009) zeigten hierzu in porcinen IPEC-J2-Zellen, dass der wirtsadaptierte *S. Choleraesuis* nicht zu einer β -Defensin1- und 2-Genexpression führt, im Gegensatz zum nicht-wirtsadaptierten *S. Typhimurium*. Dies weist bereits auf die wirtszellspezifische Antwort der Zellen nach einer Salmonelleninfektion hin. Diese antimikrobiellen Peptide sind für eine Salmonelleninfektion nicht nur luminal von Bedeutung, wie Eswarappa *et al.* im Jahr 2008 demonstrierten, sondern die antimikrobiellen Peptide HD-5 und HBD-1 kolokalisieren auch mit den in der SCV liegenden Salmonellen. Peyrin-Biroulet *et al.* (2006) zeigten, dass durch

die Verabreichung von NOD-Agonisten die Expression von Defensinen gesteigert werden konnte. Dies spricht für die Hypothese, dass NOD-Proteine durch die Induktion der Defensinproduktion die angeborene Immunantwort auf epithelialer Ebene intra- und auch extrazellulär verstärken können.

Darüber hinaus kommt es durch die Verletzung der epithelialen Monolayer zur vermehrten Expression von Oberflächenmolekülen, wie MIC-A und MIC-B auf den Enterozyten, diese wiederum aktivieren $\gamma\delta$ T-Zellen an der Basis der Krypten, welche infizierte und beschädigte Enterozyten zerstören können (Holmes *et al.*, 2002). Die sezernierten Chemo- und Zytokine, vor allem das IL-8, TNF- α und IFN- γ , sind essentiell für die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus und bewirken wiederum eine Infiltration von Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten) in das infizierte Gewebe sowie deren Aktivierung (Nauciel und Espinasse-Maes, 1992). Zu diesen Abwehrstrategien gehört auch die Produktion von Stickstoffmonoxid sowie von reaktiven Sauerstoffprodukten (Eisenstein, 2001; Richter-Dahlfors *et al.*, 1997). Initial sind es vor allem Phagozyten, also Makrophagen und neutrophile Granulozyten, welche nachweislich im murinen System für eine erfolgreiche Eliminierung der Salmonellen und das Überleben essentiell sind (Vassiloyanakopoulos *et al.*, 1998). Die Phagozytose wird durch Opsonierung der Erreger mit Hilfe von Antikörpern oder dem Komplement verstärkt (Mosser, 1994). Nach der erfolgreichen Invasion werden Salmonellen in infizierten Immunzellen in den Peyerschen Plaques, den Mesenteriallymphknoten und auch in der Leber nachgewiesen (Reed *et al.*, 1986; Wells, 1990). Infizierte Makrophagen, dendritische Zellen und auch neutrophile Granulozyten können auch zur systemischen Streuung der Salmonellen beitragen. Hier sind es vor allem die Makrophagen, welche eine Nische für das erfolgreiche Überleben und die Vermehrung der Salmonellen darstellen (Guiney, 2005; Wijburg *et al.* 2000). Salcedo *et al.* (2001) zeigten hierzu, dass Makrophagen die größte Zellpopulation mit intrazellulären Salmonellen im retikuloendothelialen System darstellen. Hierbei wird das intrazelluläre Überleben der Salmonellen vor allem durch Virulenzgene der SPI1 und SPI2 realisiert (Monack *et al.*, 1996; Richter-Dahlfors *et al.*, 1997). Darüber hinaus sind Salmonellen auch in der Lage, in den Epithelzellen aber auch den Makrophagen, Apoptose oder Pyroptose auszulösen. Bei der Pyroptose handelt es sich um einen Caspase-1-abhängigen Prozess, um die Verbreitung des Erregers im infizierten Gewebe zu sichern (Fink und Cookson, 2007). Ist die Phagozytose und die Aktivität der Makrophagen an dieser Stelle effektiv, kann es zu keiner schweren oder persistierenden Salmonelleninfektion kommen.

Für die Entwicklung einer erworbenen Immunität gegen intrazelluläre bakterielle Pathogene müssen T-Lymphozyten durch infizierte antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden. Aktivierte antigenpräsentierende Zellen wie die dendritischen Zellen wiederum exprimieren verstärkt MHC-II-Moleküle und auch kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86. Vor allem die Makrophagen und die dendritischen Zellen phagozytieren Pathogene, wandern in periphere lymphatische Gewebe und präsentieren ihre Antigene den Lymphozyten (Camacho Villarreal *et al.*, 1995; Iwasaki und Kelsall, 1999). CD4⁺-T-Lymphozyten werden vor allem bei exogenen Antigenen oder vakuolär vorkommenden Erregern aktiviert. CD8⁺-T-Zellen hingegen werden im Allgemeinen aktiviert bei zytosolisch vorkommenden Erregern. CD8⁺-T-Zellen reagieren nachweislich auf Effektorpeptide, welche mittels des T3SS in die Wirtszelle geschleust werden (Starnbach und Bevan, 1994). Neben dieser T-Zellantwort werden im Verlaufe einer Infektion auch antikörperproduzierende B-Zellen aktiviert (Mittrucker und Kaufmann, 2000). Im murinen System sind für einen

effizienten Schutz gegen eine Salmonelleninfektion sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellpopulationen beteiligt (Mittrucker und Kaufmann, 2000). Darüber hinaus konnte Van der Velden (2005) im murinen System zeigen, dass mit *S. Typhimurium* infizierte murine dendritische Zellen nur ungenügend T-Zellen aktivieren und zur Proliferation anregen konnten. Diese Beobachtung war unabhängig vom induzierten programmierten Zelltod in den dendritischen Zellen oder der Expression kostimulatorischer Moleküle, sondern nur durch einen direkten *Salmonella*-T-Zellen-Kontakt zu beschreiben (van der Velden, 2005). Darüber hinaus wurde die Expression von murinen *Nramp1*-Molekülen beschrieben. Diese Transmembranproteine der Makrophagen bewirken eine effiziente Abtötung von *S. Typhimurium* (Vidal *et al.*, 1995). Salmonelleninfektion im murinen System gehen nachweislich mit einer immunsuppressiven Reaktion einher (Mittrucker *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang konnte demonstriert werden, dass Salmonellen in antigenpräsentierenden Zellen SPI2-abhängig die MHC-II-abhängige Antigenpräsentation hemmen (Cheminay *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2004). Laut Definition haben jedoch gut an ihren Wirt adaptierte Salmonellen verschiedenste Mechanismen entwickelt, die der erfolgreichen Immunabwehr widerstehen und somit zu latenten, persistierenden Infektionen führen (Scharek und Tedin, 2007). Im porcinen System gibt es die Besonderheit, dass infizierte Tiere eine hohe und langanhaltende bakterielle Dichte in den Tonsillen aufweisen, welche zur Persistenz und der intermittierenden Ausscheidung beitragen. Dieses Phänomen wird auf die Besonderheit porciner B-Zellen, die im Gegensatz zu humanen B-Zellen zur Antigenpräsentation über MHC-I fähig sind, zurückgeführt (Scharek und Tedin, 2007). Uthe *et al.* (2007) konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die Genexpressionsmuster des Wirtes zwischen *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* infizierten Geweben unterscheiden. Hierbei zeigen mit *S. Choleraesuis* infizierte Schweine vor allem in der frühen Phase der Infektion eine Repression von immunologischen Genen.

2.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Salmonellen zählen zu den Zoonoseerregern und können schwere Infektionskrankheiten sowohl beim Menschen als auch beim Tier verursachen. Obwohl grundlegende Virulenzmechanismen der Salmonellen bereits gut untersucht wurden, können derzeit viele Fragen zur Pathogenese und Wirtsspezifität nicht ausreichend beantwortet werden. Bereits frühere Studien zeigten, dass die Immunantworten des Wirtes auf *S. Typhimurium* oder *S. Typhi* Infektionen in ein und derselben Makrophagenzelllinie verschiedenartig ausfallen. Möglicherweise können Salmonellen die Zelllinien von verschiedenen Wirtssystemen infizieren und sich in diesen vermehren. Allerdings kann der intrazelluläre Erkennungsvorgang durch den Wirt dabei sehr unterschiedlich ausfallen. Hierzu wurden bereits *Salmonella*-Invasionstudien in den unterschiedlichsten Zellkulturmodellen durchgeführt (Giannella *et al.*, 1973; Mandell, 1973; Vaudaux und Waldvogel, 1979), eine experimentelle Aussage konnte hierbei jedoch nur für die im Versuch verwendeten Serovare in Korrelation zu meist einem einzigen Zellkulturmodell gegeben werden. In der vorliegenden Arbeit werden vier verschiedene *Salmonella*-Serovare mit jeweils zwei bereits etablierten Zellarten (Epithel und Makrophagen) aus je drei verschiedenen Wirten (Schwein, Maus, Mensch) verglichen. Hierzu werden die Invasivität, das intrazelluläre Überleben und die erste immunologische Abwehrstrategie der Wirtszellen, die NF- κ B-Aktivierung, nach der Infektion mit wirtsadaptierten und nicht-wirtsadaptierten Serovaren gegenübergestellt.

In der vorliegenden Arbeit kam für das Wirtssystem Schwein die intestinale, nicht-transformierte IPEC-J2 Zelllinie zum Einsatz (Schierack *et al.*, 2006). Nachweislich exprimieren IPEC-J2-Zellen die TLR1, 2, 4, 6 und 9 (Arce *et al.*, 2010; Burkey *et al.*, 2009). Da im porcinen Infektionsgeschehen die Alveolarmakrophagen einen essentiellen Beitrag zur Beseitigung von Erregern aus dem Blut leisten (Winkler, 1988) und darüber hinaus durch *S. Choleraesuis* in Schweinen Pneumonien ausgelöst werden, welche eine Interaktion des Erregers mit den Makrophagen vermuten lässt, wurde die porcine alveoläre makrophagenähnliche 3D4/31-Zellkultur in dieser Arbeit verwendet (Weingartl *et al.*, 2002). Brown und Price (2007) zeigten, dass die Aufnahme von *S. Typhimurium* in IPEC-J2 im Gegensatz zu MDCK-, COS- und HeLa-Zellen nicht vom Rac1 abhängt. Die Salmonellenaufnahme scheint somit in unterschiedlicher Art und Weise in den Zellen verschiedenartiger Herkunft reguliert zu werden. Schweine zeigen darüber hinaus im Vergleich zu Maus und Mensch große Unterschiede im Vorkommen und der Funktion immunologischer Systeme (Rothkotter, 2009; Scharek und Tedin, 2007). Darüber hinaus demonstrierten Arce *et al.* (2010) Expressionsunterschiede zwischen porcinen IPEC-J2 (Jejunum) und IPI-2I (Ileum) Zelllinien nach LPS-Stimulation und schlossen auf eine regional unterschiedlich geartete Regulation der Immunantworten entlang der proximo-distalen Achse im MDT. Im Wirtssystem Maus hingegen konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einem defekten *Nramp-1* empfindlicher auf eine Salmonelleninfektion reagieren (Lissner *et al.*, 1983; Govoni und Gros, 1998). Deshalb wurden *Nramp-1*-positive RAW264.7-Zellkulturen in dieser Arbeit genutzt (Raschke *et al.*, 1978). Eriksson *et al.* (2000) zeigten in murinen J774A.1- und RAW264.7-Makrophagen, dass die NO-Produktion ein wesentlicher Faktor der intrazellulären Überlebensrate der Salmonellen darstellte. Die Abwehrfunktionen der Makrophagen waren somit entscheidend für den Ausgang der Salmonelleninfektion. Murine transformierte RAW264.7-Zellen exprimieren nachweislich TLR4 und auch in murinen

intestinalen Epithelzellen konnte TLR4 nachgewiesen werden (Hornef *et al.*, 2003). Im Gegensatz jedoch zu den humanen Zellen zeigen beispielsweise murine Immunzellen und Epithelzellen unterschiedliche TLR-Expressionsmuster (Bambou *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2003; Gewirtz *et al.*, 2001; van Aubel *et al.*, 2007). Es sei erwähnt, dass die epithelialen Zellen im undifferenzierten Zustand in den Versuchsabläufen verwendet wurden. Zwar bilden die verwendeten Epithelzellen auch in Zellkulturplatten polarisierte Monolayer aus, dennoch ist bewiesen, dass epitheliale Zellmonolayer auf Zellkulturmembranen durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und/oder als *air-liquid-interface* Kulturen deutliche morphologische und funktionelle Unterschiede aufweisen (Nossol *et al.*, 2011). Da in dieser Arbeit jedoch auch adhärente makrophagenähnliche Kulturen sowie Suspensionskulturen verwendet wurden, welche keine polarisierten Monolayer ausbilden können, wurde im Gegenzug mit Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf die Verwendung von Zellkulturmembranen verzichtet.

Einen ersten und bisher auch einzigen Hinweis darauf, dass möglicherweise das Wirtssystem gleiche intrazelluläre Erreger auf unterschiedliche Weise registriert, lieferten Ergebnisse um Magalhaes *et al.* (2005). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass NOD-Proteine von murinem und humanem Ursprung auf die gleichen Bestandteile der bakteriellen Zellwand unterschiedlich reagierten. Dies wiederum hat eine verschiedenartig ausfallende angeborene Immunantwort des Wirtes zur Folge. NOD-Proteine könnten somit Bestandteil der Wirtsanpassung und Wirtsspezifität sein, welche bis dato nur den Pathogenen zugeschrieben werden. Aufgrund dessen werden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit das porcine NOD1 und NOD2 sequenziert, die Sequenz im Detail analysiert und anschließend eine vergleichende Sequenzuntersuchung durchgeführt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher:

- (1) zu untersuchen, inwieweit sich die *Salmonella*-Invasion unterschiedlicher Serovare an verschiedenen Zellkultursystemen (Epithel und Makrophagen) in verschiedenen Wirtssystemen (Schwein, Maus, Mensch) auswirkt,
- (2) den Einfluss der Salmonellen (wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert) auf die angeborene Immunantwort des Wirtes (NF- κ B-Aktivierung) in verschiedenen Zellkultursystemen (Epithel und Makrophagen) und Wirtssystemen (Schwein, Maus, Mensch) zu bestimmen,
- (3) aufgrund der erhobenen Daten (Invasionsstudien und NF- κ B-Aktivierungsversuche) eine allgemeingültige Aussage zur *Salmonella*-Wirtsspezifität geben zu können und
- (4) darüber hinaus die Rolle der NOD-Proteine von unterschiedlichen Wirtssystemen näher zu beleuchten und in diesem Zusammenhang das porcine NOD1 und NOD2 zu sequenzieren, um Anhaltspunkte für weitere Forschungsarbeiten zu liefern.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Zelllinien

Für die Zellkulturexperimente wurden insgesamt sechs verschiedene permanente Zelllinien verwendet, jeweils eine epitheliale und eine makrophagenähnliche Zelllinie pro betrachteten Wirtsorganismus Schwein, Maus und Mensch.

Für das Schwein kamen die adhärenenten Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 zum Einsatz. *Intestinal Porcine Epithelial Cell – Jejunum 2* (IPEC-J2), eine nicht transformierte Epithelzelllinie, entstammt dem Jejunum eines neugeborenen Ferkels und wurde bereits von Schierack *et al.* (2006) als geeignetes *in vitro* Modell für die Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion von intestinalen pathogenen Bakterien beschrieben. 3D4/31 ist eine alveoläre Makrophagenzelllinie, gewonnen aus 12 Wochen alten *specific pathogen free* (SPF)-Ferkeln und transformiert mit dem Plasmid pSV4-neo (Neomycinresistenz, SV40 *large T gene*) (Weingartl *et al.*, 2002).

Murinen Ursprungs sind die adhärenenten Zelllinien MODE-K und RAW264.7. *Murine Duodenal Epithelial Cell - Clone K* (MODE-K) ist eine permanente, transformierte (SV40 *large T gene*) Epithelzelllinie aus dem Duodenum einer zwei Wochen alten weiblichen Maus (Vidal *et al.*, 1993). Aus einer Aszitesprobe einer adulten Maus, transformiert mit dem *Abelson Murine Leukemia Virus*, stammt die permanente Makrophagenzelllinie RAW264.7 (Raschke *et al.*, 1978).

LoVo und THP-1 sind Zelllinien humanen Ursprungs. LoVo ist eine adhärenente Epithelzelllinie und wurde aus dem metastasierenden Knoten eines 56-jährigen Mannes mit Kolonadenokarzinoma gewonnen (Drewinko *et al.*, 1976). Die makrophagenähnliche Suspensionszellkultur THP-1 stammt aus peripheren mononukleären Zellen eines ein Jahr alten Jungen mit akuter monozytärer Leukämie (Tsuchiya *et al.*, 1980).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Standardzellkultur

Die Zellkulturen wurden mit den entsprechenden Medien (Kap. 3.2.2), sofern nicht anders angegeben, in 25 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C. Das Medium wurde alle 2 bis 4 Tage gewechselt. Die Suspensionszellkultur und die konfluenten Monolayer der adhärenenten Zellen wurden im Abstand von 5 bis 7 Tagen subkultiviert (Kap. 3.2.4).

3.2.2 Medien für die Zellkultur und Zellkulturmediumzusätze

DMEM/HAM'S:	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)/HAM'S F-12 (1:1) (Biochrom) (Folkman <i>et al.</i> , 1979)
Basal ISCOVE'S:	Basal ISCOVE'S Medium (Biochrom) (Iscove und Melchers, 1978)

Den Zellkulturmedien wurde 5-10 % fetales Kälberserum (FKS, Biochrom) zugesetzt (Tab. 2). Das FKS wurde bei 56 °C für 30min hitzeinaktiviert, um störende Einflüsse des Serums, z. B. durch Komplement, Fibrin oder auch Phagen, auf die Zellkultur zu vermindern. Darüber hinaus kamen 1xnichtessentielle Aminosäuren (NEAS, Biochrom) und 1xInsulin-Transferrin-Selenit-A (ITS, Gibco™Invitrogen Corporation) als Medienzusätze zum Einsatz, da einige Zelllinien eine deutlich bessere Vitalität und Zellmorphologie mit diesen Zusätzen aufwiesen (Tab. 2). Bei der Kryokonservierung und dem Auftauen von Zellen (Kap. 3.2.6) wurden 100 µg/ml Dihydrostreptomycinsulfat und 100 U/ml Penicillin dem entsprechenden Zellkulturmedium zugesetzt, um die Gefahr einer möglichen Kontamination zu verhindern. Für die Infektionstests (Kap. 3.2.7) wurden die entsprechenden Zellkulturmedien mit 50 µg/ml oder 10 µg/ml Gentamicin versetzt. 50 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, Sigma-Aldrich) dienten der Aktivierung von $0,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen der Suspensionszellkultur THP-1 und damit der Herstellung einer adhärenenten THP-1 Zellcharge.

Tab. 2 Verwendete Medien inklusive Zusätze für die Zellkulturen

	Medium	Fetales Kälberserum	Weitere Zusätze
IPEC-J2	DMEM/HAM'S	5 % FKS	-
3D4/31	Basal ISCOVE'S	10 % FKS	-
MODE-K	DMEM/HAM'S	10 % FKS	1xNEAS
RAW264.7	Basal ISCOVE'S	10 % FKS	-
LoVo	DMEM/HAM'S	10 % FKS	-
THP-1	Basal ISCOVE'S	10 % FKS	1xITS

3.2.3 Mykoplasmentest

Da streng genommen Mykoplasmen bei der Sterilfiltration mit den üblichen Porengrößen (0,22 µm bis 0,45 µm) nicht vollständig zurückgehalten werden können und auch FKS theoretisch Mykoplasmen enthalten kann, wurden in regelmäßigen Abständen die Zellkulturen auf das Vorhandensein von Mykoplasmen-DNA mittels einer *nested*-Polymerasekettenreaktion untersucht (Tang *et al.*, 2000).

Die Zellkulturen wurden im Verlauf der Versuchsreihen negativ auf Mykoplasmen-DNA getestet (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Subkultivierung von Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Zellkulturen weichen die Methoden der Subkultivierung je nach betrachteter Zelllinie voneinander ab.

IPEC-J2, 3D4/31, MODE-K, LoVo: Bei den adhärenenten Zelllinien wurden die Zell-Matrix-Kontakte (z. B. zelleigene Proteoglykane) des konfluenten Monolayers durch den enzymatischen Verdau aufgelöst. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 3 ml 1xPBS gewaschen und dann für circa 3-10min bei 37 °C mit 3 ml 0,05/0,02 % Trypsin/EDTA (in 1xPBS-Lösung, pH 7,2) inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins und um die zytotoxischen Effekte des EDTA zu vermindern, wurden die abgelösten Zellen sofort in 2 ml entsprechendem Zellkulturmedium aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension

für 5min bei Raumtemperatur und 155xg zentrifugiert und danach in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. In einer 1:20 bis 1:50 Verdünnung wurden die Zellen in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche gesät. Nach 24h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein erneuter Wechsel des Zellkulturmediums.

RAW264.7: Im Gegensatz zum enzymatischen Verdau wurde hier eine mechanische Dissoziation mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche durchgeführt. Die weiteren Arbeitsschritte entsprechen der bereits beschriebenen Subkultivierung.

THP-1: Die Suspensionszellkultur THP-1 wurde direkt aus der Zellkulturflasche entnommen, für 5min bei Raumtemperatur und 155xg zentrifugiert und im Anschluss in 5 ml entsprechendem Zellkulturmedium aufgenommen. In einer 1:20 bis 1:50 Verdünnung wurden die Zellen in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche gesät. Sofern nötig, wurden die Zellen durch eine additive Zugabe mit neuem Medium versorgt.

Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Infektionstests (Kap. 3.2.7) oder der Transfektionen (Kap. 3.2.8) wurden die Zellen nach der Subkultivierung in 24-Loch-Zellkulturplatten auf Ø 12 mm Deckgläsern ausgesät.

3.2.5 Zellzahlbestimmung und Vitalfärbung

Während der Subkultivierung der Zellen (Kap. 3.2.4) wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit 0,5 % Trypanblau (Biochrom) vermenget und zur Bestimmung der Lebendzellzahl nach 2-3min Inkubationszeit am Umkehrmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Routineuntersuchung zur Vitalfärbung mit Trypanblau beruht auf der Grundlage, dass bestimmte Farbstoffe (geladene und/oder $> M_{rel}200$) nicht in das Zellinnere gelangen können, während tote Zellen sich mit dem Farbstoff anfärben. Die Konzentration der Zellen wurde aus dem Mittelwert nicht blau gefärbter und demnach lebender Zellen, aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen) und dem Verdünnungsfaktor (10) errechnet. Eine Übersicht zu den ermittelten Zellzahlmengen gibt Tabelle 3.

3.2.6 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Für eine Langzeitlagerung wurden die verschiedenen Zellkulturen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff N₂ kryokonserviert. Hierzu wurde das Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin 24h vor der Subkultivierung gewechselt. Nach erfolgter Subkultivierung der Zellen (Kap. 3.2.4) und Zellzahlbestimmung (Kap. 3.2.5) wurden je 1×10^6 Zellen in 1,8 ml entsprechendem Zellkulturmedium und 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, 10 Vol.-%) in Kryoröhrchen überführt. Die somit vor Kristallbildung und Dehydratation geschützten Zellen wurden kurzzeitig auf Eis gelagert, dann über Nacht bei -80 °C inkubiert und im Anschluss in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Rekultivierung wurden die Kryoröhrchen direkt aus dem Stickstoffbehälter in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und sofort nach dem Auftauen in eine 25 cm²-Kulturflasche mit 5 ml warmen Zellkulturmedium ausgesät. Nach einer 24-stündigen Ruhephase wurde das Medium gewechselt, um das zytotoxische DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.2.7 Infektionstest oder modifizierter *Gentamicin-Protection Assay*

Der modifizierte *Gentamicin-Protection Assay* wurde angelehnt an die Protokolle von Giannella *et al.*, 1973, Mandell, 1973 und Vaudaux und Waldvogel, 1979 durchgeführt. Die sechs Zelllinien wurden dem Infektionstest mit den vier verschiedenen *Salmonella*-Serovaren (Kap. 3.3) unterzogen. Hierbei wurden die THP-1-Zellen sowohl in Suspensionsform (THP-1s) als auch im aktivierten, adhärenen Zustand (THP1-a) verwendet. Darüber hinaus wurde der hier beschriebene Infektionstest auch für die NF-κB-Aktivierungsversuche sowie für die Infektion der sechs Zelllinien mit den zwei GFP-Salmonellenmutanten verwendet.

Für Infektionsversuche an adhärenen Zelllinien wurden die entsprechenden Zellmengen der verschiedenen Zelllinien zunächst mit 500 µl bzw. 200 µl Zellkulturmedium in 24- bzw. 96-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellmonolayers, abhängig von der Zellkultur innerhalb von 5 bis 7 Tagen, wurden die Zellen für den Infektionstest genutzt. 4h vor Testbeginn wurde das Zellkulturmedium ohne den Zusatz von entsprechenden Antibiotika erneuert. Die durchschnittliche Anzahl der Zellen je Loch zum Zeitpunkt des Infektionsversuches ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3 Übersicht zu eingesäter Zellmenge und durchschnittlicher Zellmenge nach erreichter Konfluenz für die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	24-Lochplatte		96-Lochplatte	
	Eingesäte Zellzahl je Loch bei der Subkultivierung	Durchschnittliche Zellmenge am Tag der Infektion	Eingesäte Zellzahl je Loch bei der Subkultivierung	Durchschnittliche Zellmenge am Tag der Infektion
IPEC-J2	2×10^4	$1,4 \pm 0,2 \times 10^5$	1×10^4	$2,2 \pm 0,4 \times 10^4$
3D4/31	2×10^4	$3,4 \pm 0,5 \times 10^5$	1×10^4	$5,4 \pm 0,6 \times 10^4$
MODE-K	$3,5 \times 10^4$	$6,6 \pm 1,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^5$
RAW264.7	1×10^5	$1,4 \pm 0,3 \times 10^6$	2×10^4	$1,2 \pm 0,3 \times 10^5$
LoVo	5×10^4	$7,1 \pm 0,5 \times 10^5$	3×10^4	$1,1 \pm 0,3 \times 10^5$
THP-1	5×10^5	5×10^5	1×10^4	$3,5 \pm 0,2 \times 10^4$

Die Bakterien für den Infektionsversuch (Kap. 3.3) wurden zur Herstellung des Inokulums in Lysogenic Broth (LB)-Medium bei 37 °C und 200 rpm bis zur OD₆₀₀ 2,2–2,4 herangezogen, anschließend 5min bei 8000xg zentrifugiert und im entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert. Sofern nicht anders aufgeführt, wurden die Zellkulturen mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI; Anzahl Bakterien/Wirtszelle) von eins inokuliert bei einem Inokulationsvolumen von 100 µl. Nach vorsichtigem Schwenken der Zellkulturplatten für eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien wurden diese bei Raumtemperatur für 10min bei 250xg zentrifugiert. Die Inkubation der Zellkulturen mit den Bakterien erfolgte über einen definierten Zeitraum im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C. Die makrophagenähnlichen Zellen wurden aufgrund ihrer Phagozytoseaktivität 30min, die Epithelzellen dagegen für 60min mit den Bakterienstämmen inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium unter Zugabe von 50 µg/ml Gentamicin gewechselt und für weitere 60min inkubiert, damit nicht-invasive Salmonellen abgetötet wurden. Um die zytotoxischen Effekte des Gentamicin auf die Zellkultur zu minimieren,

3. Material und Methoden

wurde nach dieser Zeit das Medium unter Zugabe von 10 µg/ml Gentamicin erneut gewechselt. Nach 2, 4 und 24h (Abb. 8) wurden die Zellen dreimal mit je 1 ml 1xPBS gespült, um nicht-invasive, tote Bakterien zu entfernen, und mit 0,5 ml 0,1 % Triton X-100 in H₂O_{bidest} lysiert. Das Lysat wurde dezimal in 150 mM NaCl verdünnt, in fünffacher Wiederholung auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl invasiver Bakterien wurde durch Zählung der KbE unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

Für Infektionsversuche an der Suspensionszelllinie THP-1 wurden die Zellen am Tag der Infektion der Subkultivierung (Kap. 3.2.4) unterzogen und in einer Zelldichte von 5 x 10⁵ Zellen/Loch in eine 24-Lochplatte mit 200 µl Zellkulturmedium ausgesät und wie zuvor beschrieben mit einem Inokulum von 100 µl und einer MOI von eins infiziert. Nach 30min wurden die Zellen mit 100 µl Medium mit 200 µg/ml Gentamicin versetzt, so dass die Endkonzentration auch hier 50 µg/ml Gentamicin betrug. Die Zellsuspension wurde nach einer Stunde mit 1600 µl Medium aufgefüllt, um die zytotoxischen Effekte des Gentamicins auf die Zellkultur zu minimieren. Anschließend wurde die Zellsuspension für die Zellyse in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, bei Raumtemperatur und 250xg für 5min zentrifugiert und das Zellpellet in 0,5 ml 0,1 % Triton X-100 in H₂O_{bidest} resuspendiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog zu den Infektionsversuchen mit adhärennten Zelllinien den unter genannten. Der Infektionstest an den THP-1-Zellen erfolgte zusätzlich im aktivierten, adhärennten Zustand durch den Zusatz von 50 ng/ml PMA 24h vor dem Infektionsversuch.

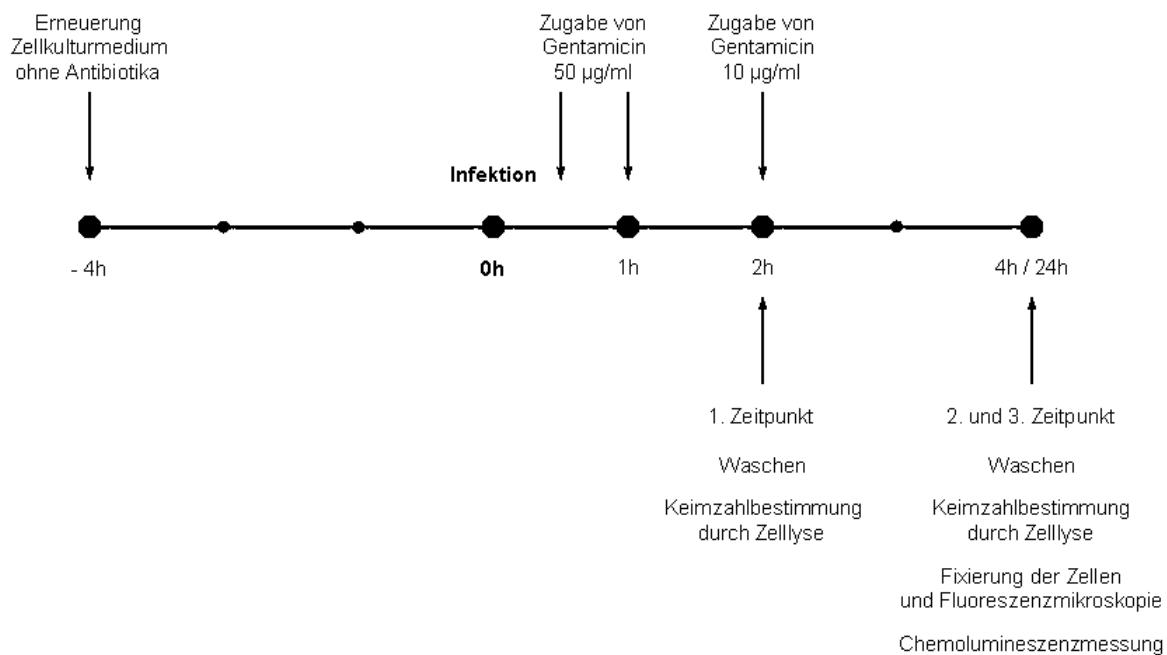


Abb. 8 Schematischer Überblick zum zeitlichen Ablauf des Infektionsversuches

3.2.8 Transiente Transfektion

Die Überführung fremden Genmaterials in eukaryotische Wirtszellen gelang durch die Liposomen-vermittelte Transfektion via FuGENE®HD Transfection Reagent (Roche). Aufgrund der positiven Ladung bildet es sehr effektiv Komplexe mit Nukleinsäuren und gelangt durch eine Liposom-Zellmembran-Fusion in das Zellinnere. Zuerst wurden die

optimalen Transfektionsbedingungen für die sechs verwendeten Zelllinien bestimmt, da diese bisher für die murinen und porcinen Zellen in der Literatur nicht beschrieben wurden. Aufgrund der daraus ermittelten Werte wurden die Zelllinien anschließend mit einem pNF- κ B-Luc-Vektor (Stratagene) transfiziert und einem Infektionstest unterzogen (Kap. 3.2.7). Zur Ermittlung und Optimierung der Transfektionseffizienz wurden die adhärennten Zellen einen Tag vor der Transfektion einer Subkultivierung unterzogen (Kap. 3.2.4) und in einer Zelldichte auf \varnothing 12 mm Deckgläsern in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät, die es erlaubte, dass die Zellen nach 20-24 Stunden 60 % bis 80 % der Konfluenz erreichten. Die Suspensionszelllinie THP-1 wurde als Suspension (THP-1s) und als aktivierte, adhärennte Zellkultur (THP-1a) verwendet. Hierzu wurden die THP-1 am Tag der Transfektion subkultiviert und in einer definierten Zellmenge als Suspension sowie 24h vor der Transfektion unter Zusatz von 50 ng/ml PMA ausgesät. Die Zellen wurden für die Optimierungsversuche mit dem pDsRed-Monomer-N1-Mito-Vektor (Clontech) transfiziert. Der pDSRed-Monomer-N1-Mito-Vektor führt durch das rot fluoreszierende Protein der *Discosoma sp.* und eine zusätzliche mitochondriale Zielsequenz zum Nachweis positiv transfizierter und damit rot fluoreszierender Zellen. Hierfür wurden 2 μ g zirkuläre Plasmid-DNA mit 5-12 μ l FuGENE®HD Transfection Reagent, abhängig von der zu betrachtenden Zellkultur, in serumfreiem DMEM/HAM'S Medium vermischt und für 10-15min bei Raumtemperatur inkubiert (Komplexbildungszeit). Das FuGENE®HD:DNA Mediumgemisch wurde direkt zu den Zellen gegeben und die Zellkulturplatte für eine gute Verteilung leicht geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend über einen definierten Zeitraum im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C inkubiert. Die transfizierten Suspensionszellen THP-1 wurden 24 Stunden nach der Transfektion zur besseren Auswertung der Transfektionseffizienz mit 50 ng/ml PMA aktiviert. Für die Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die adhärennten Zellen auf den Deckgläsern im Anschluss an die Transfektion fixiert (Kap. 3.5.1), mit einem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) gefärbt (Kap. 3.5.2) und am Fluoreszenzmikroskop (Kap. 3.5.3) ausgewertet. Mit Hilfe der DAPI-Färbung wurden alle Zellen, einschließlich der positiv-transfizierten Zellen angefärbt. Die Transfektionseffizienz gibt dann den Prozentsatz positiv-transfizierter und damit rot fluoreszierender Zellen an der Gesamtzellzahl an. Die Effizienz variiert aufgrund der betrachteten Zelllinie, der eingesäten Zelldichte, des FuGENE®HD:DNA-Verhältnisses, der eingesetzten FuGENE®HD:DNA:Medium-Gemischmenge, der Komplexbildungszeit und des betrachteten Messzeitpunktes. Die optimalen Transfektionsergebnisse lagen je nach betrachtetem Zelltyp zwischen 40-80 %. Eine Übersicht zu den ermittelten Transfektionsbedingungen für optimale Transfektionseffizienzen im 24-Loch-Zellkulturplattenversuch gibt Tabelle 4.

Nach Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen konnten die Zellen für den NF- κ B-Aktivierungsversuch genutzt werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst in 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mittels eines pNF- κ B-Luc-Vektors (PathDetect@cis-Reporting System, Stratagene) transfiziert. Der pNF- κ B-Luc-Vektor besitzt ein *Photinus pyralis* Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines Promotors mit einer Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor NF- κ B. 24 – 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einem Infektionstest (Kap. 3.2.7) unterzogen. Das hierbei entstehende NF- κ B führt in den transfizierten Zellen zur Luciferasebildung. Die Luciferase wiederum wurde durch die sich anschließende Chemolumineszenzmessung (Kap. 3.2.9) detektiert. Die humanen THP-1-Zellen konnten weder als Suspensionszellkultur (THP-1s)

3. Material und Methoden

noch im aktivierten und damit adhärenen Zustand (THP-1a) mittels 50 ng/ml PMA in ausreichendem Maße transfiziert werden. Die Transfektionseffizienzen erwiesen sich als zu gering, um eine darauffolgende Chemolumineszenzuntersuchung vornehmen zu können. Deshalb wurden die THP-1-Zellen nicht in den Chemolumineszenzversuch mit aufgenommen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Transfektion von THP-1 nicht problemlos verläuft (Gupta *et al.*, 1999).

Tab. 4 Übersicht zu den ermittelten Transfektionseffizienzen im 24-Loch-Zellkulturplattenversuch

	IPEC-J2	3D4/31	MODE-K
Zelldichte bei Konfluenz im 24-Loch-Format	$1,22 \times 10^5$ $\pm 4,1 \times 10^4$	$2,90 \times 10^5$ $\pm 1,0 \times 10^5$	$0,86 \times 10^6$ $\pm 3,1 \times 10^5$
Eingesäte Zelldichte im 24-Loch-Format	$0,5 \times 10^5$ /Loch	$0,25-0,5 \times 10^5$ /Loch	$0,5 \times 10^5$ /Loch
FuGENE®HD:DNA Verhältnis	7:2	5:2	7:2
Eingesetzte Gemischmenge pro Loch	25 %	25 %	25 %
Komplexbildungszeit	10-15min	10-15min	10-15min
Zeitpunkt der Messung im 24-Loch-Format	48h	24h	48h
Effizienz	77 % $\pm 10,1$ %	74 % $\pm 8,0$ %	51 % $\pm 7,2$ %
	RAW264.7	LoVo	THP-1a
Zelldichte bei Konfluenz im 24-Loch-Format	$1,34 \times 10^6$ $\pm 3,9 \times 10^5$	$5,40 \times 10^5$ $\pm 3,8 \times 10^5$	5×10^5
Eingesäte Zelldichte im 24-Loch-Format	$0,5 \times 10^5$ /Loch	1×10^5 /Loch	$0,5 \times 10^5$ /Loch
FuGENE®HD:DNA Verhältnis	5:2	7:2	6:2
Eingesetzte Gemischmenge pro Loch	50 %	25 %	25 %
Komplexbildungszeit	10-15min	10-15min	10-15min
Zeitpunkt der Messung im 24-Loch-Format	24h	48h	24h
Effizienz	37 % $\pm 3,4$ %	54 % $\pm 6,0$ %	9 % $\pm 6,8$ %

3.2.9 Chemolumineszenz und Messung der NF-κB-Aktivierung

Für die Ermittlung der Chemolumineszenz wurden am Versuchstag (Tag 1) die Zellen der Subkultivierung unterzogen (Kap. 3.2.4) und in 96-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Dabei wurden die äußeren Vertiefungen der schwarzen, mit klarem Boden versehenen 96-Lochplatten frei gelassen, um mögliche Randeffekte zu minimieren. Am Tag 2 wurde das Zellkulturmedium erneuert und die Zellen mit dem pNF-κB-Luc-Vektor transfiziert (Kap. 3.2.8). Der Infektionstest erfolgte am Tag 3 (Kap. 3.2.7). Zeitgleich mit der Infektion wurde eine positive Kontrolle der Transfektion durch Stimulation der Zellen für 2h mit 50 ng Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhimurium (Sigma-Aldrich) oder 1×10^7 UV-inaktivierten *S. Typhimurium* DT104 (Kap. 3.4.7) durchgeführt. Am Tag 3 und 4 wurde die Chemolumineszenz mittels Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) gemessen. Zunächst wurde das Medium einheitlich durch 50 µl DMEM/HAM'S mit 5 % FKS ersetzt. Nach Zugabe von 50 µl Bright-Glo™ Reagenz zu den Zellen wurde die Zellkulturplatte nach 2min Inkubationszeit sofort im Luminometer Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek) bei Raumtemperatur gemessen. Die in den transfizierten und aktivierten Zellen gebildete Luciferase reagiert in einer Chemolumineszenzreaktion. Die dabei entstehende Lichtemission in einer Wellenlänge von 490-630 nm wird im Luminometer erfasst und verhält sich proportional zur Aktivität des Promotors. Die Messung der Lichtintensität erfolgt in so genannten *Relative Luminescence Units* (RLU) (Abb. 9).

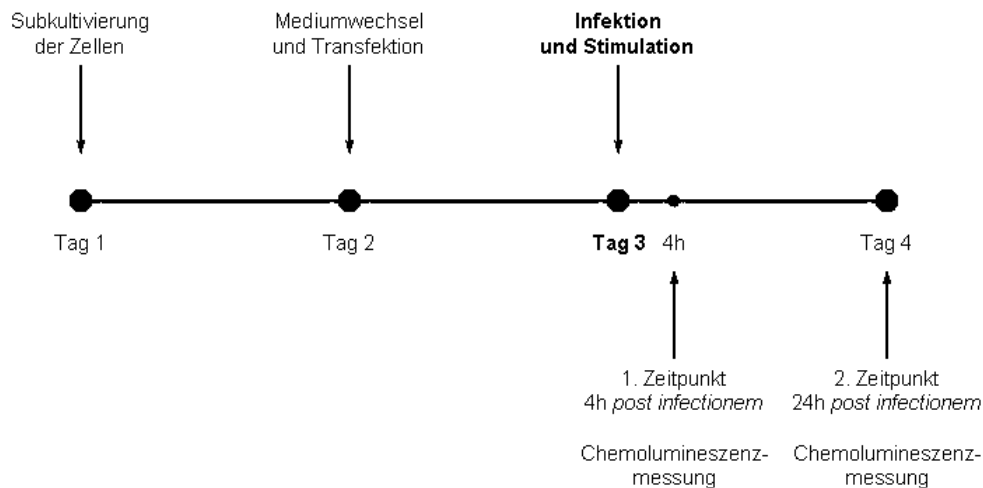


Abb. 9 Schematischer Überblick zum zeitlichen Ablauf der Chemolumineszenzmessung

3.3 Bakterienstämme

Folgende in der Tabelle 5 aufgelisteten Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tab. 5 Auflistung der verwendeten Bakterienstämme

Legende: ET: Elektrophoretischer Typ; IMT: Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin; ST: Sequenz Typ

Bezeichnung	Beschreibung; Besonderheiten	Quelle; Referenz
S. Typhimurium SL1344	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium SL1344; Passagiert in Mäusen, IMT	Dr. Stocker, Beckman Center, Stanford University, USA
S. Typhimurium DT104	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium DT104; Nalidixin-Resistenz	Dr. Rösler, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
S. Choleraesuis SARB4	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Choleraesuis var. Kunzendorf SARB4; O6,7:c:1,5; ET: Cs1; ST: 66; Passagiert in Mäusen, IMT	Isolierung 1986; National Veterinary Services Laboratories Ames 6321, Iowa, USA
S. Dublin SARB12	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Dublin SARB12; ET: Du1; ST:10	Isolierung 1986; National Veterinary Services Laboratories Ames 5618, Iowa, USA; Dr. Achtman, University Cork
S. Enteritidis SARB16	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis SARB16; ET : En1; ST : 11	Centers for Disease Control Atlanta, Georgia, USA, SSU7998 Dr. Achtman, University Cork
SL1344_GFP	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium SL1344; <i>Green fluorescent protein</i> (GFP)-Plasmid, Kanamycin-Resistenz	Dr. Vazquez-Torres, University of Colorado, USA
Choleraesuis _GFP	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> ser. Choleraesuis; <i>Green fluorescent protein</i> (GFP)-Plasmid, Kanamycin-Resistenz	Dr. Vazquez-Torres, University of Colorado, USA
DH5/pDSRed-Mito	<i>Escherichia coli</i> DH5/pDSRed-Mito; Kanamycin-Resistenz	Dr. T. Kietzmann, Universität Göttingen
DH5/pNF-κB-Luc	<i>Escherichia coli</i> DH5/NF-κB-Luciferase	diese Arbeit
DH5/pcDNA3.1-pNOD1	<i>Escherichia coli</i> DH5/pcDNA3.1-porcines NOD1	diese Arbeit
DH5/pcDNA3.1-pNOD2A	<i>Escherichia coli</i> DH5/pcDNA3.1-porcines NOD2 Abschnitt A	diese Arbeit
DH5/pcDNA3.1-pNOD2B	<i>Escherichia coli</i> DH5/pcDNA3.1-porcines NOD2 Abschnitt A	diese Arbeit
DH5/pcDNA3.1-pNOD2	<i>Escherichia coli</i> DH5/pcDNA3.1-porcines NOD2 (A+B)	diese Arbeit

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

LB-Agar: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar

Für die selektive Anzucht bestimmter Bakterienstämme kamen folgende Endkonzentrationen von Antibiotika zum Einsatz: 100 µg/ml Ampicillin (Amp), 50 µg/ml Nalidixin (Nal) und 50 µg/ml Kanamycin (Km). Die Antibiotika wurden als Stammlösungen (10 mg/ml) bei 4 °C gelagert und bei Bedarf in den entsprechenden Volumina dem Nährmedium zugesetzt.

3.4.2 Bakterienanzucht

Für die Arbeiten mit den Bakterienstämmen wurden diese direkt aus der Kryokultur (-80 °C) (Kap. 3.4.4) mit einer abgeflamten Impföse entnommen, auf LB-Agar-Platten gebracht und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kulturen wurden auf LB-Agar-Platten maximal zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt. Zur Anzucht wurden 2-3 Kolonien in 6 ml LB-Medium überimpft. Die Kolonien wuchsen bei 37 °C und 200 rpm in der Schüttelkultur bis zur entsprechenden OD₆₀₀ 2,2–2,4 (Kap. 3.4.3).

3.4.3 Bestimmung der Bakterienzahl

Für die Ermittlung der Bakterienanzahl wurden Aliquots aus der Schüttelkultur dezimal in 150 mM NaCl verdünnt und in fünffacher Wiederholung auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Bakterienanzahl aus dem Mittelwert der Anzahl KbE unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Folgende durchschnittliche Bakterienanzahl bei einer OD₆₀₀ 2,2-2,4 wurden für die einzelnen Serovare ermittelt:

S. Typhimurium SL1344	2,33±0,09 x 10 ⁹ Bakterien/ml
S. Enteritidis SARB16	2,84±0,13 x 10 ⁹ Bakterien/ml
S. Dublin SARB12	2,18±0,15 x 10 ⁹ Bakterien/ml
S. Choleraesuis SARB4	2,36±0,08 x 10 ⁹ Bakterien/ml

Um für den Infektionstest vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde eine auf die Zellkulturzahl abgestimmte Bakterienanzahl (*Multiplicity of infection*, MOI) verwendet. Hierfür wurde die optische Dichte der Bakterienkultur nach einer 1:20 Verdünnung mit LB-Medium in Kunststoffküvetten photometrisch bei der Wellenlänge λ=600 nm (OD₆₀₀) gemessen. Für diese Trübungsmessung galt steriles LB-Medium als Blindwert. Aufgrund der bereits vorher ermittelten durchschnittlichen Bakteriendichten bei einer OD₆₀₀ 2,2-2,4 wurde die Bakterienzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Bakterienzahl / ml} = \text{durchschnittliche Bakteriendichte bei OD}_{600}(2,2-2,4) \times \text{OD}_{600} \times 20$$

3.4.4 Kryokonservierung von Bakterien

Für die längerfristige Lagerung von Bakterienkulturen wurden diese kryokonserviert. Hierzu wurden die Bakterienstämme in 6 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikazusatz bei entsprechenden Resistenzen (Kap. 3.3 und 3.4.1)) bei 37 °C und 200 rpm bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 3,0$) angezogen. 1 ml dieser Bakterienkultur wurde mit 330 μ l 80 % Glycerin versetzt (Endkonzentration ~ 20 %) und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Erstellung einer Wachstumskurve

Zur Ermittlung einer bakterienstammspezifischen Wachstumskurve wurden die Bakterienkulturen in 6 ml LB-Medium sowie in Zellkulturmedium (DMEM/HAM'S) bei 37 °C und 200 rpm bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} 3,0-4,0$) angezogen. In Intervallen von 30-45min wurde ein Aliquot 1:20 mit LB-Medium oder Zellkulturmedium in Kunststoffküvetten verdünnt und anschließend photometrisch bei der Wellenlänge $\lambda=600$ nm (OD_{600}) gemessen.

3.4.6 Transformation von *E. coli*-Bakterien

Zuerst wurden hierfür elektrokompetente Zellen hergestellt. Hierzu wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 Bakterien in 6 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm bis zur spätlogarithmischen Phase ($OD_{600} \sim 2,0$) angezogen, anschließend 1:500 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm erneut bis zur $OD_{600} 1,0$ angezogen. Bei 8000xg und 4 °C wurden die Bakterien für 15min zentrifugiert, vorsichtig dekantiert und dann mehrmals in gekühltem 10 % Glycerin gewaschen (3 x je 50 ml, 8000xg, 15min, 4 °C; 2 x je 50 ml, 4000xg, 10min, 4 °C; 1 x 25 ml, 2000xg, 10min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 0,5 ml der Glycerinlösung resuspendiert. Die 100 μ l Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die so hergestellten elektrokompetenten Zellen wurden mit 100-200 ng Plasmid-DNA (Kap. 3.7.2) für 1min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation wurde bei 25 μ F, 400 Ω und 2,5 kV durchgeführt. Die Bakterien wurden danach sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Nach einer Ruhezeit von 1h bei Raumtemperatur wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert. Die Transformationseffizienz wurde mittels Plasmidaufarbeitung (Kap. 3.6.4) oder Polymerasekettenreaktion (Kap. 3.6.8) an 10-20 Kolonien überprüft und die erfolgreich transformierten Bakterien kryokonserviert (Kap. 3.4.4).

3.4.7 UV-Inaktivierung von *S. Typhimurium* DT104

Um bei den Chemolumineszenzmessungen (Kap. 3.2.9) eine Beeinflussung durch das Vorhandensein der Salmonellen zu untersuchen, wurden diese schonend abgetötet. Hierzu wurde Ultraviolettstrahlung (UV) genutzt, damit die Oberflächenproteine und -strukturen der Salmonellen erhalten bleiben. *S. Typhimurium* DT104 wurde in 50 ml LB-Medium bis zu einer $OD_{600} 2,2$ angezogen und anschließend zweimalig für 15min bei 4 °C und 6500xg zentrifugiert und mit 25 ml 1XPBS gewaschen. Die Bakterienzahl wurde bestimmt (Kap.

3.4.3) und die Bakteriensuspension 1:1 in 1xPBS verdünnt und auf sterile Petrischalen verteilt. Die Bestrahlung erfolgte für 30min in der Reinraumwerkbank unter Zuhilfenahme einer Philips TUV30W/g30T8 UV-C Lampe. Anschließend wurden die Bakterien erneut zentrifugiert, in 25 ml 1xPBS resuspendiert und die optische Dichte bestimmt. Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Aufgrund der OD₆₀₀ Messung und der Bakterienzahlbestimmung vor und der OD₆₀₀ Messung nach der UV-Behandlung wurde die endgültige Bakteriendichte extrapoliert. Die erfolgreiche Durchführung der UV-Inaktivierung wurde durch Ausplattieren der Aliquots auf LB-Agar-Platten und Inkubation bei 37 °C im Brutschrank über mindestens drei Tage verifiziert (Daten nicht gezeigt).

3.5 Mikroskopische Methoden

3.5.1 Fixierung von Zellen

Für eine weitergehende mikroskopische Betrachtung wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten auf Ø 12 mm Deckgläsern kultiviert (Kap. 3.2.4). Im Anschluss an den Infektionstest (Kap. 3.2.7) oder die Transfektion (Kap. 3.2.8) wurden die Zellen einmalig in 1xPBS gewaschen und mit 500 µl 1 % Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Für die Herstellung von PFA wurden 60 ml H₂O_{bidest} auf 60 °C erwärmt und mit 4 g PFA und 2 M NaOH versetzt. Anschließend wurden 33,2 ml 3xPBS zugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt. Nach Auffüllen der Lösung auf 100 ml mit H₂O_{bidest} wurde diese über einen Membranfilter (0,22 µm) sterilfiltriert und die Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.5.2 Histochemische Färbung und Eindecken der Präparate

Zum Nachweis intrazellulärer Salmonellen im Infektionstest (Kap. 3.2.7) und zur besseren Darstellung der positiv-transfizierten Zellen (Kap.3.2.8) wurden diese histochemisch gefärbt. Dafür wurden die bereits fixierten Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und einer DNA-Färbung unterzogen. Mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) konnte das genetische Material in den Zellkernen und in den Bakterien detektiert werden. Der blaue Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert vorzugsweise mit AT-reichen Regionen doppelsträngiger DNA, dies führt zu einer 20-fachen Eigenfluoreszenzzunahme. 4 µl der DAPI-Färbelösung (1 µg/ml DAPI in 1xPBS) wurden auf je ein Deckglas gegeben und für 5min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit 1xPBS und danach dreimal mit H₂O_{bidest} gewaschen, um mögliche Salzkristallbildungen zu verhindern. Die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten in 3 µl ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) eingedeckt und der Rand der Deckgläser zum Schutz vor Austrocknung mit Nagellack abgedichtet. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Präparate lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Leica CTR6000 B (LEICA *Microsystems Ltd.*). Es wurden die Filter A4 (BP 360/40 400 BP 470/40); L5 (BP480/40 505 BP 527/30) und N3 (BP 546/12 565 BP 600/40) sowie die Objektive HCX PL FLUOTAR L 10x/0.30 PH1 *Dry*, 20x/0.40 PH2 *Dry*, 40x/0.60 PH2 *Dry*, 63x/0.70 PH2 *Dry* und 100x/1.30 *Oil* und die Okularen HC PLANS 10x/25 M genutzt. Eine Metallhalogenitlampe LEICA EL6000 (Osram HXP-R120W/45C Y/S) diente als Lichtquelle. Die erstellten Bilder wurden über die Kamerasysteme LEICA DFC 290 VER1.8.0 und LEICA DFC 360Fx aufgenommen, digital gespeichert und über die Bildbearbeitungsprogramme Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, München) und LEICA Application Suite (LAS, LEICA *Microsystems CMS GmbH*) Version 1.8.0 weiter bearbeitet. Einen Überblick über die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Fluorochrome, deren Exzitations- und Emissionsmaxima und die zu verwendenden Anregungsfilter bzw. Laser gibt Tabelle 6.

Tab. 6 Epifluoreszenzmikroskopübersicht zu den Exzitations- und Emissionsmaxima

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emmissionsmaximum	Filterabkürzung
GFP	489 nm	508 nm	L5
DsRed-Monomer-N1	558 nm	582 nm	N3
DAPI	359 nm	461 nm	A4

3.5.4 Quantitative Auswertung der Transfektionseffizienz und Invasivität von den *Salmonella*-Serovaren

Für die Ermittlung der Transfektionseffizienz bei den unterschiedlichen Zellkulturen oder der Invasivität einzelner *Salmonella*-Serovare wurden die Zellen auf Deckgläser kultiviert (Kap. 3.2.4), transfiziert (Kap. 3.2.8) oder einem Infektionstest unterzogen (Kap. 3.2.7) und anschließend in 1 % PFA fixiert (Kap. 3.5.1). Nach der DNA-Färbung und dem Eindecken der Präparate (Kap. 3.5.2) wurden die Versuche am Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet (Kap. 3.5.3). Hierzu wurden pro Deckglas 10-20 zufällig ausgewählte, über das Präparat gleichmäßig verteilte Bilder mit einer 1000-fachen oder auch 630-fachen Vergrößerung erstellt. Die digital gespeicherten Bilder wurden anschließend visuell ausgewertet. Dabei wurden folgende Werte ermittelt:

(1) Bei den Transfektionsversuchen wurden die Zelldichten, mögliche Zellschädigungen in Form von Änderungen der Zellkernmorphologie (z. B. drastische Verringerung des Zellumfanges, Chromatinkondensation (Karyopyknose) oder Fragmentierung des Zellkernes (Karyorrhesis), Abschnürung apoptotischer Körperchen) und die Anzahl positiv-transfizierter und damit rot fluoreszierender Zellen pro Blickfeld ermittelt.

(2) Bei den Infektionstests wurden ebenfalls die Zelldichten, mögliche Zellschädigungen in Form von Änderungen der Zellkernmorphologie, Anzahl der intrazellulären Salmonellen pro Einzelzelle sowie die Anzahl infizierter Zellen pro Blickfeld ermittelt. Bei sehr hoher, nicht zählbarer Invasivität der Bakterien wurde die Anzahl intrazellulärer Salmonellen bestmöglich geschätzt.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook und Russel (2001), oder an diesen Standard angelehnt, durchgeführt.

3.6.1 Isolierung von RNA

Mittels des RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen) unter Zuhilfenahme von den Lysing Matrix Tubes D (Qbiogene) und dem Fast Prep® Instrument (Qbiogene) wurde die RNA aufgearbeitet. Die RNA wurde zum einen aus Gewebeproben eines sechs Wochen alten Ferkels gewonnen. Hierzu wurden 1 x 3 cm große Darmabschnitte aus dem Jejunum sofort nach der Schlachtung mit RNA $later^{\text{TM}}$ (Qiagen) versetzt und bei -80 °C gelagert. Der Schlachtversuch verlief im Rahmen des DFG-FOR 438. Zusätzlich wurde RNA aus den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen gewonnen. Die Verwendung der Kits und Geräte erfolgte nach den Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 100 μl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H₂O_{bidest} eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.6.2 DNase-Behandlung der RNA-Proben

Im Anschluss an die RNA-Aufarbeitung (Kap. 3.6.1) erfolgte eine DNase Behandlung der Proben, um störende Einflüsse noch vorhandener DNA bei den weiteren Versuchen zu vermeiden. Hierzu wurden 50 μl der RNA-Probe mit 15 μl 10xDNase-Puffer und 50 Einheiten DNase I (RNase-free DNase Set, Qiagen) versetzt, mit DEPC-H₂O_{bidest} auf 150 μl aufgefüllt und bei 37 °C im Brutschrank für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die RNA-Proben einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (Kap. 3.6.3).

10xDNase-Puffer 1M NaOAc, 0,05M MgSO₄ (pH 5,25) in DEPC-H₂O_{bidest}

3.6.3 Reinigung der Nukleinsäure mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Mittels Phenolisierung wurden Proteine aus vorangegangenen enzymatischen Reaktionen aus der Nukleinsäurelösung extrahiert. Da Phenol als Wasserstoffbrückenbildner gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten eingehen kann, führt es zur Proteindenaturierung und zur Anreicherung der unerwünschten Proteine in der Phenolphase. Hierzu wurden 150 μl DNase behandelte RNA (Kap. 3.6.2) mit 250 μl DEPC-H₂O_{bidest} und 600 μl Phenol versetzt. Der Ansatz wurde mit Hilfe eines Vortexer gründlich durchmischt und für 4min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die organische Phenolphase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Probe zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt. Chloroform denaturiert ebenfalls Proteine, erleichtert die Phasentrennung und löst die restlichen Phenolbestandteile aus der Nukleinsäurelösung. Dazu wurde die wässrige, nukleinsäurehaltige Phase mit 600 μl Chloroform versetzt, gut durchmischt, für 4min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert und die organische Chloroformphase vorsichtig abgenommen und verworfen. Die anschließende Präzipitation der Nukleinsäure dient der Konzentrierung der Probe und der Säuberung von Phenol- und Chloroformresten oder Pufferkomponenten. Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung mit dem

0,1-fachen Volumen an 3 M Natriumacetat NaOAc (pH 4,0-5,0) und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt. Die Ethanol-Natriumacetat-Fällung wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert und anschließend 1h bei 30.000xg und 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5min zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Nukleinsäurepellets bei Raumtemperatur für circa 10min wurde es in 200 µl 0,1 mM EDTA (in DEPC-H₂O_{bidest}, pH 8,0) gelöst und bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmide sind extrachromosomale, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in dieser Arbeit für die Expression fremder Gene in eukaryotischen Zellen durch Transfektion genutzt wurden (Kap. 3.2.8 und 3.2.9). Eine Vervielfältigung der Plasmide gelang durch die Transformierung von *E. coli*. Aus diesen transformierten *E. coli* DH5 (Kap. 3.4.6) wurden die Plasmide pNF-κB-Luc, pDsRed-Mito und pcDNA3.1 mittels des Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) isoliert. Die Verwendung des Kits erfolgte nach den Herstellerangaben. Die DNA wurde anschließend in 100 µl DEPC-H₂O_{bidest} eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.6.5 Restriktionsendonukleaseverdau der Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an sequenzspezifischen Schnittstellen. Für die Überprüfung der erfolgreichen Transformation von *E. coli* (Kap. 3.4.6) und für die Klonierung von porcinem NOD (Kap. 3.6.10) wurden die aufgereinigten Plasmid-DNA-Proben sowie die cDNA-Proben mittels Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierzu wurden 5 µl der DNA mit 2 µl Restriktionsendonuklease-Puffer D (Promega) und je 1 µl RE (beispielsweise *NotI* und *SalI* bei pDsRed-Monomer-N1-Mito) versetzt und auf 20 µl mit DEPC-H₂O_{bidest} aufgefüllt.

Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Tab. 7 Übersicht der Restriktionsendonukleasen und entsprechender Puffer

Bezeichnung	Puffer	Schnittstelle (5'→3')	Anwendung	Herkunft
<i>Bam</i> HI	E	G [▼] GATCC	Porcines NOD2, Abschnitt 1	Promega
<i>Eco</i> RI	H	G [▼] AATTC	Porcines NOD2	Promega
<i>Eco</i> RV	D	GAT [▼] ATC	Porcines NOD2, Abschnitt 2 pNF-κB-LUC	Promega
<i>Hind</i> III	E	A [▼] AGCTT	Porcines NOD1	Promega
<i>Not</i> I	D	GC [▼] GGCCGC	pDsRed-Monomer-N1-Mito	Promega
<i>Sal</i> I	D	G [▼] TCGAC	pDsRed-Monomer-N1-Mito	Promega
<i>Xho</i> I	D	C [▼] TCGAG	Porcines NOD1 pNF-κB-Luc	Promega

Nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde 1 µg RNase A (Ribonuklease A Type XII-A, Sigma-Aldrich) zu dem Restriktionsendonukleaseverdau gegeben und der Ansatz für weitere 30min bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene Plasmid-DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.6.9) überprüft und bei -20 °C gelagert.

3.6.6 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von wässrigen Nucleinsäurelösungen erfolgt im ultravioletten Bereich (UV) bei 260 nm. Aufgrund des Hyperchromieeffektes ist der Absorptionskoeffizient eines Nucleotids in einzelsträngiger Nucleinsäure geringer als der Absorptionskoeffizient eines Nucleotids in doppelsträngiger Nucleinsäure. Die photometrische Messung erfolgte nach einer Verdünnung der Probe von 1:200 in DEPC-H₂O_{bidest} bei λ=260 nm in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich für die Nucleinsäurekonzentration folgende Gleichung:

$$E_{260} = \epsilon \times c \times d$$

E_{260} = gemessene Extinktion bei OD₂₆₀

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [l mol⁻¹ cm⁻¹]

ϵ für doppelsträngige DNA bei OD₂₆₀ 1 = 1/50 l mol⁻¹ cm⁻¹ = 1/50 ml µg⁻¹ cm⁻¹

ϵ für einzelsträngige RNA bei OD₂₆₀ 1 = 1/40 l mol⁻¹ cm⁻¹ = 1/40 ml µg⁻¹ cm⁻¹

c = Nucleinsäure-Konzentration [µg ml⁻¹]

$c = E_{260} \times 50 \mu\text{g ml}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Aufgrund der teilweisen Überlagerung der Absorptionen von Nucleinsäuren bei 260 nm und Proteinen bei 280 nm wurde zusätzlich der Quotient E_{260}/E_{280} gebildet, um die Reinheit der Nucleinsäurepräparation zu ermitteln. Das Optimum von E_{260}/E_{280} sollte bei 1,8-2,0 liegen.

3.6.7 Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RNA-abhängige DNA-Polymerase dient der Transkription von längeren mRNA-Molekülen und damit der Herstellung von komplementärer DNA (cDNA). Hierfür kam die *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV)-Reverse Transkriptase (Promega) zum Einsatz. Dazu wurden 2 µg DNase behandelte RNA (Kap. 3.6.2) mit 2,2 µl 10 pM oligo(dT)₁₅ versetzt und mit DEPC-H₂O_{bidest} auf 10 µl aufgefüllt. Bei 70 °C, 300 rpm und 5min wurde die Sekundärstruktur der RNA gelöst, anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und 5 µl 5xRT-Puffer (Promega), 5 µl 2mM dNTP's (Roti-Mix PCR1, Roth), 20 Einheiten rRNasin® RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega), 200 Einheiten M-MLV- Reverse Transkriptase (200 U/µl, Promega), auf 25 µl DEPC-H₂O_{bidest} zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 42 °C für 60min. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase durch das Erhitzen der Proben auf 70 °C für 15min inaktiviert. Bei jedem Versuch wurden Leerwertkontrollen (DEPC-H₂O_{bidest}) mitgeführt. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

Für die RT-PCR der RNA aus dem Darmgewebe wurde das ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) genutzt. Die Verwendung des Kits erfolgte nach den Herstellerangaben. Die cDNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Die Kontrolle der RT-PCR erfolgte mit einer PCR (Kap. 3.6.8) auf β- und α-Aktin sowie GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase).

3.6.8 Polymerasekettenreaktion

Die Vervielfältigung der Nukleinsäure über die PCR diente **(1)** dem Nachweis einer erfolgreich durchgeführten RT-PCR (Kap. 3.6.7), **(2)** dem Nachweis von Genen oder spezifischen Genabschnitten und **(3)** der Herstellung von ausreichenden Mengen Ausgangsmaterial für die Sequenzierung und Klonierung (Kap. 3.6.10). Als Ausgangs-DNA wurden 200-300 ng cDNA-Proben (Kap. 3.6.7) eingesetzt. Die verwendeten Reagenzien stammten von folgenden Herstellern: 2 mM dNTP's (Roti-Mix PCR1, Roth); 10xBioTherm PCR buffer (Rapidozym); 50 mM MgCl₂ (Rapidozym), Biotherm™ Taq DNA-Polymerase (5 U/μl, Rapidozym). Bei jeder PCR wurden Positivkontrollen (Referenz-DNA) und Leerwertkontrollen (DEPC-H₂O_{bidest}) mitgeführt. Die DNA-Fragmente wurden bis zur weiteren Benutzung bei 4 °C gelagert. Für die Standard-PCR setzte sich der Reaktionsansatz wie in Tabelle 8 zusammen.

Neben der Biotherm™ Taq DNA-Polymerase (Rapidozym) wurden die AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (5 U/μl, Invitrogen) und die AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (2,5 U/μl, Invitrogen) für die Amplifizierung ganzer Gene (hier porcines NOD) genutzt. Die Verwendung der Polymerasen erfolgte nach den Herstellerangaben.

Tab. 8 Reaktionsansatz für die Standard-PCR

	Menge	Reagenz
	5,0 μl	PCR-Puffer (10x)
	2,5 μl	MgCl ₂ (50 mM)
	2,0 μl	dNTPs (10 mM je Nukleotid)
	2,0 μl	je Primer (10 pmol/μl)
	0,2 μl	Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)
	1,0 μl	cDNA (200-300 ng)
ad	50 μl	H ₂ O _{millipore}

Die Temperatur der Primeranlagerung richtet sich nach der Schmelztemperatur (T_m in °C) des Primers. In Tabelle 9 ist der Programmablauf der durchgeführten Standard-PCR wiedergegeben.

Tab. 9 Programmablauf der Standard-PCR

Schritt	Phase	Temperatur	Zeit
1	Prädenaturierung	94 °C	2min
2	Denaturierung	94 °C	1min
3	Primeranlagerung	55 -65 °C	1min
4	Elongation	72 °C	1min/kb
Schritt 2 bis 4: 35 Zyklen			
5	Endelongation	72 °C	10min

3.6.9 Agarosegelelektrophorese

Durch die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld konnten sowohl die DNA- und RNA-Proben als auch die DNA-Fragmente aus den PCR-Reaktionen (Kap. 3.6.8) analysiert, charakterisiert und auf ihre Reinheit hin untersucht werden. Hierzu wurde die tragergebundene, horizontale Agarosegelelektrophorese genutzt. Die Agarose wird durch vorsichtiges Aufkochen in 100 ml 1xTBE gelöst und nach dem Abkühlen auf 55 C bis 60 C mit 1,3 l Ethidiumbromidlösung (1 %) zum Sichtbarmachen der Nukleinsäure unter UV-Licht versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung in Flachbettapparaturen mit Probenstaschenkammen gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Agarosegehalt wurde je nach erwarteter Fragmentgröße zwischen 0,8 % (bis 7 kbp), 1,2 % (0,4–6 kbp) und 2 % (0,1–2 kbp) gewählt. 5 l DNA-Probe wurden vor dem Auftragen mit 2 l 5xLadepuffer gemischt. Für die Größenbestimmung und Zuordnung der Nukleinsäurefragmente wurde der Größenstandard 100 bp-DNA-Leiter *extended* (17 Fragmente, 100-5000 bp, Roth) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (80-120 V) für 60-90min. Anschließend wurden die Agarosegele mittels eines UV-Transilluminators und eines Videoprintersystems ausgewertet und dokumentiert. Gesamt-RNA Preparationen enthalten ribosomale RNA-Moleküle, die sich als scharfe Banden bei 4,7 kbp (28-S-rRNA) und 1,8 kbp (18-S-rRNA) abzeichnen. Sie wurden als interne Kontrollen der RNA-Aufarbeitung (Kap. 3.6.1) herangezogen.

1xTBE: 108 g/l TRIS, 55 g/l Borsäure, 20 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0)
 5xLadepuffer: 50 % Glyzerin, 100 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0), 1 mM TRIS-HCl (10 mM Stammlösung, pH 8,0), 0,025 % Bromphenolblau

3.6.10 Klonierung des porcinen NOD1 und NOD2 und Sequenzierung

Mit Hilfe der Klonierung können DNA-Sequenzen über so genannte Transportvehikel, die Vektoren, in eine Empfängerzelle eingeschleust und somit vervielfältigt werden. Für die Klonierung von porcinem NOD1 und NOD2 (pNOD1, pNOD2) wurden Restriktionsendonuklease-Schnittstellen in den PCR-Fragmenten und den Vektoren genutzt. Durch das Schneiden der hier verwendeten Restriktionsendonukleasen an den sequenzspezifischen Schnittstellen entstehen überhängende Enden (*sticky ends*) (Tab. 7). Die so entstandenen zueinander kompatiblen, überhängenden Enden an Vektor- und Ziel-DNA hybridisieren in einer nachfolgenden Reaktion miteinander.

Zunächst wurde das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen) in *E. coli* vervielfältigt (Kap. 3.4.6) und anschließend mit Hilfe der Plasmidpreparation nach dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) aufgereinigt (Kap. 3.6.4). Die Vektorplasmid-DNA wurde durch den Einsatz zweier Restriktionsendonukleasen (*HindIII* und *XhoI* für pNOD1; *BamHI*, *EcoRI* und *EcoRV* für pNOD2 (Abb. 10, 11)) linearisiert und anschließend mit 1 U/l alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Phosphatase*, New England Biolabs) für 60min bei 37 C inkubiert, um eine Rezirkularisierung der Plasmide zu vermeiden. Durch den Verdau des Plasmids mit zwei Restriktionsendonukleasen wird ein Polylinker (10-15 bp) frei gesetzt. Da dieser bei der Hybridisierungsreaktion und der Ligation stört, wird er über eine anschließende Ethanolfällung aus dem Vektorgemisch entfernt (Kap. 3.6.3). Die Ziel-DNA (pNOD1 und

3. Material und Methoden

pNOD2A und B) wurde als cDNA in einer PCR-Reaktion mittels der AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) und den porcinen NOD-Primern mit integrierten Restriktionsendonuklease-Schnittstellen amplifiziert (Kap. 3.6.8). Das porcine NOD1 wurde in seiner ganzen Länge von 2915 bp mit Hilfe der Primer pNOD1HF und pNOD1XR amplifiziert (Kap. 3.7.1). Porcines NOD2 wurde in zwei sich mit 170 bp überlappenden Sequenzbereichen mit dem Abschnitt A von 1816 bp und dem Abschnitt B von 1448 bp durch die Primerpaare pNOD2BF/pNOD2_exon3R und pNOD2_exon3F3/pNOD2ER amplifiziert (Abb. 12 und Kap. 3.7.1).

Anschließend wurde die Ziel-DNA mit den gleichen Restriktionsendonukleasen, welche auch bei der Vektor-DNA verwendet wurde, geschnitten. Für die Hybridisierungsreaktion wurden die Konzentrationen der Ziel-DNA und des linearisierten Plasmids bestimmt (Kap. 3.6.6), beide im Verhältnis von 2:1 vermengt und anschließend durch eine Ligation kovalent verbunden. Hierfür wurden dem Gemisch 1xT4-DNA-Ligasepuffer und 1 Einheit T4-DNA-Ligase (Fermentas) hinzu gegeben und der Ansatz für 2h bei RT inkubiert. Als Kontrollen wurden zusätzlich das zirkuläre Plasmid und das lineare Plasmid mit und ohne Ligase mitgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

10xT4-DNA-Ligasepuffer 700 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 10 mM DTT, 10 mM ATP, 100 mM MgCl₂

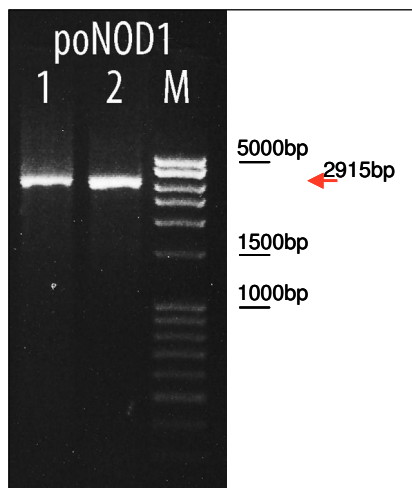


Abb. 10 Amplifizierung von porcinem NOD1

Die PCR erfolgte mit dem Primerpaar pNOD1HF und pNOD1XR mit einer Primeranlagerungstemperatur von 65 °C und 30 Zyklen, das erwartete Produkt war 2915 Basenpaare (bp) lang.

Nr. 1, 2 = cDNA aus Jejunum (Doppelansatz); M = 100 bp-DNA-Leiter *extended* (100-5000 bp, Roth)

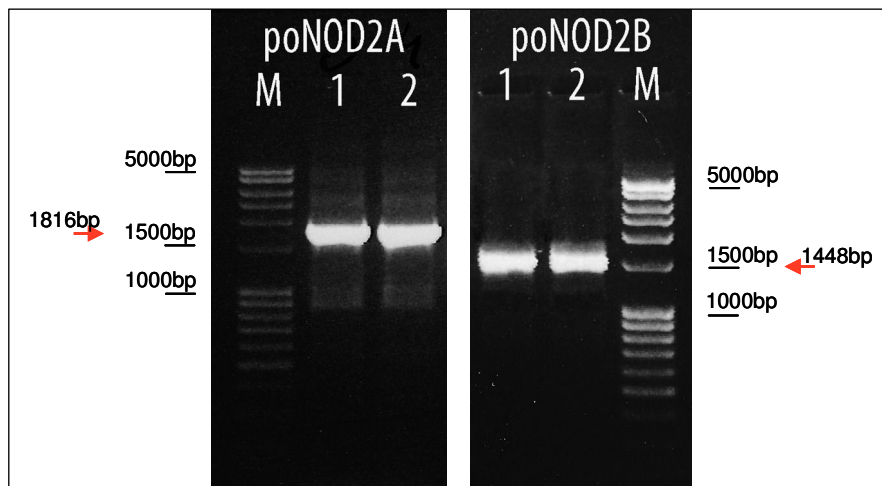


Abb. 11 Amplifizierung von porcinem NOD2

Die PCR erfolgte für das Produkt A mit den Primerpaaren pNOD2BF und pNOD2_exon3R und für das Produkt B mit den Primerpaaren pNOD2_exon3F3 und pNOD2ER mit einer Primeranlagerungstemperatur von 63 °C und 30 Zyklen, das erwartete Produkt war für A

1816 Basenpaare (bp) und für B 1448 bp lang. Nr. 1, 2 = cDNA aus porcinem Jejunum (Doppelansatz); M = 100 bp-DNA-Leiter *extended* (100-5000 bp, Roth)

Porcines NOD2 musste in zwei separaten Schritten kloniert werden. Der erste Genabschnitt wurde durch das Primerpaar pNOD2BF/pNOD2ex3R vervielfältigt und über die Restriktionsendonuklease-Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in das Plasmid pcDNA3.1(+) gebracht, so dass pcDNA-pNOD2A entstand. Der zweite Genabschnitt pcDNA-pNOD2B wurde durch die Amplifizierung mit pNOD2ex3F/pNOD2ER und die RE *Eco*RI und *Eco*RV in pcDNA3.1(+) kloniert. Anschließend wurde das *Eco*RI/*Eco*RV-Fragment aus pcDNA-pNOD2B herausgeschnitten und in die *Eco*RI/*Eco*RV-Schnittstellen von pcDNA-pNOD2A hineinkloniert, so dass pcDNA-pNOD2 entstand (Abb. 12).

Es folgte eine Transformation von *E. coli* DH5 mit den hergestellten Konstrukten pcDNA-pNOD1 und pcDNA-pNOD2 (Kap. 3.4.6). Die erfolgreich transformierten Bakterienzellen wurden mittels Antibiotikaselektion isoliert und anschließend das synthetisierte Plasmidkonstrukt über eine Plasmidpräparation aufgereinigt (Kap. 3.6.4). Zur Kontrolle wurden diese Plasmid-Insert-Konstrukte mittels Restriktionsendonukleaseverdau (Kap. 3.6.5) und Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.6.9) untersucht. PcDNA3.1-pNOD1 und pcDNA3.1-pNOD2 wurden anschließend durch die Firma LGC Genomics GmbH (MTB Sequencing mittels ABI 3730XL und 3130XL) sequenziert.

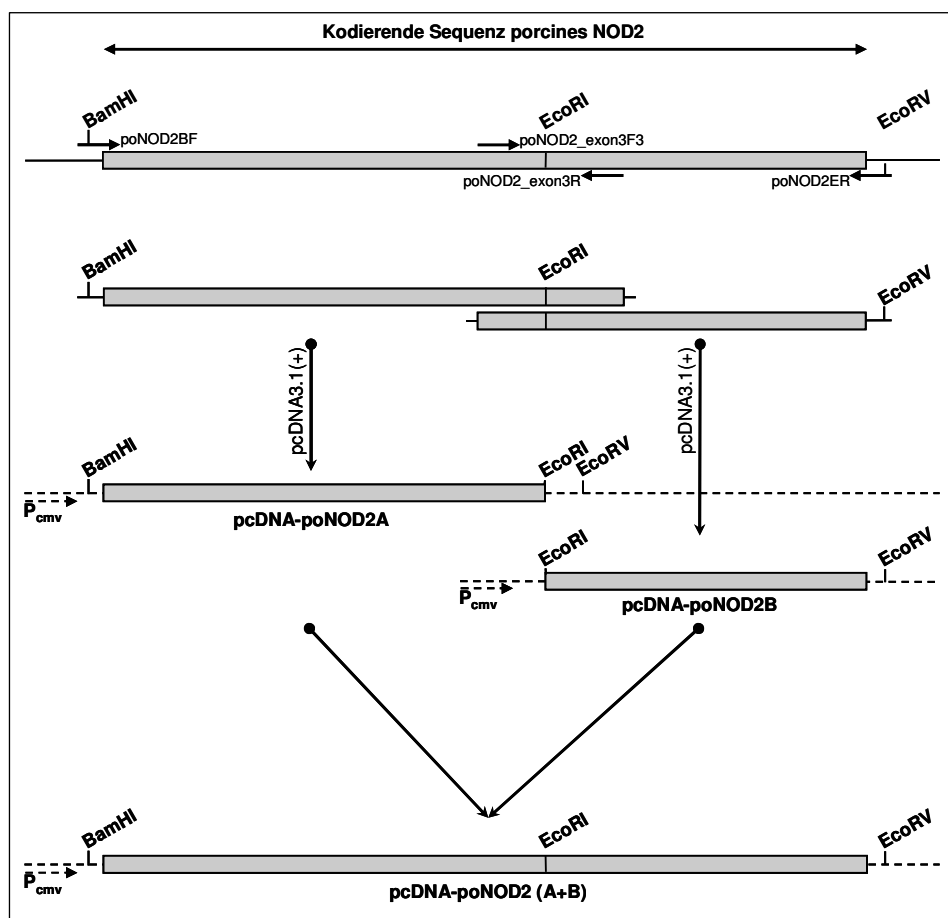


Abb. 12 Schematische Übersicht zur Klonierung von porcinem NOD2

3.6.11 Untersuchung der porcinen NOD1- und NOD2-Sequenz

Die ermittelten porcinen NOD1- und NOD2-Sequenzen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Software auf Homologien, Strukturvoraussagungen und ihrer Phylogenie untersucht. Die ermittelten Sequenzen wurden einer Alignierung unterzogen. Die Alignierung dient dem Vergleich zweier oder mehrerer Sequenzen. Hierbei entspricht prinzipiell die Fehlpaarung einer Mutation und Lücken weisen auf Deletionen oder Insertionen hin. Sequenzen mit einer hohen Homologie, oder besser Ähnlichkeit, weisen auf eine evolutionäre und/oder funktionelle Verwandtschaft hin. In der vorliegenden Arbeit wurde eine paarweise, lokale Alignierung mit Hilfe des BLAST-Algorithmus durchgeführt (*National Library of Medicine*, 2009)⁷. Hierbei wurden Sequenzen und/oder Teilsequenzen miteinander verglichen, deren optimaler Alignment-Score maximal ist. Um Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Organismen zu identifizieren wurde der *discontiguous megablast* und der Protein-Protein-BLAST verwendet. Die Homologien werden definiert über den *bit-score* und den E-Wert. Der *bit-score* ist eine quantitative Bewertung der Homologien, es gilt: Je höher der Wert, desto höher die Homologie. Der *bit-score* von verschiedenen Alignierungen ist miteinander vergleichbar, da es sich um einen normalisierten Wert handelt. Der E-Wert gibt einen Eindruck für die statistische Signifikanz der Alignierung, es gilt: Je kleiner der E-Wert, desto geringer ist die Irrtumswahrscheinlichkeit. Die Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen von pNOD1 und pNOD2 (diese Arbeit) wurden mit folgenden Sequenzen der Datenbank NCBI⁸ verglichen: **NOD1:** *Sus scrofa* (AB187219.1, BAG12313.1); *Bos taurus* (XM_598513.5, XP_598513.3); *Equus caballus* (XM_001499566.1, XP_001499616.1); *Canis familiaris* (XM_539499.2, XP_539499.2); *Homo sapiens* (NM_006092.2, NP_006083.1); *Pan troglodytes* (XM_527711.2, XP_527711.2); *Pongo abelii* (XM_002818085.1, XP_002818131.1); *Macaca mulatta* (XM_001085719.2, XP_001085719.1); *Callithrix jacchus* (XM_002751433.1, XP_002751479.1); *Mus musculus* (NM_001171007.1, NP_001164478.1); *Rattus norvegicus* (NM_001109236.1, NP_001102706.1); *Oryctolagus cuniculus* (XM_002713735.1, XP_002713781.1); *Taeniopygia guttata* (XM_002196284.1, XP_002196320.1). **NOD2:** *Sus scrofa* (AB195466.1, BAF76325.1); *Bos taurus* (NM_001002889.1, NP_001002889.1); *Ovis aries* (AM932877.1, CAP69986.1, CAP69987.1); *Canis familiaris* (XM_544412.2, XP_544412.2); *Homo sapiens* (NM_022162.1, NP_071445.1); *Pan troglodytes* (NM_001105240.1, NP_001098710.1); *Macaca mulatta* (XM_001084287.2, XP_001084287.1); *Mus musculus* (NM_145857.2, NP_665856.2); *Rattus norvegicus* (NM_001106172.1, NP_001099642.1); *Monodelphis domestica* (XM_001371542.1, XP_001371579.1); *Danio rerio* (XM_692832.4, XP_697924.3); *Takifugu rubripes* (NM_001042448.1, NP_001035913.1); *Ictalurus punctatus* (FJ004845.1, ACM45225.1). Die Analyse der Primärstrukturen von NOD1 und NOD2 erfolgte mit Hilfe der SMART- (Letunic *et al.*, 2009)⁹ und der PSI-BLAST-Programm¹⁰. Die vorausgesagte Sekundärstruktur des Proteins wurde mit Hilfe von PsiPred¹¹ erstellt (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000).

⁷ BLAST = *basic local alignment search tool*; Zugriff unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁸ NCBI = *National Center for Biotechnology Information*; Zugriff unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>

⁹ SMART = *simple modular architecture research tool*; Zugriff unter <http://smart.embl-heidelberg.de>

¹⁰ Zugriff unter www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome

¹¹ Zugriff unter <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

3.6.12 Erstellung des porcinen NOD1 und NOD2 phylogenetischen Baumes

Um den Verwandtschaftsgrad der porcinen NOD1- und NOD2-Sequenz aufzuzeigen, wurde ein phylogenetischer Baum basierend auf den Aminosäuresequenzdaten erstellt. Ein phylogenetischer Baum zeigt die Möglichkeit auf, dass zwei Spezies einen höheren Verwandtschaftsgrad besitzen gegenüber einer dritten Spezies. Dennoch kann diese Phylogenie basierend auf einzelnen Sequenzdaten nicht als allgemeingültig gelten. Der in dieser Arbeit dargestellte ungewurzelte phylogenetische Baum zeigt somit allein die Beziehungen zwischen den untersuchten Spezies auf. Diese Beziehungen zueinander wurden mittels *Clustering*-Verfahren, hier dem *Neighbor Joining* (NJ) als genetisches Distanzverfahren durchgeführt (Saitou und Nei, 1987).

Für die Erstellung des phylogenetischen Baumes von NOD1 und NOD2 wurde zunächst ein Multiples Sequenzalignment mittels ClustalW und der Distanzmethode BLOSUM durchgeführt (Thomson *et al.*, 1994; Henikoff und Henikoff, 1992). Anschließend wurde der phylogenetische Baum über das Distanzverfahren mittels *Neighbour Joining* (*Clustering*-Methode) im MEGA4¹² Programm Version 4 (Kumar *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2007) errechnet. Daraufhin wurde über das Programm Phylip eine Baum-Datei erstellt (Olsen *et al.*, 1994)¹³, welche durch das Phylogendron-Programm (*phylogenetic tree printer*)¹⁴ graphisch dargestellt wurde. Die Zuverlässigkeit des phylogenetischen Baumes wurde sichergestellt über 1000 *Bootstrap*-Rechenkreisläufe.

Zur Darstellung der genetischen Distanzen wurde ein Phylogramm gewählt unter Angabe der errechneten *Bootstrap*-Werte. Die *Bootstrap*-Werte entsprechen hierbei der Wahrscheinlichkeit, dass das dargestellte Verzweigungsmuster der Wahrheit entspricht. Das Phylogramm gibt ein Verzweigungsmuster wieder, wobei die Längen der Äste hierbei der Anzahl der beobachteten Merkmalsausaustausche oder der molekulargenetischen Distanz entsprechen. Somit sind die Abstände zwischen den Spezies ein Maß für den Grad der Verwandtschaft. Da es sich um einen ungewurzelten Baum handelt, wurde zur besseren Darstellung die Mittelpunktswurzelung gewählt. Es sei darauf hingewiesen, dass verschiedene Genabschnitte unterschiedlich schnell evolvieren. Die in dieser Arbeit genutzte Sequenz eines eher konservierten Genes (Exons, kodierende Sequenz) im Gegensatz zu hochvariablen Introns erlaubt die alleinige Aussage auf höheren taxonomischen Niveaus (Ordnung, Klassen, Abteilungen).

3.7 Materialien

3.7.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) stammen von den Firmen Sigma Genosys (Steinheim) und Operon (Köln). Die Tabelle 10 zeigt die DNA-Sequenzen der Primer. Die DNA-Sequenzen wurden aus Veröffentlichungen entnommen oder selbstständig generiert

¹² MEGA (*Molecular Evolution Genetics Analysis*)

¹³ Zugriff unter <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=fastdnaml>

¹⁴ Zugriff unter <http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>

3. Material und Methoden

mittels HUSAR (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg).

Tab. 10 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
Poly A-Region	oligo(dT) ₁₅	5' TTTTTTTTTTTTTTTT	IMT
Porcines α-Aktin	poACTa1	5' ATCGTCCACCGCAAATGCTTC 5' CCTTCCACAGGGCTTCGTTTTA	IMT
Porcines β-Aktin	poβ-Actin	5' GGACTTCGAGCAGGAGATGG 5' GCACCGTGTGGCGTAGAGG	IMT
Porcine GADPH	poG3PDH	5' CCATCACTATCTTCCAGGAGCGTGAC 5' AAGTTGTCATGGATGACCTTGGCCA	IMT
Porcines NOD1	pNOD1_exon3	5' CACCGAGGTCCATCTGAACAGG 5' GCGCAGGCTGGAGAACAGGT	diese Arbeit
Porcines NOD2	pNOD2_exon3	5' GAACTCAGCCTCAAGGGTTTCTCAG 5' ATGACGGTGGCACGTCAGCACTG	diese Arbeit
Porcines NOD2	pNOD2_exon3F3	5' GCAGCTGCAGGCAGCACACGTCG	diese Arbeit
Porcines NOD1 Sequenzierung	pNOD1HF pNOD1XR	5' AGCGTATCAAGCTTCCCTGCCACCAT GGAAAAGCAGGGCCGCGAGTGAGATGGAAG 5' GCATAATCTAGACTCGAGTCAGAC AACGGCTCAGAAACAGACAATCCGCTTCTC GTC	diese Arbeit
Porcines NOD2 Sequenzierung	pNOD2BF pNOD2ER	5' GATCGAGCTCGGATCCAAGCCACC ATGTGTGCCAGGGGGCTTTCCAGGCACA GAG 5' GATCTCATGATATCTGGCCCCAGGA ACATCAAAGCAGGAGTCTCGTGTCCCTCTG	diese Arbeit
Murine GADPH	mGADPH	5' TCACCATCTTCCAGGAGCG 5' CTGCTTACCACCTTCTTGA	Nguyen <i>et al.</i> , 2000
Murines β-Aktin	mβ-actin	5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA 5' CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC	Kleinert <i>et al.</i> , 1996
Murines NOD1	mNOD1	5' CTTGCATTCAATGGCATCTC 5' ACATCGGTGTGCACTGTGGA	Opitz <i>et al.</i> , 2007
Murines NOD2	mNOD2	5' AGCAGAACTTCTTGTCCCTGA 5' TCACAACAAGAGTCTGGCGT	Opitz <i>et al.</i> , 2007
Humane GADPH	hGADPH	5' TCATCTCTGCCCCCTCTGCT 5' CGACGCCTGCTTACCACCT	Podolsky, 2003
Humanes β-Aktin	hβ-actin	5' AGCCAACCGCGAGAAGATGACC 5' GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC	Kana <i>et al.</i> , 2006
Humanes NOD1	hNOD1	5' AAGCGAAGAGCTGACCAAAT 5' TTCATAGACTTTGGCCTCCTC	Opitz <i>et al.</i> , 2005
Humanes NOD2	hNOD2	5' AGCCATTGTCAGGAGGCTC 5' CGTCTCTGCTCCATCATAGG	Gutierrez <i>et al.</i> , 2002

3.7.2 Plasmide

Tab. 11 Auflistung der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle / Referenz
pDsRed-Monomer-N1-Mito	P _{CMV IE} , DsRed-Monomer, SV40 polyA, f1 ori, SV40 ori, Kan/Neo ^r , HSV TK polyA, pUC ori	Clontech, Saint-Germain-en-Laye Frankreich
pNF-κB-Luc	NF-κB enhancer (TGGGGACTTTCCGC) ₅ , TATA, Luc, SV40 polyA, P bla, Amp ^r , pUC ori (PathDetect@cis-Reporting System)	Stratagene, Waldbronn
pcDNA3.1	P _{CMV IE} , BGH pA, f1 ori, SV40 ori, Neo ^r , SV40 polyA, pUC ori, Amp ^r	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1-pNOD1	P _{CMV IE} , BGH pA, f1 ori, SV40 ori, Neo ^r , SV40 polyA, pUC ori, Amp ^r ; Insert porcines NOD1	diese Arbeit
pcDNA3.1-pNOD2A	P _{CMV IE} , BGH pA, f1 ori, SV40 ori, Neo ^r , SV40 polyA, pUC ori, Amp ^r ; Insert porcines NOD2A	diese Arbeit
pcDNA3.1-pNOD2B	P _{CMV IE} , BGH pA, f1 ori, SV40 ori, Neo ^r , SV40 polyA, pUC ori, Amp ^r ; Insert porcines NOD2B	diese Arbeit
pcDNA3.1-pNOD2	P _{CMV IE} , BGH pA, f1 ori, SV40 ori, Neo ^r , SV40 polyA, pUC ori, Amp ^r ; Insert porcines NOD2A+B	diese Arbeit

3.7.3 Chemikalien, Enzyme und Fluoreszenzfarbstoffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Biochrom (Berlin), Fluka-Riedel-de Haën (Seelze), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Grenzach-Wyhlen) und Sigma-Aldrich (München). Darüber hinaus wurden die nachfolgenden Enzyme und Fluoreszenzfarbstoffe verwendet:

RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen	Promega, Madison USA
RNase A (Ribonuklease A Type XII-A)	Sigma-Aldrich, München
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison USA
ImProm-II™ Reverse Transcription System	Promega, Madison USA
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison USA
Biotherm™ Taq DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin
AccuPrime™ Taq	
DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
ProLong® Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe

3.7.4 Kits, Lösungen und Medien

Es wurden folgende Kits in der Arbeit verwendet: Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Madison USA), RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden) und Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden).

Für die Sterilisation wurden Lösungen, Medien und Medienzusätze mit H₂O_{bidest} hergestellt und für 20min bei 121 °C und ~200 kPa autoklaviert. Thermolabile Lösungen und Medienzusätze wurden der Sterilfiltration mit Einmalfiltern in Form von Spritzenvorsätzen (0,45 µm Porengröße) unterzogen. Der Nähragar wurde vor dem Zusatz entsprechender Antibiotika im Wasserbad auf 55 °C abgekühlt. Spezifische Lösungen für die einzelnen Methoden wurden in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

1xPBS:	8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
DEPC-H ₂ O _{bidest}	1:1000 DEPC in H ₂ O _{bidest} , Inkubation in einem geschlossenen Gefäß über Nacht, anschließend autoklavieren

3.7.5 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten	2 mm, peqLab, Erlangen
Glasdeckgläser	Ø 12 mm, Roth, Karlsruhe
Gummischaber	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Halbmikroküvetten	Theodor Karow, Berlin
Lysing Matrix Tubes D	Qbiogene, Heidelberg
Multilochplatten	24-, 96-Loch-Zellkulturplatten CellBIND, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Objektträger	76x26 mm, Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten (Stripette 10 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Spritzenfilter	Rotilabo-Spritzenfilter 0,45 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	25 cm ² - oder 75 cm ² -Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

3.7.6 Geräte

Absauger	Vacuboy, neolab, Heidelberg
halbautomatisches Absaugesystem	Integra Biosciences
Absaugpumpe	N735 AN18, KNF Neuberger, Freiburg
Agarosegelelektrophoresekammer	B1A und GE-B2, AGS, Heidelberg
Analysenwaage	BP210S, Sartorius, Göttingen
Autoklav	GTA 16, Gössner, Hamburg

Elektroporationsgerät	Equibio EasyjecT Prima, peqLab, Erlangen
Epifluoreszenzmikroskop	Mikroskop LEICA CTR6000, DMI6000B, Leica Microsystems ltd. Heerbrugg
Fast Prep® Instrument	Qbiogene, Heidelberg
Fotodrucker Geldokumentation	P93E, Mitsubishi Electric, Ratingen
Geldokumentation	UV-Transilluminator UVT 28 MP, Kamera E.A.S.Y. 429 K, Dokumentationssystem RM6, Herolab, Wiesloch
Grobwaage	BL3100, Sartorius, Göttingen
Inkubationsschränke	CB150, Binder, Tuttlingen VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau
Luminometer Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
Magnetrührer	IKAMAG RET, Theodor Karow, Berlin
Netzgerät Elektrophorese	PS 250, Hybaid, Lexington, USA
pH-Meter	Mikroprozessor pH-Meter 740, Knick, Berlin
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Hirschmann, Eberstadt
Reinraumwerkbank	LaminAir HB 2448 und LB-48-C, Heraeus, Hanau
Reinstwassersystem	Millipore Simplicity, Millipore GmbH, Schwalbach
Scanner	DUOSCAN T1200, AGFA, Köln
Schüttelinkubator	GFL3031, GFL, Burgwedel
Spektrophotometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham, Freiburg
Thermoblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Umkehrmikroskop	Telaval 31, Zeiss, Jena
UV-C Lampe TUV30W/g30T8	Philips GmbH, Hamburg
Vortexer	MS2 Minishaker, IKA, Staufen
Wasserbäder	Grant OLS 200, CLF Laborgeräte, Burgwedel E-5, Julabo, Seelbach
Werkbank	LaminAir HB 2448 und LB-48-C, Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen 3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode 5415D, Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf Avanti J-25, Beckmann Coulter, Krefeld

3.8 Statistische Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Tests im Doppel-, Dreifach- oder Fünffachansatz durchgeführt. Die Ergebnisse resultieren aus dem Mittelwert dieser drei Tests. Die graphische Darstellung erfolgte durch SigmaPlot 2001 (SYSTAT-Software, Erkrath) und die statistische Auswertung durch SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, USA). Signifikanzen wurden bei Vorliegen einer Normalverteilung nach Kolgoroff-Smirnoff im Students-T-Test für eine oder zwei unabhängige Stichproben oder mittels ANOVA und MANOVA und dem Post-Hoc Test Tukey (HSD) bei gleicher Gruppengröße und dem Post-Hoc Test Scheffé bei ungleicher Gruppengröße überprüft. Das Vorliegen der Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Verfahren getestet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit p , welche unter dem Signifikanzniveau α von $\leq 5\%$ lag, wurde als signifikant bewertet. Hierbei galt: $\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,001$ (***). Die bivariate Korrelation zwischen den Ergebnissen der Infektionsstudie und der Chemolumineszenzversuche wurde nach Spearman-Rho auf zweiseitige Signifikanz berechnet. Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten (\bar{x}_r und $\bar{\rho}$) wurden über die Fisher z-Transformation errechnet (Silver und Dunlap, 2011).

4. Ergebnisse

Salmonella-Invasionsstudien wurden in den unterschiedlichsten Zellkulturmodellen durchgeführt. Eine experimentelle Aussage konnte hierbei nur für die im Versuch verwendeten Serovare in Korrelation zu meist einem einzigen Zellkulturmodell gegeben werden. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit vier verschiedene *Salmonella*-Serovare (wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert) mit jeweils zwei bereits etablierten Zellarten (Epithelzellen und Makrophagen) aus je drei verschiedenen Wirtssystemen (Schwein, Maus, Mensch) verglichen. Zunächst wurden hierfür die Wachstumsbedingungen der *Salmonella*-Spezies und deren Wachstumskurve bestimmt (Kap. 4.1). Anschließend wurden die Invasivität, das intrazelluläre Überleben der Erreger mittels Infektionstests (Kap. 4.2) und der Immunfluoreszenz dargestellt (Kap. 4.3). Um Rückschlüsse zwischen der Invasivität und der NF- κ B-Aktivierung ziehen zu können, wurde die Chemolumineszenz, basierend auf einer chemischen Transfektion, untersucht (Kap. 4.4 und 4.5) und mit den Ergebnissen der Invasionsstudien korreliert (Kap. 4.6).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die ermittelten porcinen NOD1- und NOD2-Sequenzen im Detail erläutert und eine abschließende vergleichende Sequenzanalyse durchgeführt (Kap. 4.7 und 4.8).

4.1 Ermittlung der *Salmonella*-Wachstumskurven

Für die in dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Spezies wurden Wachstumskurven in LB-Medium und Zellkulturmedien (DMEM/HAM'S) über photometrische Messungen bei der Wellenlänge $\lambda=600$ nm (OD_{600}) bis hin zur stationären Wachstumsphase ermittelt. Die Wachstumsphase unterteilt sich in die lag-Phase, in die Phase des beschleunigten Wachstums, in die log-Phase, in die Phase des limitierten Wachstums, in die stationäre Phase und die Absterbephase. Die Wachstumsphase ist ein bedeutender Faktor für die Invasivität der Salmonellen, da sie die Expression von Virulenzgenen beeinflusst (Adkins *et al.*, 2006; Guiney *et al.*, 1995). Aufgrund dessen wurde die Zeitspanne bis zum Erreichen der OD_{600} 2,2, also kurz vor der spätlogarithmischen Wachstumsphase, ermittelt.

Die OD_{600} 2,2 in LB-Medium wurden nach 210min *S. Enteritidis*, nach 260min *S. Dublin*, nach 280min *S. Typhimurium* und nach 290min *S. Choleraesuis* erreicht. Die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Dublin* zeigten eine geringere Verdopplungszeit und erreichten somit die OD_{600} 2,2 in einer kürzeren Zeitspanne. Für eine OD_{600} 2,2 mussten die Salmonellen ebtsprechend in 6 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von 210-290min angezogen werden. Für optimale und vergleichbare Bedingungen in den folgenden Infektionsversuchen mussten die Erreger gestaffelt, also je nach ihrer Generationszeit kultiviert werden, um zum Zeitpunkt der Infektion ähnliche Ausgangsbedingungen für jedes Serovar zu erhalten. Im Vergleich zum Wachstum im LB-Medium erreichten die Serovare im Zellkulturmedium deutlich später, erst nach ~400min, die OD_{600} 2,2. Die spätlogarithmische Wachstumsphase in Zellkulturmedium lag hier jedoch bei einer OD_{600} 1. Die OD_{600} 1 in Zellkulturmedium wurden nach 250min *S. Enteritidis*, nach 310min *S. Dublin*, nach 310min *S. Typhimurium* und nach 325min *S. Choleraesuis* erreicht. Somit war die Zeitspanne bis zum Erreichen der spätlogarithmischen Wachstumsphase unabhängig vom Wachstumsmedium und damit zwischen den Serovaren vergleichbar (Abb.

13). Die stationäre Wachstumsphase wurde in LB-Medium bei einer OD_{600} ca. 3,0-4,5 und im Zellkulturmedium bei einer OD_{600} ca. 2,0-3,5 erreicht. Darüber hinaus wurde die Gentamicin-Empfindlichkeit von den *Salmonella*-Serovaren getestet. Die in dieser Arbeit verwendeten Serovare waren Gentamicin-sensitiv für die Gentamicin-Konzentrationen von 10 und 50 ng/ml (Daten nicht gezeigt).

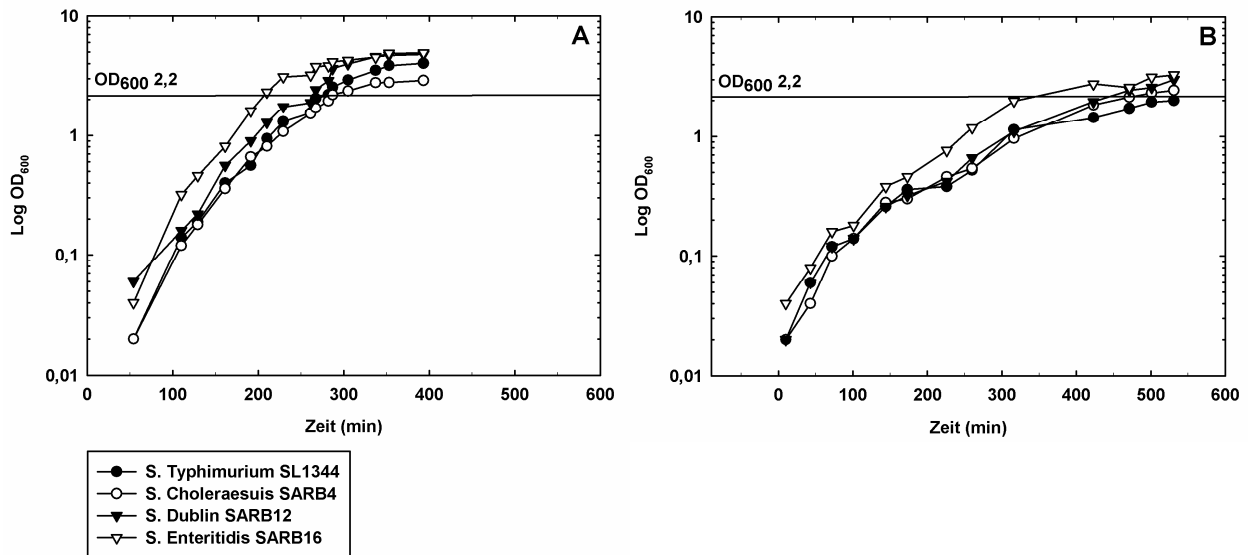


Abb. 13 Darstellung der ermittelten *Salmonella*-Wachstumskurven in LB-Medium (A, links) und Zellkulturmedium (B, rechts)

Gezeigt sind die Mittelwerte der Wachstumskurven in LB-Medium (A, links) und Zellkulturmedium DMEM/HAM'S (B, rechts) in der halblogarithmischen Darstellung. Die Serovare zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten. Für die optimale Nutzung der Salmonellen im Infektionsversuch wurden die Erreger bis kurz vor der spätlogarithmischen Phase in LB-Medium angezogen (OD_{600} 2,2).

4.2 *Salmonella*-Infektionsversuch

Für die Infektionsversuche wurden insgesamt sechs verschiedene permanente und bereits etablierte Zelllinien verwendet, jeweils eine epitheliale und eine makrophagenähnliche Zelllinie pro betrachteten Wirtsorganismus Schwein, Maus und Mensch. Die Zellkulturen wurden mit den vier *Salmonella*-Serovaren im modifizierten *Gentamicin Protection Assay* bei einer MOI von eins untersucht (Giannella *et al.*, 1973; Mandell, 1973; Vaudaux und Waldvogel, 1979). Die Ergebnisse hierfür wurden sortiert nach den Wirtsorganismen dargestellt.

4.2.1 KbE in porcinen Zellen

In dieser Arbeit wurden die porcinen adhärennten Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 für die *Salmonella*-Invasionsstudien verwendet. Hierbei wurde die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in Koloniebildenden Einheiten (KbE) auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) pro betrachtetes Serovar ermittelt.

In IPEC-J2-Zellen wurden 2h *post infectionem* (*p. i.*) folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Typhimurium* $11,50 \pm 0,99 \times 10^4$ KbE, *S. Enteritidis* $6,31 \pm 0,44 \times 10^4$ KbE gefolgt von *S. Dublin* $1,65 \pm 0,07 \times 10^4$ KbE und *S. Choleraesuis* $1,51 \pm 0,11 \times 10^4$ KbE.

Nach 4h *p. i.* wurden in den epithelialen IPEC-J2-Zellen $27,05 \pm 1,62 \times 10^4$ KbE *S. Typhimurium*, $15,74 \pm 1,18 \times 10^4$ KbE *S. Enteritidis* gefolgt von $3,92 \pm 0,19 \times 10^4$ KbE *S. Dublin* und $2,14 \pm 0,10 \times 10^4$ KbE *S. Choleraesuis* gezählt. Hierbei zeigten die porcinen intestinalen Zellen eine erhöhte Invasivität für die Zoonoseerreger *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* nach 2h *p. i.*. Die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* wies eine vergleichbar geringere Invasivität auf. Nach 24h *p. i.* wurden in den epithelialen IPEC-J2-Zellen $22,88 \pm 1,75 \times 10^5$ KbE *S. Typhimurium*, $45,40 \pm 3,46 \times 10^5$ KbE *S. Enteritidis* gefolgt von $4,06 \pm 0,30 \times 10^5$ KbE *S. Choleraesuis* und $2,94 \pm 0,15 \times 10^5$ KbE *S. Dublin* gezählt (Abb. 14). Im Verlaufe der Infektion waren es ebenfalls die nicht-wirtsadaptierten Erreger *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, welche die höchsten intrazellulären Vermehrungsraten aufwiesen. Entgegen den Erwartungen war jedoch das Verhalten vom schweineadaptierten *S. Choleraesuis*, welche weder eine hohe initiale Invasivität noch eine hohe intrazelluläre Vermehrung 24h *p. i.* in porcinen IPEC-J2 zeigte. Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für jedes Serovar in IPEC-J2 statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet) (Abb. 14).

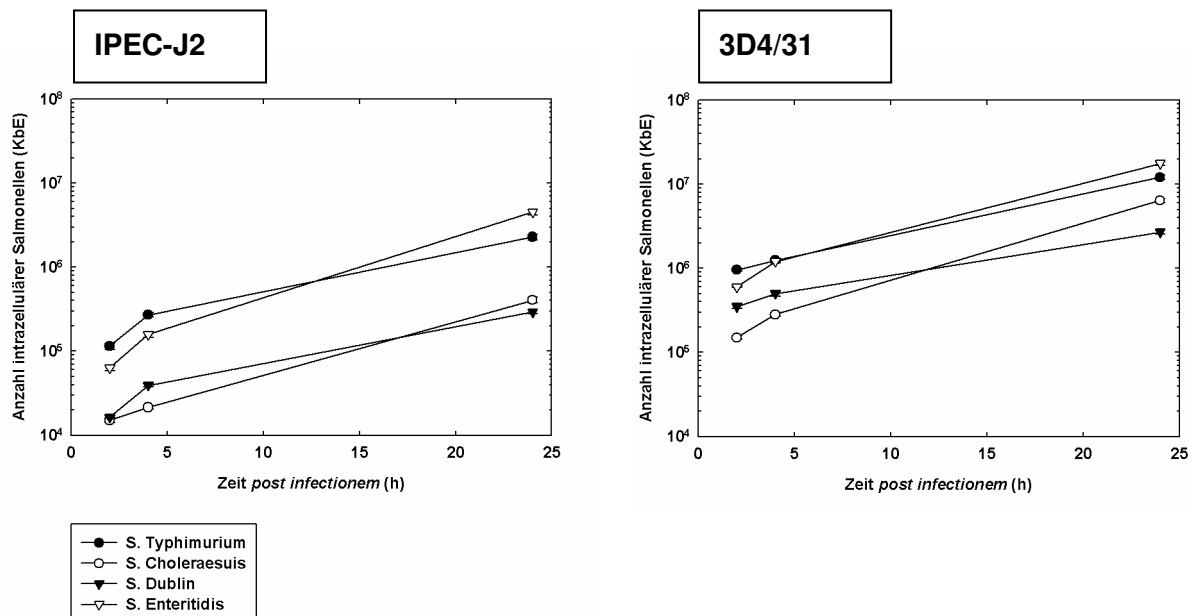


Abb. 14 Infektionsversuch bei porcinen epithelialen Zellen (IPEC-J2, links) und bei porcinen makrophagenähnlichen Zellen (3D4/31, rechts)

Dargestellt sind in der linken halblogarithmischen Teilabbildung die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in KbE auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) für IPEC-J2 und in der rechten halblogarithmischen Teilabbildung für 3D4/31. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die Invasionsraten über 2h, 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (ANOVA mit Messwertwiederholung, $\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet).

In 3D4/31-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Typhimurium* $9,50 \pm 0,31 \times 10^5$ KbE, *S. Enteritidis* $5,99 \pm 0,10 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Dublin* $3,51 \pm 0,21 \times 10^5$ KbE und *S. Choleraesuis* $1,50 \pm 0,07 \times 10^5$ KbE. Die porcinen makrophagenähnlichen Zellen 3D4/31 wiesen eine erhöhte initiale Invasivität für die Serovare *S. Typhimurium*, gefolgt von *S. Enteritidis* und *S. Dublin* auf. Nach 4h *p. i.* wurden in den 3D4/31-Zellen $12,37 \pm 0,40 \times 10^5$ KbE *S. Typhimurium*, $12,03 \pm 0,38 \times 10^5$ KbE *S. Enteritidis* gefolgt von $5,01 \pm 0,39 \times 10^5$ KbE *S. Dublin* und $2,82 \pm 0,14 \times 10^5$ KbE

S. Choleraesuis gezählt. Nach 24h *p. i.* wurden in den 3D4/31-Zellen folgende KbE-Werte ermittelt: $12,09 \pm 0,81 \times 10^6$ KbE *S. Typhimurium*, $17,63 \pm 0,86 \times 10^6$ KbE *S. Enteritidis* gefolgt von $6,40 \pm 0,33 \times 10^6$ KbE *S. Choleraesuis* und $2,69 \pm 0,14 \times 10^6$ KbE *S. Dublin* (Abb. 14). Auch hier war es die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis*, die zwar eine vergleichbar geringere Invasivität aufwies, die sich jedoch im Gegensatz zu IPEC-J2-Zellen im Zeitverlauf bis 24h *p. i.* besser in den Makrophagen vermehren konnte. Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für jedes Serovar in 3D4/31 statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01$ (**), nicht eingezeichnet) (Abb. 14).

4.2.2 KbE in murinen Zellen

Als Zellkulturmodell murinen Ursprunges wurden die Zellkultursysteme MODE-K und RAW264.7 verwendet. Hierbei wurde die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in KbE auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) ermittelt.

In MODE-K-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Choleraesuis* $8,65 \pm 0,78 \times 10^5$ KbE, *S. Dublin* $6,73 \pm 0,23 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $4,65 \pm 0,21 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $1,53 \pm 0,10 \times 10^5$ KbE. In den intestinalen epithelialen Zellen MODE-K waren 2h *p. i.* vermehrt *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* nachweisbar. Nach 4h *p. i.* wurden in MODE-K folgende KbE-Werte ermittelt: *S. Choleraesuis* $2,24 \pm 0,27 \times 10^6$ KbE, *S. Dublin* $1,40 \pm 0,03 \times 10^6$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $1,08 \pm 0,03 \times 10^6$ KbE und *S. Enteritidis* $0,25 \pm 0,01 \times 10^6$ KbE. Nach 24h *p. i.* wurden in MODE-K $4,08 \pm 0,41 \times 10^7$ KbE *S. Typhimurium*, $2,22 \pm 0,21 \times 10^7$ KbE *S. Choleraesuis*, $1,90 \pm 0,06 \times 10^7$ KbE *S. Dublin* gefolgt von $1,67 \pm 0,08 \times 10^7$ KbE *S. Enteritidis* ermittelt (Abb. 15). Aufgrund des starken intrazellulären Wachstums konnte das vermehrte Vorkommen vom mäusepathogenen Serovar *S. Typhimurium* nach 24h *p. i.* beobachtet werden. Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für jedes Serovar in MODE-K statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01$ (**), nicht eingezeichnet) (Abb. 15).

In RAW264.7-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Choleraesuis* $6,59 \pm 1,07 \times 10^5$ KbE, *S. Dublin* $6,62 \pm 0,49 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $4,83 \pm 0,30 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $3,48 \pm 0,28 \times 10^5$ KbE. Die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 zeigte initial (2h *p. i.*) eine erhöhte Invasivität für die Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*. Nach 4h *p. i.* wurden in RAW264.7 folgende KbE-Werte ermittelt: *S. Choleraesuis* $11,56 \pm 1,25 \times 10^5$ KbE, *S. Dublin* $11,14 \pm 0,71 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $6,13 \pm 0,35 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $5,23 \pm 0,30 \times 10^5$ KbE. Nach 24h *p. i.* wurden in RAW264.7 $20,83 \pm 2,21 \times 10^6$ KbE *S. Dublin*, $11,15 \pm 1,77 \times 10^6$ KbE *S. Choleraesuis* gefolgt von $5,88 \pm 0,26 \times 10^6$ KbE *S. Enteritidis* und $3,98 \pm 0,33 \times 10^6$ KbE *S. Typhimurium* gezählt (Abb. 15). Im Verlauf zum 24h *p. i.* Wert war es die *S. Dublin* Serovar, welche eine starke intrazelluläre Vermehrung zeigte. Die mäuseadaptierte *S. Typhimurium* Serovar, welche klinisch gesehen typhusähnliche Symptome bei der Maus hervorrufen kann, war in den RAW264.7-Zellen weder verstärkt invasiv noch zeigte sie eine deutliche intrazelluläre Vermehrung bis zum Zeitpunkt 24h *p. i.*. Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für jedes Serovar in RAW264.7 statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01$ (**), nicht eingezeichnet) (Abb. 15).

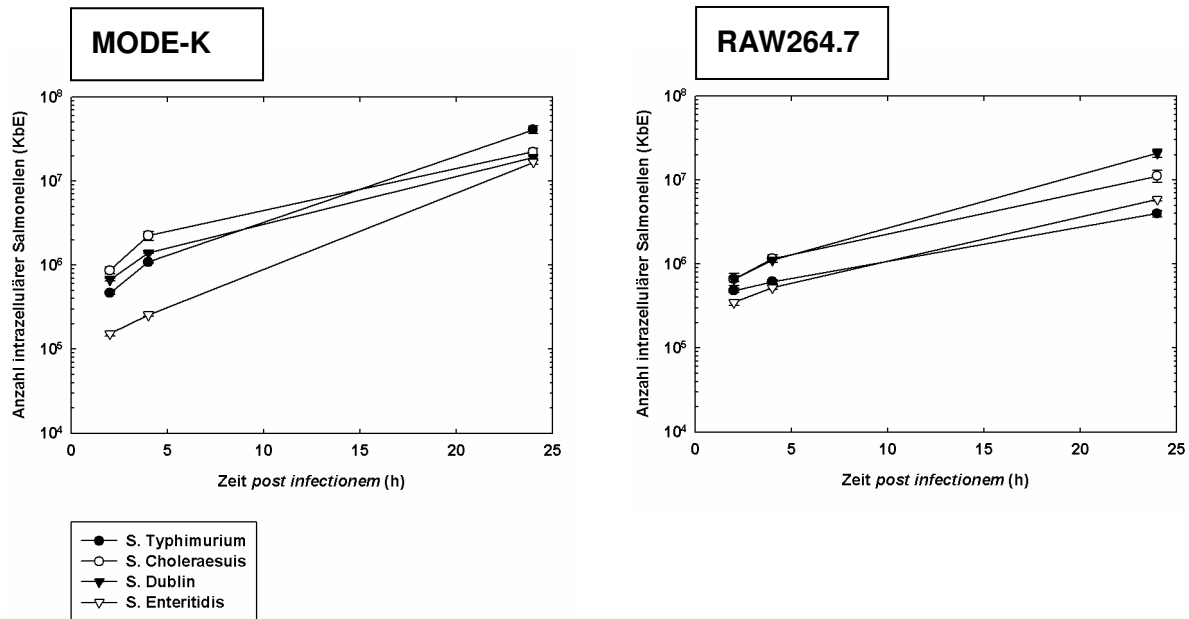


Abb. 15 Infektionsversuch bei murinen epithelialen Zellen (MODE-K, links) und murinen makrophagenähnlichen Zellen (RAW264.7, rechts)

Dargestellt sind in der halblogarithmischen Teilabbildung links die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in KbE auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) für MODE-K und rechts für RAW264.7. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die Invasionsraten über 2h, 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (ANOVA mit Messwertwiederholung, $\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet).

4.2.3 KbE in humanen Zellen

Für die Invasionstudien wurden die humanen Zelllinien LoVo und THP-1 verwendet. Hierbei wurde die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in Koloniebildenden Einheiten (KbE) auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) ermittelt.

In LoVo-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Typhimurium* $8,49 \pm 1,10 \times 10^5$ KbE, *S. Dublin* $6,08 \pm 0,68 \times 10^5$ KbE und *S. Choleraesuis* $5,37 \pm 0,25 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Enteritidis* $4,98 \pm 0,57 \times 10^5$ KbE. Die intestinalen epithelialen Zellen LoVo waren zum Zeitpunkt 2h *p. i.* vor allem intrazellulär besiedelt mit *S. Typhimurium* und *S. Dublin*, gefolgt von *S. Choleraesuis*. Nach 4h *p. i.* wurden in LoVo folgende KbE-Werte ermittelt: *S. Typhimurium* $11,36 \pm 1,59 \times 10^5$ KbE, *S. Dublin* $8,60 \pm 1,06 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Choleraesuis* $7,29 \pm 0,30 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $6,88 \pm 0,78 \times 10^5$ KbE. Nach 24h *p. i.* wurden in LoVo $6,82 \pm 0,79 \times 10^7$ KbE *S. Typhimurium*, $6,38 \pm 0,79 \times 10^7$ KbE *S. Enteritidis*, $2,53 \pm 0,34 \times 10^7$ KbE *S. Dublin* gefolgt von $0,50 \pm 0,02 \times 10^7$ KbE *S. Choleraesuis* gezählt (Abb. 16). Nach 24h *p. i.* waren vor allem die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* mit der stärksten intrazellulären Vermehrung in LoVo nachweisbar. Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für jedes Serovar in LoVo statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet) (Abb. 16).

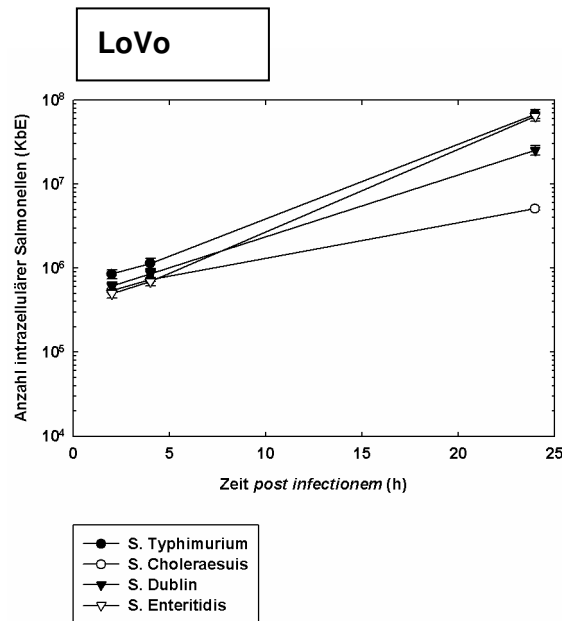


Abb. 16 Infektionsversuch bei humanen epithelialen Zellen (LoVo)

Halblogarithmisch dargestellt ist die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in KbE auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) für LoVo-Zellen. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die Invasionsraten über 2h, 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (ANOVA mit Messwert-wiederholung, $\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet).

Die makrophagenähnlichen THP-1-Zellen wurden im Infektionstest sowohl als Suspension (THP-1s) als auch im adhärenenten Zustand durch Aktivierung der Zellen mit PMA untersucht (THP-1a). In THP-1s-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Dublin* $1,46 \pm 0,11 \times 10^5$ KbE, *S. Choleraesuis* $1,30 \pm 0,20 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $1,09 \pm 0,15 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $0,97 \pm 0,22 \times 10^5$ KbE. Die Suspensionszellkultur der THP-1s zeigte eine verstärkte Invasion 2h *p. i.* für die Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*. Nach 4h *p. i.* wurden in THP-1s folgende KbE-Werte ermittelt: *S. Dublin* $3,03 \pm 0,34 \times 10^5$ KbE, *S. Choleraesuis* $2,39 \pm 0,41 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $1,72 \pm 0,20 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $1,26 \pm 0,24 \times 10^5$ KbE. Nach 24h *p. i.* wurden in THP-1s $27,85 \pm 3,95 \times 10^5$ KbE *S. Dublin*, $20,11 \pm 3,16 \times 10^5$ KbE *S. Choleraesuis* gefolgt von $10,29 \pm 1,58 \times 10^5$ KbE *S. Enteritidis* und $6,51 \pm 1,04 \times 10^5$ KbE *S. Typhimurium* gezählt (Abb. 17). Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für die Serovare *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* in THP-1s statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet) (Abb. 17).

In THP-1a-Zellen wurden 2h *p. i.* folgende Anzahlen an intrazellulären Salmonellen kultiviert: *S. Dublin* $7,82 \pm 0,84 \times 10^5$ KbE, *S. Choleraesuis* $6,43 \pm 0,47 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $2,86 \pm 0,16 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $2,47 \pm 0,23 \times 10^5$ KbE. Die Suspensionszellkultur der THP-1a zeigte eine verstärkte Invasion 2h *p. i.* für die Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*. Nach 4h *p. i.* wurden in THP-1a folgende KbE-Werte ermittelt: *S. Dublin* $11,57 \pm 0,62 \times 10^5$ KbE, *S. Choleraesuis* $8,50 \pm 0,61 \times 10^5$ KbE gefolgt von *S. Typhimurium* $5,21 \pm 0,74 \times 10^5$ KbE und *S. Enteritidis* $3,34 \pm 0,18 \times 10^5$ KbE. Nach 24h *p. i.* wurden in THP-1a $8,19 \pm 0,15 \times 10^6$ KbE *S. Choleraesuis*, $4,49 \pm 0,48 \times 10^6$ KbE *S. Dublin* gefolgt von $4,35 \pm 0,28 \times 10^6$ KbE *S. Enteritidis* und $4,10 \pm 0,53 \times 10^6$ KbE *S. Typhimurium* gezählt (Abb. 17). Die intrazelluläre Zunahme eines betrachteten *Salmonella*-Serovars im Verlauf der Zeit von 2, 4 und 24h *p. i.* war für alle Serovare in THP-1a statistisch hoch signifikant unterschiedlich ($\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet) (Abb. 17).

Im Vergleich zu den Suspensionszellen sind die Invasionsraten der aktivierten, adhärennten THP-1 jedoch deutlich höher. Da sich die relativen Verhältnisse zwischen der Suspensionszellkultur THP-1s und den adhärennten THP-1a nur geringfügig unterschieden, wurden in den folgenden Abbildungen nur die Ergebnisse mit den aktivierten, adhärennten THP-1a dargestellt. Die Ergebnisse für die Suspensionszellkultur THP-1s wurden im Anhang abgebildet (Abb. 45-49).

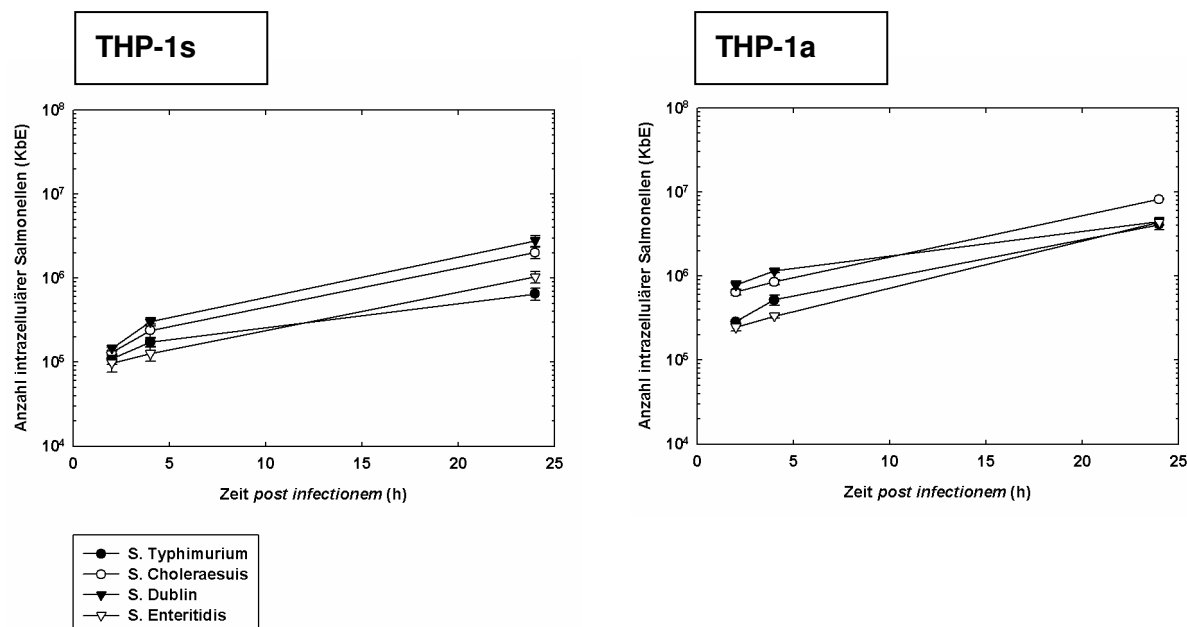


Abb. 17 Infektionsversuch bei humanen makrophagenähnlichen Zellen (THP-1) in Suspension (links, THP-1s) und adhärennt (rechts, THP-1a)

Dargestellt sind in der linken halblogarithmischen Teilabbildung die Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen in KbE auf der Zeitachse als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) für THP-1s und in der rechten halblogarithmischen Teilabbildung für THP-1a. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die Invasionsraten für THP-1a über 2h, 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (ANOVA mit Messwertwiederholung, $\alpha \leq 0,01(**)$, nicht eingezeichnet).

4.2.4 Berechnung der Steigung m aus den KbE-Kurven

Aufgrund der in Kapitel 4.2.1–4.2.3 aufgeführten Gesamtanzahl der intrazellulären Salmonellen als KbE in der halblogarithmischen Darstellung wurde die Steigung m wie folgt berechnet:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

Die Steigung m gab in diesem Fall die intrazelluläre Vermehrungsraten der Salmonellen zwischen den Zeitpunkten 2h *p. i.* und 24h *p. i.* an. Innerhalb zweier Zellarten (Epithel und Makrophagen) eines Wirtmodells (Schwein, Maus und Mensch) wurden die Serovare mit Hilfe der MANOVA und dem Post Hoc Scheffé auf statistische Signifikanz überprüft.

Hierbei zeigte *S. Typhimurium* folgende m -Werte: 1646,21±126,84 in IPEC-J2, 8438,25±606,61 in 3D4/31, 30579,54±3137,38 in MODE-K, 2651,01±237,48 in RAW264.7, 51093,68±5944,81 in LoVo und 2893,49±402,99 in THP-1a. *S. Typhimurium* wies die höchsten intrazellulären Vermehrungsraten in epithelialen MODE-K und epithelialen LoVo-

Zellen auf. Statistisch signifikant war der Epithel-Makrophagen-Unterschied im murinen und humanen System. *S. Choleraesuis* zeigte folgende m -Werte: IPEC-J2 $296,38 \pm 23,10$, 3D4/31 $4734,59 \pm 251,42$, MODE-K $16230,68 \pm 1554,62$, RAW264.7 $7940,65 \pm 1271,84$, LoVo $3448,86 \pm 184,83$ und THP-1a $5721,90 \pm 111,00$. *S. Choleraesuis* war in der Lage sich besonders schnell in murinen MODE-K- und RAW264.7-Zellen zu vermehren. Im porcinen und murinen System zeigte sich ein statistisch signifikanter Epithel-Makrophagen-Unterschied. Der Infektionsversuch mit *S. Dublin* erbrachte folgende m -Werte: IPEC-J2, $1774,49 \pm 101,73$ 3D4/31, $13931,43 \pm 519,05$ MODE-K, $15282,07 \pm 1660,04$ RAW264.7, $18765,65 \pm 2596,92$ LoVo und $2815,34 \pm 304,17$ THP-1a. *S. Dublin* wies die höchsten intrazellulären Vermehrungsraten in epithelialen MODE-K-, epithelialen LoVo-Zellen und in RAW264.7-Zellen auf. *S. Dublin* zeigte im humanen System einen statistisch signifikanten Epithel-Makrophagen-Unterschied. *S. Enteritidis* zeigte folgende m -Werte: IPEC-J2, $3610,09 \pm 275,94$ IPEC-J2, $12906,06 \pm 660,88$ 3D4/31, $12578,40 \pm 640,98$ MODE-K, $4195,32 \pm 195,91$ RAW264.7, $47994,57 \pm 6007,91$ LoVo, $3109,84 \pm 230,60$ THP-1a. *S. Enteritidis* konnte sich besonders schnell in LoVo, MODE-K und den porcinen 3D4/31 vermehren. *S. Enteritidis* zeigte im humanen System einen statistisch signifikanten Epithel-Makrophagen-Unterschied. Vor allem die Zoonoseerreger *S. Typhimurium* und auch *S. Enteritidis* waren in der Lage, sich intrazellulär in den sechs Zellkulturen schnell zu vermehren (Abb. 18).

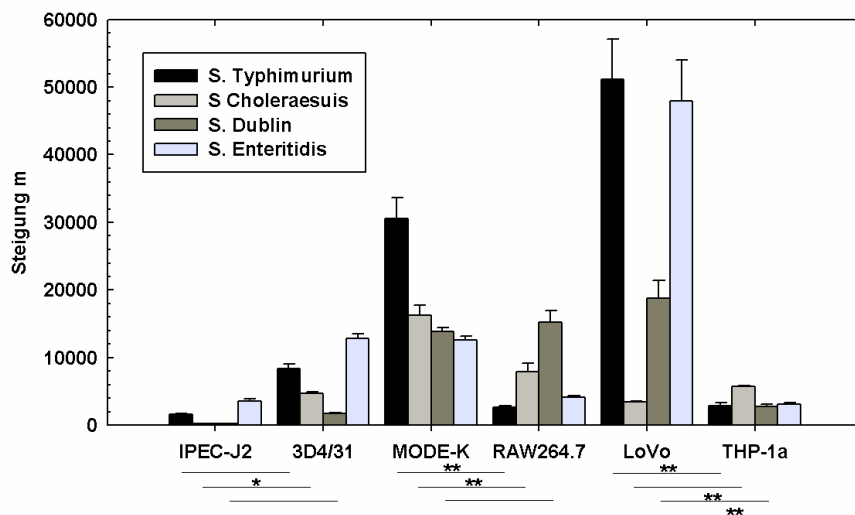


Abb. 18 Darstellung der Steigung m als Messwert für die intrazelluläre Vermehrungsrate von Salmonellen

Gezeigt ist die Steigung m berechnet anhand der intrazellulären Vermehrungszahlen in KbE zwischen den Zeitpunkten 2h *p. i.* als $\bar{x} + \sigma_n$. Zwischen den zwei Zellarten (Epithel und Makrophagen) innerhalb eines Wirtmodells wurden die Serovare mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé). Die Ergebnisse hierzu wurden für die vier Serovare (vier Balken) unter der Abbildung für die drei Wirtsmodele (Schwein, Maus und Mensch) und mit $\alpha \leq 0,01(**)$ und $\alpha \leq 0,05(*)$ dargestellt.

Darüber hinaus erfolgte im Anhang die Darstellung der Steigung m als Messwert für die intrazelluläre Vermehrungsrate zwischen den Zeitpunkten 2h *p. i.* und 24h *p. i.* für THP-1-Zellen in Suspension (THP-1s) (Abb. 45). Es ergab sich keine Änderung der bereits in Abb. 18 dargestellten statistischen Signifikanzen.

Des Weiteren wurde die Steigung m ebenfalls zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h *p. i.* berechnet und im Anhang abgebildet (Abb. 46). Hierbei ergaben sich keine Unterschiede in den bereits in Abb. 18 dargestellten statistischen Signifikanzen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass THP-1-Zellen deutliche Unterschiede bei der intrazellulären Vermehrungsrate in Bezug auf ihre Vorbehandlung aufwiesen. Salmonellen in PMA-aktivierten THP-1a-Zellen demonstrierten eine höhere intrazelluläre Vermehrungsrate im Vergleich zu unstimulierten THP-1s. Darüber hinaus waren es die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, welche deutliche Unterschiede zwischen den unstimulierten THP-1s im Vergleich zu den stimulierten THP-1a-Zellen in der Steigung m zeigten (Tab. 12).

Tab. 12 Vergleich der Steigung m bei THP-1s und THP-1a

	THP-1s	THP-1a	Differenz (THP-1a - THP-1s)	-fache Steigerung (THP-1a gegenüber THP-1s)
<i>S. Typhimurium</i>	410,88±69,22	2893,49±402,99	2482,61	7,04
<i>S. Choleraesuis</i>	1438,58±235,72	5721,90±111,00	4283,32	3,98
<i>S. Dublin</i>	1999,34±292,83	2815,34±304,17	816,00	1,41
<i>S. Enteritidis</i>	564,08±104,03	3109,84±230,60	2545,76	5,51

4.2.5 Berechnung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 2h *p. i.*

In dieser Arbeit wurden sechs Zelllinien für die *Salmonella*-Invasionsstudien verwendet. Hierbei wurden die relativen Infektionsraten (Anzahl der rekultivierbaren Salmonellen / Anzahl der Infektionsmenge) pro betrachtetes Serovar ermittelt. Zuerst wurde die relative Anzahl intrazellulärer Salmonellen zum ersten ermittelten Zeitpunkt 2h *p. i.* gegeneinander aufgetragen. So konnten die initialen relativen Infektionsraten als Ausdruck der Invasivität der einzelnen Salmonellen beurteilt und miteinander verglichen werden.

S. Typhimurium zeigte folgende initialen Invasionsraten: 91,15±5,37 % IPEC-J2, 70,86±1,16 % 3D4/31, 41,63±2,10 % MODE-K, 28,68±0,72 % RAW264.7, 122,09±4,61 % LoVo und 32,72±1,56 % THP-1a. Die Serovar *S. Typhimurium* war statistisch signifikant invasiver in den betrachteten epithelialen Zellen im Vergleich zu den makrophagenähnlichen Zellen des porcinen und humanen Wirtsmodells. *S. Choleraesuis* zeigte folgende initiale Invasionsraten: 10,84±0,85 % IPEC-J2, 11,19±0,45 % 3D4/31, 64,40±2,25 % MODE-K, 35,36±1,85 % RAW264.7, 38,40±0,69 % LoVo und 76,84±6,38 % THP-1a. Die Serovar *S. Choleraesuis* war statistisch signifikant invasiver in den murinen epithelialen Zellen im Vergleich zu den murinen makrophagenähnlichen Zellen, jedoch statistisch signifikant invasiver in den humanen makrophagenähnlichen Zellen im Vergleich zu den humanen epithelialen Zellen. *S. Dublin* zeigte folgende initiale Invasionsraten: 15,81±0,75 % IPEC-J2, 39,97±2,14 % 3D4/31, 74,86±3,45 % MODE-K, 70,25±2,89 % RAW264.7, 124,11±8,08 % LoVo und 138,18±11,67 THP-1a. Die Serovar *S. Dublin* war statistisch signifikant invasiver in den porcinen makrophagenähnlichen Zellen im Vergleich zu den porcinen epithelialen Zellen. *S. Enteritidis* zeigte folgende initiale Invasionsraten: 46,11±1,79 % IPEC-J2, 44,96±0,78 % 3D4/31, 13,98±0,99 % MODE-K, 26,55±1,55 % RAW264.7, 83,02±5,21 %

4. Ergebnisse

LoVo und 29,14±2,35 THP-1a. Die Serovar *S. Enteritidis* war statistisch signifikant invasiver in den humanen epithelialen Zellen im Vergleich zu den humanen makrophagenähnlichen Zellen (Abb. 19). Die höchsten initialen Invasionswerte *in vitro* zeigten in dieser Arbeit die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Dublin*. Die Zoonoseerreger *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* wurden gehäuft in Zellen porcinen Ursprungs sowie in den humanen epithelialen Zellen rekultiviert.

Die mäusepathogene Serovar *S. Typhimurium* war nicht vermehrt invasiv in Zellen murinen Ursprungs. Entgegen den Erwartungen war auch die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* nicht verstärkt in porcinen Epithelzellen und Makrophagen nachweisbar. Die Serovar *S. Choleraesuis* zeigte jedoch *in vitro* eine scheinbar höhere Invasivität für murine und humane Zellen. Nach Berechnung des Mittelwertes der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen aus den epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen zum Zeitpunkt 2h *p. i.* für die drei verwendeten Tierarten war es möglich, die drei Tiermodelle aufgrund Ihrer ermittelten Invasivitäten statistisch miteinander zu vergleichen. So zeigte sich, dass die mäusepathogene *S. Typhimurium* Serovar in Zellen murinen Ursprungs signifikant weniger invasiv war. Auch der schweinepathogene Erreger *S. Choleraesuis* war signifikant geringer invasiv in porcinen Zellen. *S. Dublin* und auch *S. Enteritidis* unterschieden sich signifikant in allen drei Tiermodellen (Abb. 19).

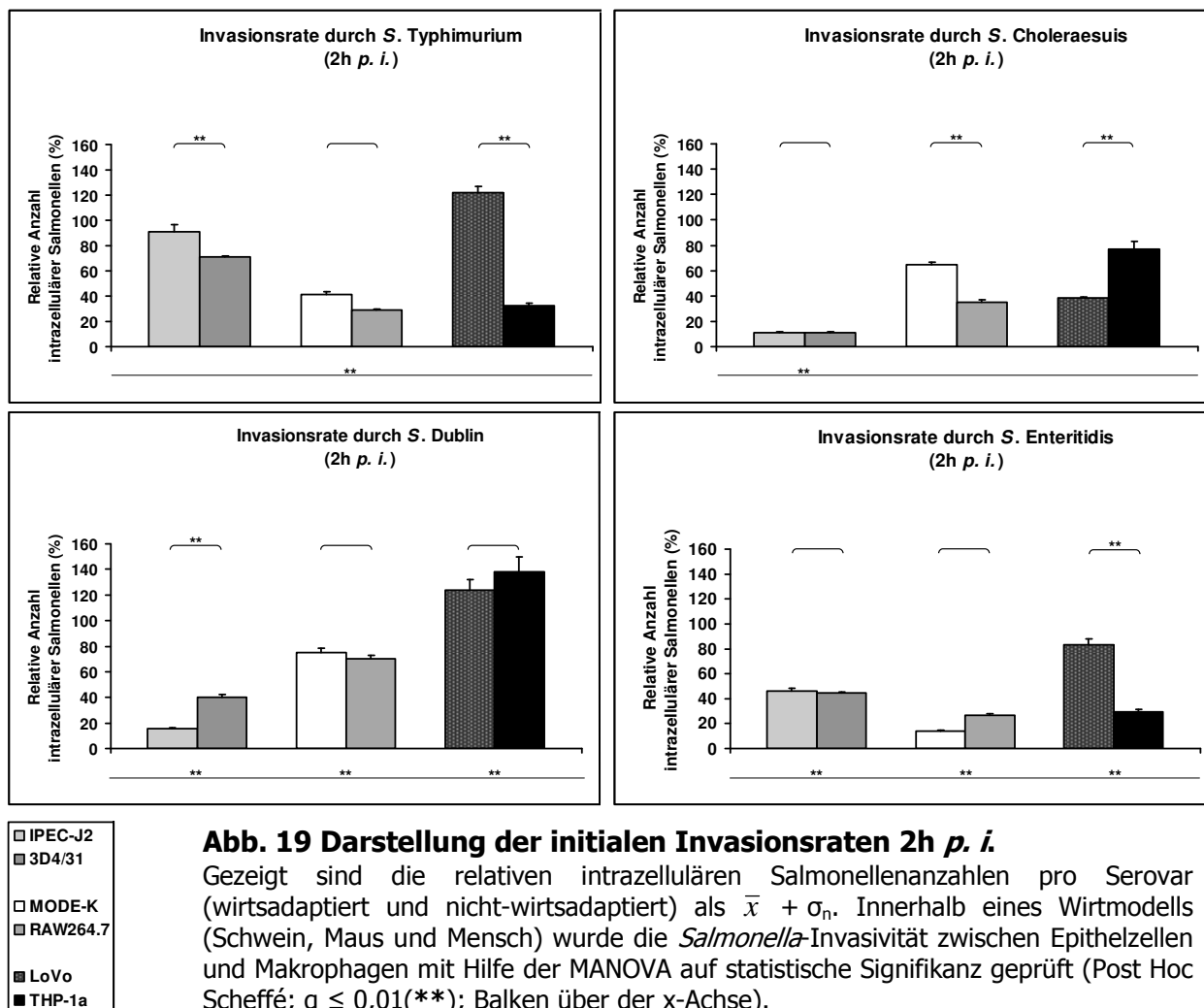


Abb. 19 Darstellung der initialen Invasionsraten 2h *p. i.*

Gezeigt sind die relativen intrazellulären Salmonellenanzahlen pro Serovar (wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert) als $\bar{x} + \sigma_n$. Innerhalb eines Wirtmodells (Schwein, Maus und Mensch) wurde die *Salmonella*-Invasivität zwischen Epithelzellen und Makrophagen mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé; $\alpha \leq 0,01(**)$; Balken über der x-Achse).

Darüber hinaus wurden die drei Wirtmodelle untereinander mittels T-Test auf ungepaarte Stichproben verglichen ($\alpha \leq 0,01(**)$; Balken unter der x-Achse).

Die graphische Darstellung der initialen Invasionsraten zum Zeitpunkt 2h *p. i.* für die THP-1s-Zellen befindet sich im Anhang (Abb. 47). Die Salmonellen zeigten in THP-1s folgende initialen Invasionsraten: 20,10±1,42 % *S. Typhimurium*, 26,72±1,03 % *S. Choleraesuis*, 39,16±1,59 % *S. Dublin* und 14,72±1,96 % *S. Enteritidis* (Tab. 13). Somit wurde gezeigt, dass THP-1-Zellen deutliche Unterschiede bei den initialen Invasionswerten in Bezug auf ihre Vorbehandlung aufweisen. So waren PMA-aktivierte, adhärente THP-1-Zellen sensibler für eine Salmonelleninfektion. Darüber hinaus waren es die Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*, welche deutlich weniger invasiv sind in den unstimulierten THP-1s im Vergleich zu den stimulierten THP-1a.

Tab. 13 Vergleich der initialen Invasionsraten bei THP-1s und THP-1a

	THP-1s	THP-1a	Differenz (THP-1a - THP-1s)	-fache Steigerung (THP-1a gegenüber THP-1s)
<i>S. Typhimurium</i>	20,10±1,42 %	32,72±1,56 %	12,62	1,63
<i>S. Choleraesuis</i>	26,72±1,03 %	76,84±6,38 %	50,12	2,88
<i>S. Dublin</i>	39,16±1,59 %	138,18±11,67 %	99,02	3,53
<i>S. Enteritidis</i>	14,72±1,96 %	29,14±2,35 %	14,42	1,98

4.2.6 Berechnung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 4h *p. i.* und 24h *p. i.*

In dieser Arbeit wurden sechs Zelllinien für die *Salmonella*-Invasionsstudien verwendet. Hierbei wurden die relativen Infektionsraten (Anzahl der rekultivierbaren Salmonellen / Anzahl der Infektionsmenge) zu den Zeitpunkten 4h *p. i.* und 24h *p. i.* für die in dieser Arbeit verwendeten vier Serovare ermittelt. So konnten die relativen Infektionsraten als Ausdruck der intrazellulären Vermehrung der einzelnen Serovare beurteilt und miteinander verglichen werden. Hierbei erfolgte die Darstellung der relativen Infektionsraten pro betrachtetes Serovar aufgeführt als $\bar{x} + \sigma_n$. Die relativen Infektionsraten über 4h und 24h *p. i.* wurden auf statistische Signifikanz mittels der MANOVA untersucht.

S. Typhimurium zeigte folgende relative Infektionsraten 4h *p. i.*: 222,01±9,66 % IPEC-J2, 92,33±1,49 % 3D4/31, 97,20±3,28 % MODE-K, 37,01±1,35 % RAW264.7, 157,91±5,03 % LoVo und 58,50±7,58 % THP-1a. *S. Typhimurium* wies die höchsten relativen Infektionsraten in porcinen Zellen (IPEC-J2 und 3D4/31) auf. *S. Choleraesuis* zeigte folgende relative Infektionsraten 4h *p. i.*: 15,40±0,90 % IPEC-J2, 20,97±0,85 % 3D4/31, 143,37±5,02 % MODE-K, 69,51±3,26 % RAW264.7, 52,38±1,01 % LoVo und 101,47±8,26 % THP-1a. *S. Choleraesuis* besaß die höchsten relativen Infektionsraten in murinen Zellen (MODE-K, RAW264.7) und in THP-1a. *S. Dublin* zeigte folgende relative Infektionsraten 4h *p. i.*: 36,38±1,07 % IPEC-J2, 55,15±2,49 % 3D4/31, 155,48±5,50 % MODE-K, 118,82±5,05 % RAW264.7, 162,85±8,79 % LoVo und 207,97±7,16 % THP-1a. Die höchsten relativen Infektionsraten für *S. Dublin* lagen bei den murinen und humanen Zellen, hier vor allem THP-1a. *S. Enteritidis* zeigte folgende relative Infektionsraten 4h *p. i.*: 112,91±4,82 % IPEC-J2, 90,43±2,99 % 3D4/31, 23,52±0,69 % MODE-K, 41,30±2,35 % RAW264.7, 116,46±7,11 % LoVo und 39,73±1,80 % THP-1a. *S. Enteritidis* wies die höchsten relativen Infektionsraten in porcinen und humanen Epithelzellen sowie in 3D4/31 auf (Abb. 20). Die vergleichbare Darstellung für 4h *p. i.* mit THP-1s-Zellen befindet sich im Anhang (Abb. 48).

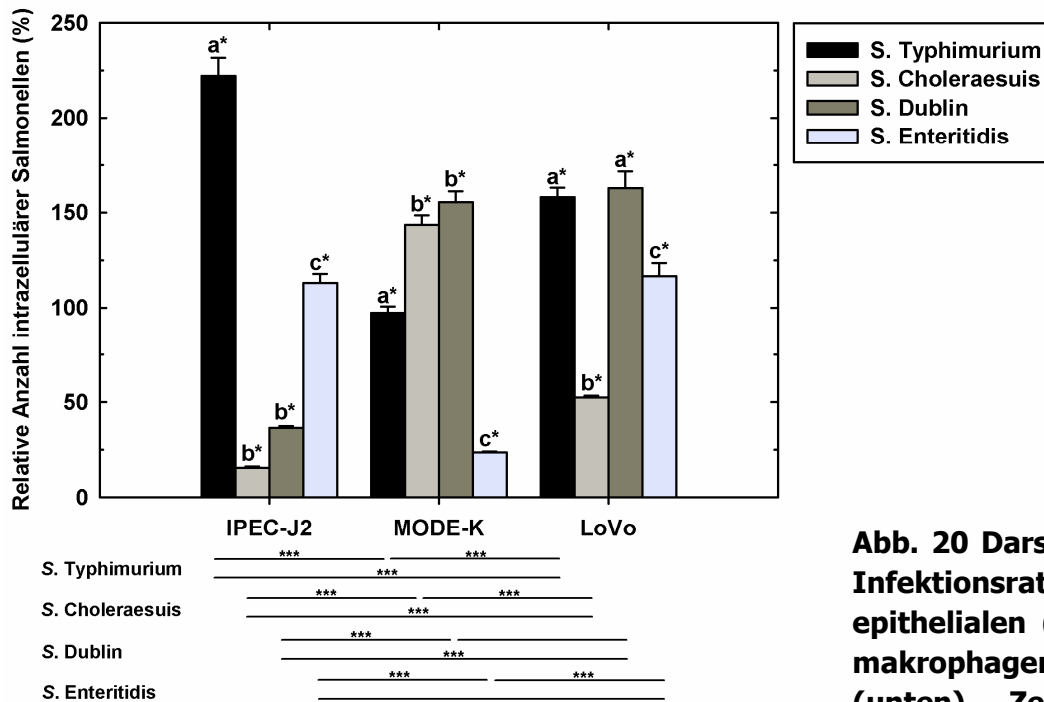
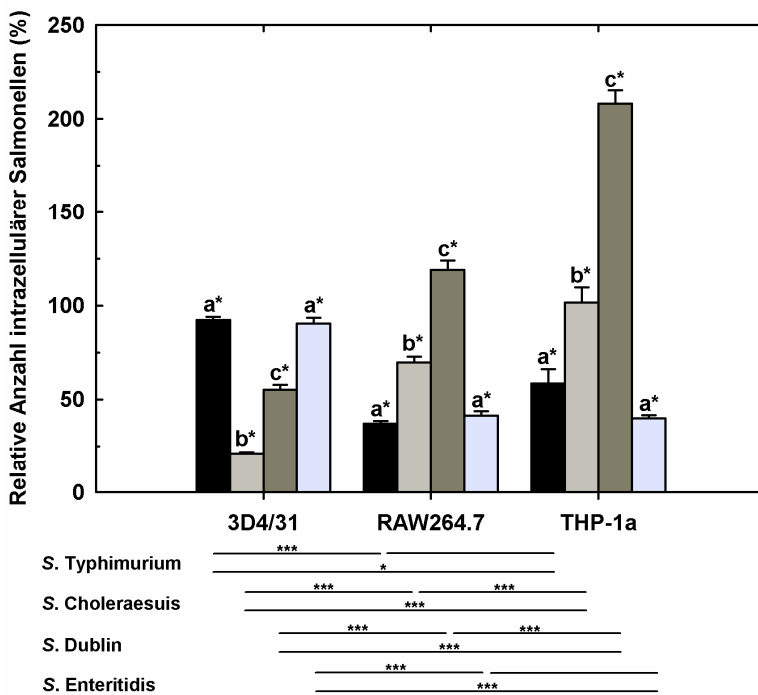


Abb. 20 Darstellung der Infektionsraten in epithelialen (oben) und makrophagenähnlichen (unten) Zellen nach 4h p. i.

Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 3 makrophagenähnliche Zellen) wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare, dargestellt als $\bar{x} + \sigma_n$, mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-c*)) Hierbei bedeuten gleiche Buchstaben (a-c) keine Signifikanz.

Unterhalb der Abbildungen wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare zwischen den drei Wirtsmodellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,001$ (***)).



S. Typhimurium zeigte folgende relative Infektionsraten 24h p. i.: 1816,63±66,87 % IPEC-J2, 885,46±41,09 % 3D4/31, 2736,79±162,98 % MODE-K, 229,63±11,94 % RAW264.7, 11570,69±538,26 % LoVo und 463,90±54,16 % THP-1a. S. Typhimurium wurde vor allem in humanen LoVo-Zellen ermittelt. S. Choleraesuis zeigte folgende relative Infektionsraten 24h p. i.: 282,07±14,79 % IPEC-J2, 472,46±17,86 % 3D4/31, 1514,11±44,21 % MODE-K, 611,35±28,27 % RAW264.7, 363,60±12,07 % LoVo und 971,71±23,17 % THP-1a. Die Serovar S. Choleraesuis konnte vermehrt in den epithelialen MODE-K detektiert werden. S. Dublin zeigte folgende relative Infektionsraten 24h p. i.: 280,66±15,62 % IPEC-J2, 305,60±9,54 % 3D4/31, 2086,17±66,05 % MODE-K, 2049,85±86,45 % RAW264.7, 4766,67±180,81 % LoVo und 794,12±66,31 % THP-1a. S. Dublin besaß hierbei die höchste

relative Infektionsrate humanen LoVo- und in murinen RAW264.7-Zellen. *S. Enteritidis* zeigte folgende relative Infektionsraten 24h *p. i.*: 3441,43±126,89 % IPEC-J2, 1329,94±69,97 % 3D4/31, 1541,20±71,71 % MODE-K, 473,61±27,43 % RAW264.7, 9169,45±278,81 % LoVo und 528,31±42,63 % THP-1a. Die höchsten relativen Infektionsraten für *S. Enteritidis* lagen bei den epithelialen LoVo- und IPEC-J2-Zellen (Abb. 21). Die vergleichbare Darstellung für 24h *p. i.* mit THP-1s-Zellen befindet sich im Anhang (Abb. 49).

Hierbei wurde ersichtlich, dass in den porcinen Zellen sowohl bei 2h, 4h als auch bei 24h *p. i.* *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* gehäuft nachweisbar waren. In den murinen Zellen waren es vor allem die Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*.

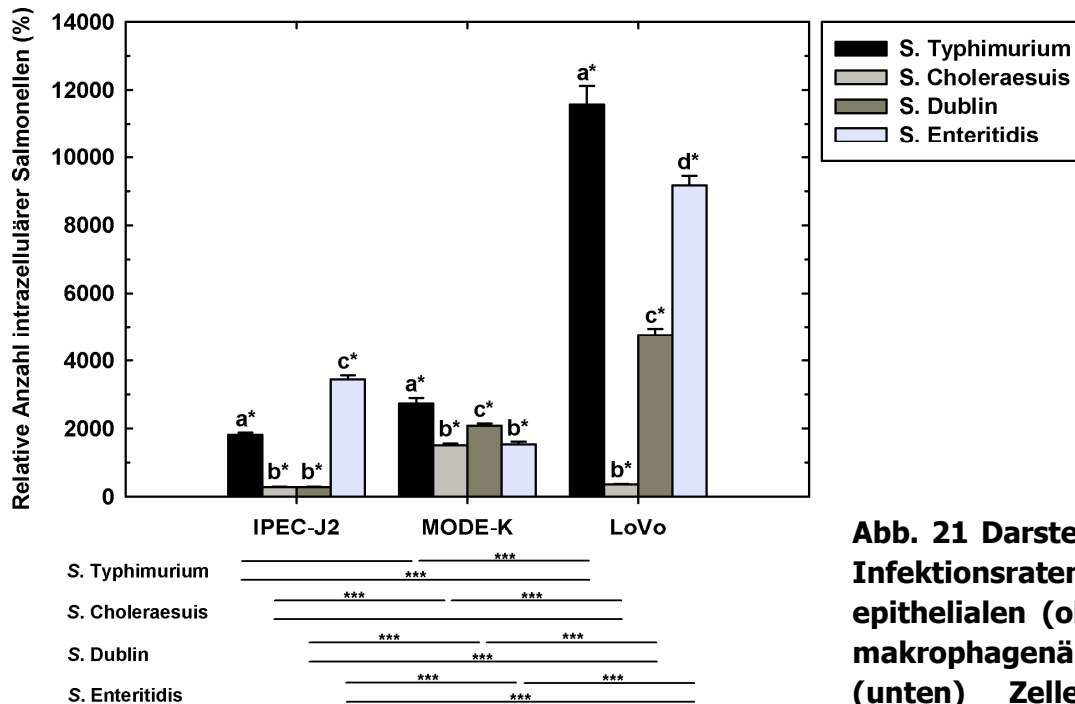
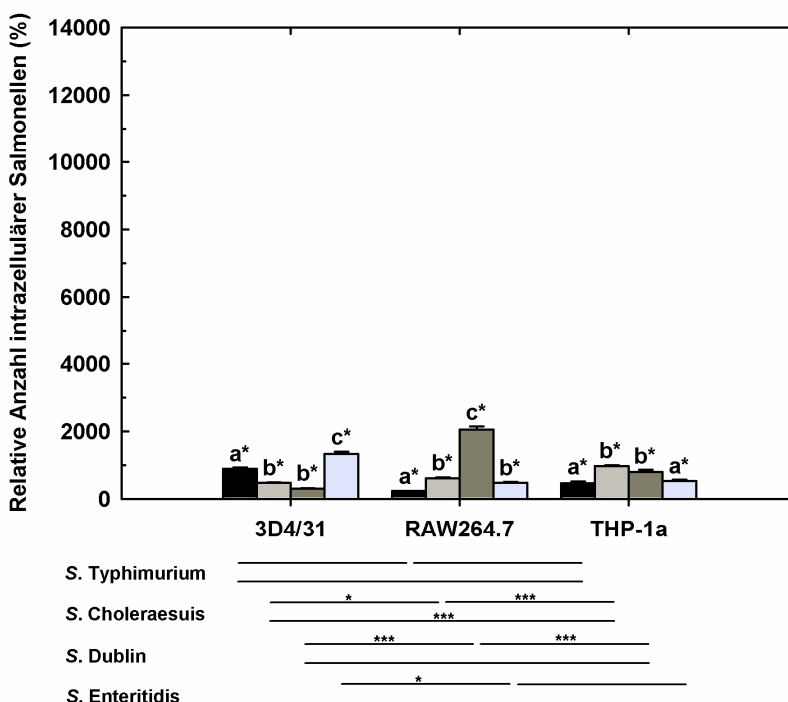


Abb. 21 Darstellung der Infektionsraten in epithelialen (oben) und makrophagenähnlichen (unten) Zellen nach 24h *p. i.*

Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 3 makrophagenähnliche Zellen) wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare, dargestellt als $\bar{x} + \sigma_n$, mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-d*)) Hierbei bedeuten gleiche Buchstaben (a-d) keine Signifikanz.

Unterhalb der Abbildungen wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare zwischen den drei Wirtsmodellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,001$ (***)).



4.2.7 Vergleich der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen in epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen

In dieser Arbeit wurden drei epitheliale und drei makrophagenähnliche Zelllinien für die *Salmonella*-Infektionsstudien verwendet. Aus allen Rohdaten der relativen Infektionsraten ((Anzahl der rekultivierbaren Salmonellen)/(Anzahl der Infektionsmenge)) für die vier *Salmonella*-Serovare nach 2h *p. i.* und nach 24h *p. i.* erfolgte eine Berechnung der Quartile pro Zellart (Epithel und Makrophagen). So konnten die relativen Infektionsraten für die beiden verwendeten Zellarten beurteilt und miteinander im Boxplot-Diagramm verglichen werden.

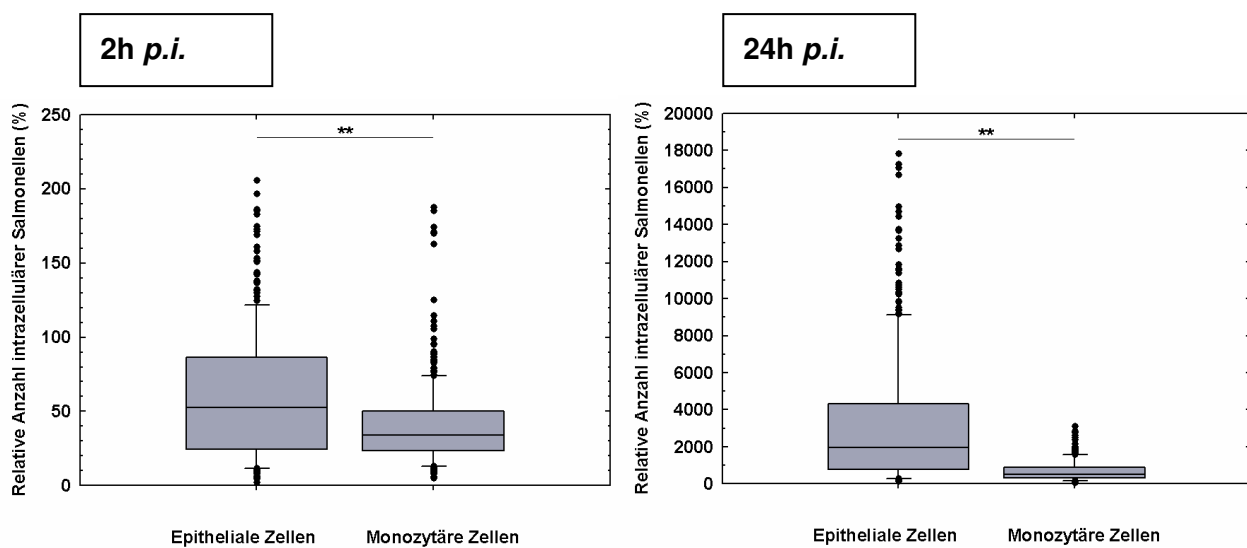


Abb. 22 Darstellung der Infektionsraten nach Zellart (Epithel und Makrophagen) 2h *p. i.* (links) und 24h *p. i.* (rechts)

Dargestellt sind die relativen Infektionswerte aller epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen für alle verwendeten Serovare als Median (\tilde{x}), Quartil $Q_{.25}$ und $Q_{.75}$, Dezil $Q_{.10}$ und $Q_{.90}$ sowie den Minimum-, Maximumwerten. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für ungepaarten Stichproben getestet ($\alpha \leq 0,01(**)$).

Nach 2h *p. i.* wurden folgende Quartile (in %) ermittelt: Median (\tilde{x}) 52,67 für epitheliale Zellen und 33,79 für makrophagenähnliche Zellen, Quartil $Q_{.25}$ 24,55 für epitheliale Zellen und $Q_{.25}$ 23,73 für makrophagenähnliche Zellen, Quartil $Q_{.75}$ 86,24 für epitheliale Zellen und $Q_{.75}$ 50,21 für makrophagenähnliche Zellen.

Nach 24h *p. i.* wurde folgende Quartile (in %) berechnet: Median (\tilde{x}) 1938,87 für epitheliale Zellen und 498,37 für makrophagenähnliche Zellen, Quartil $Q_{.25}$ 892,26 für epitheliale Zellen und $Q_{.25}$ 303,85 für makrophagenähnliche Zellen, Quartil $Q_{.75}$ 4319,24 für epitheliale Zellen und $Q_{.75}$ 880,37 für makrophagenähnliche Zellen.

Hierbei zeigte sich, dass die epithelialen Zellen im Gegensatz zu den makrophagenähnlichen Zellen eine statistisch signifikant höhere intrazelluläre Salmonelleninvasionsrate 2h *p. i.* und auch eine höhere relative Anzahl intrazellulärer Salmonellen 24h *p. i.* aufweisen (Abb. 22).

Die Berechnung der Quartile mit den Werten von THP-1s (unstimuliert, Suspension) im Vergleich zu THP-1a (aktiviert, Adhärenz) ergab keine Veränderung der bereits in Abb. 22 gezeigten statistischen Signifikanzen (nicht dargestellt).

Dieser Epithel-Makrophagen-Unterschied aus Abb. 22 wurde darüber hinaus auch für die einzelnen vier Serovare zu den Zeitpunkten 2, 4 und 24h *p. i.* auf statistische Signifikanz mittels T-Test für ungepaarte Stichproben geprüft. Hierbei zeigte sich, dass für die Zeitpunkte 4 und 24h *p. i.* auch alle vier Serovare einen statistisch signifikanten Epithel-Makrophagen-Unterschied aufwiesen. Nach 2h *p. i.* war dieser Epithel-Makrophagen-Unterschied der Infektionsraten nur signifikant für die Serovare *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* und *S. Enteritidis*. (Tab. 14).

Tab. 14 Darstellung der Epithel-Makrophagen-Unterschiede für alle vier Serovare

Gezeigt sind die *p*-Werte des T-Test's (2-seitige Signifikanz) nach Berechnung des Epithel-Makrophagen-Unterschiedes der relativen Werte der Infektionsversuche. Hierbei wurden die Werte der Epithelien und der Makrophagen gemittelt.

Zeitpunkt <i>p. i.</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Enteritidis</i>
2h	$p \leq 0,001$ (***)	$p = 0,046$ (*)	$p = 0,151$	$p \leq 0,001$ (***)
4h	$p \leq 0,001$ (***)	$p = 0,040$ (*)	$p = 0,038$ (*)	$p \leq 0,001$ (***)
24h	$p \leq 0,001$ (***)	$p = 0,010$ (**)	$p \leq 0,001$ (***)	$p \leq 0,001$ (***)

4.3 Mikroskopische Auswertung der GFP-Salmonelleninfektion

Für die mikroskopische Darstellung der Salmonelleninfektionen in den sechs verschiedenen Zellkulturen wurden GFP-markierte Salmonellen verwendet. Hierbei kam die Serovar *S. Typhimurium* SL1344 als Zoonosevertreter sowie *S. Choleraesuis* als Vertreter eines wirtsadaptierten Serovars zum Einsatz. Die Infektionsversuche wurden zu den Zeitpunkten 4h und 24h *p. i.* ausgewertet, indem die Anzahl der infizierten Zellen pro Gesamtzellzahl berechnet, die Anzahl der intrazellulären Salmonellen pro infizierter Zelle gezählt und die Gesamtzellzahl ermittelt wurde. Gezeigt sind hier die mikroskopischen Ergebnisse zum Zeitpunkt 24h *p. i.*, da hier dargestellt werden konnte, dass die Erreger *S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis* intrazellulär ein verschiedenartiges morphologisches Wachstumsbild besaßen. *S. Typhimurium* zeigte hierbei ein Wachstum entlang linienförmiger Strukturen. Dies war besonders deutlich in epithelialen IPEC-J2 und MODE-K zu sehen. Intrazelluläre *S. Choleraesuis* wurden hingegen in vereinzelt vorkommenden, oval- bis kugelförmigen Strukturen wiedergefunden (Abb. 23, 24).

Die Zellmonolayer waren zum Zeitpunkt der Infektion konfluent, aufgrund der Prozessierung für die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung gab es jedoch Zellverluste. Eine Untersuchung der Suspensionszellkultur THP-1s war aufgrund der Methodik nicht möglich.

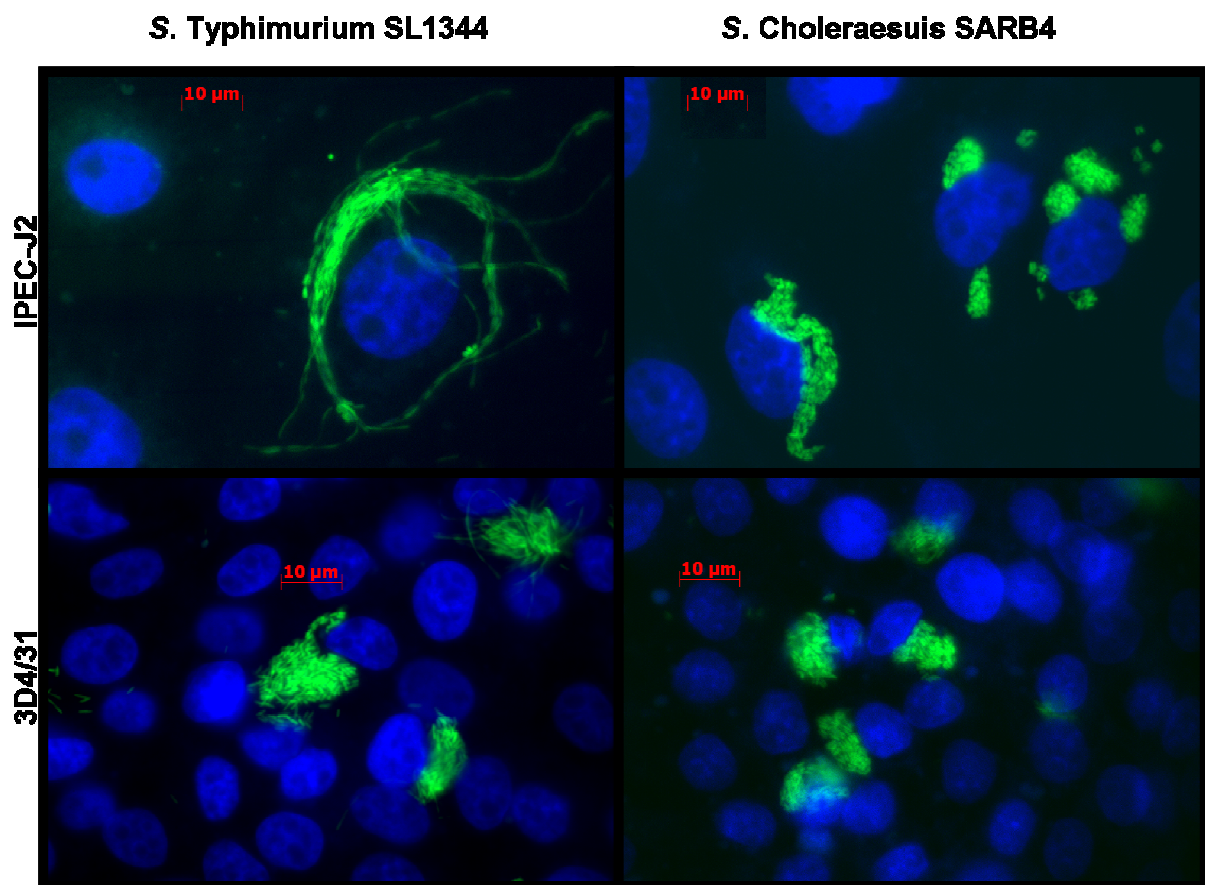


Abb. 23 . Darstellung der Salmonelleninfektion in porcinen Zellen nach 24h *p. i.*

Die Zellen porcinen IPEC-J2 (obere Reihe) und die porcinen 3D4/31 (untere Reihe) wurden mit GFP-markierten *S. Typhimurium* SL1344 (links) und *S. Choleraesuis* SARB4 (rechts) infiziert. Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. (Balken = 10 µm)

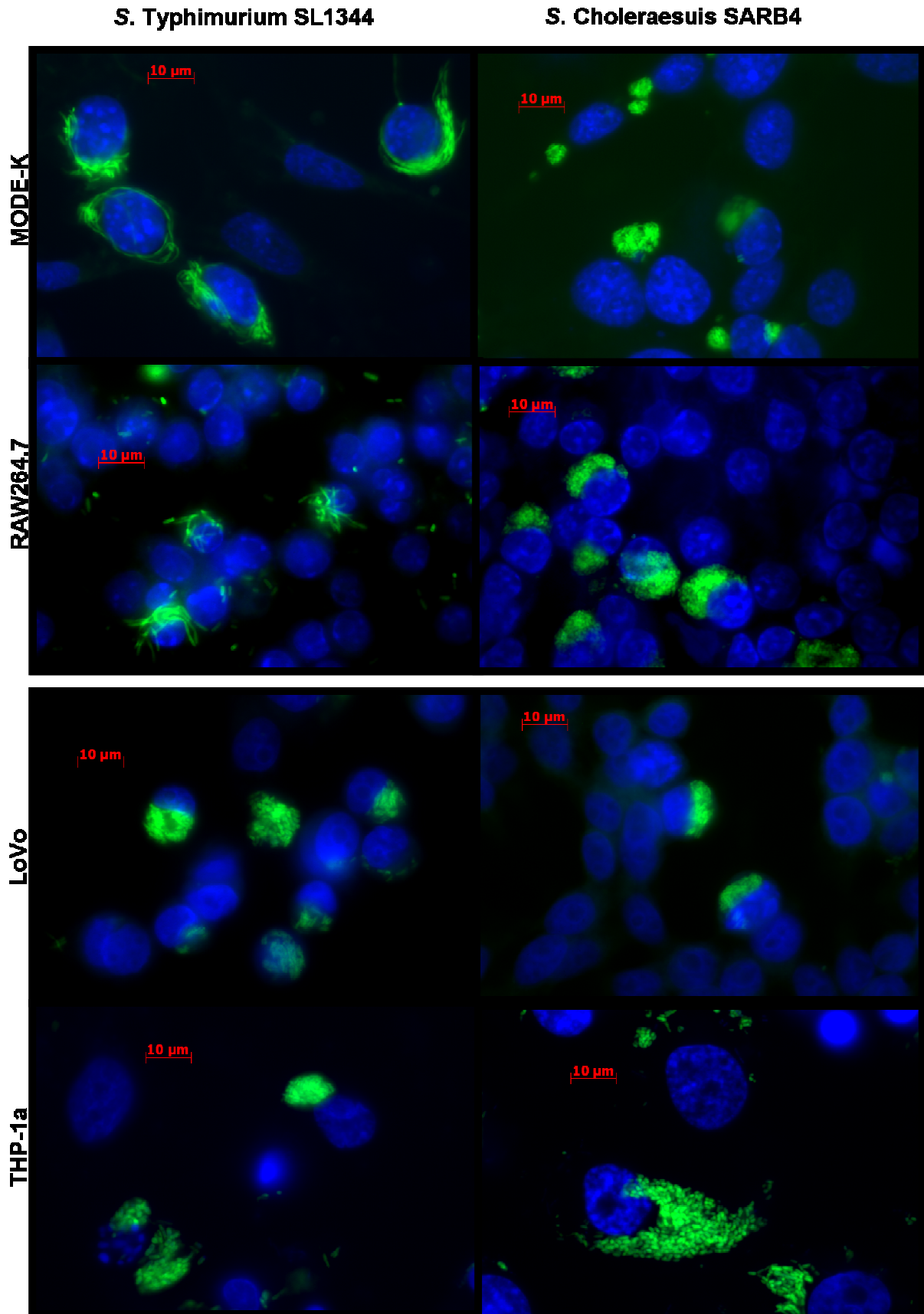


Abb. 24 Darstellung der Salmonelleninfektion in murinen (oben) und humanen Zellen (unten) nach 24h *p. i.*

Die murinen Zellen (1. und 2. Reihe, oben) und humanen Zellen (3. und 4. Reihe, unten) wurden mit GFP-markierten *S. Typhimurium* SL1344 (links) und *S. Choleraesuis* SARB4 (rechts) infiziert. Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. (Balken = 10 µm)

4.3.1 Berechnung der Anzahl intrazellulärer GFP-Salmonellen pro Einzelzelle

Die mikroskopische Auswertung der Gesamtanzahl aller intrazellulärer GFP-markierten Salmonellen pro Einzelzelle gab sowohl Rückschlüsse über die Invasivität als auch über deren intrazelluläre Vermehrungsaktivität, da es sich um 4h und 24h *p. i.* Werte handelte. Hierbei erfolgte die Darstellung der Anzahl der Salmonellen pro Einzelzelle aufgeführt als $\bar{x} + \sigma_n$ für 4h und 24h *p. i.*. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für ungepaarte Stichproben geprüft.

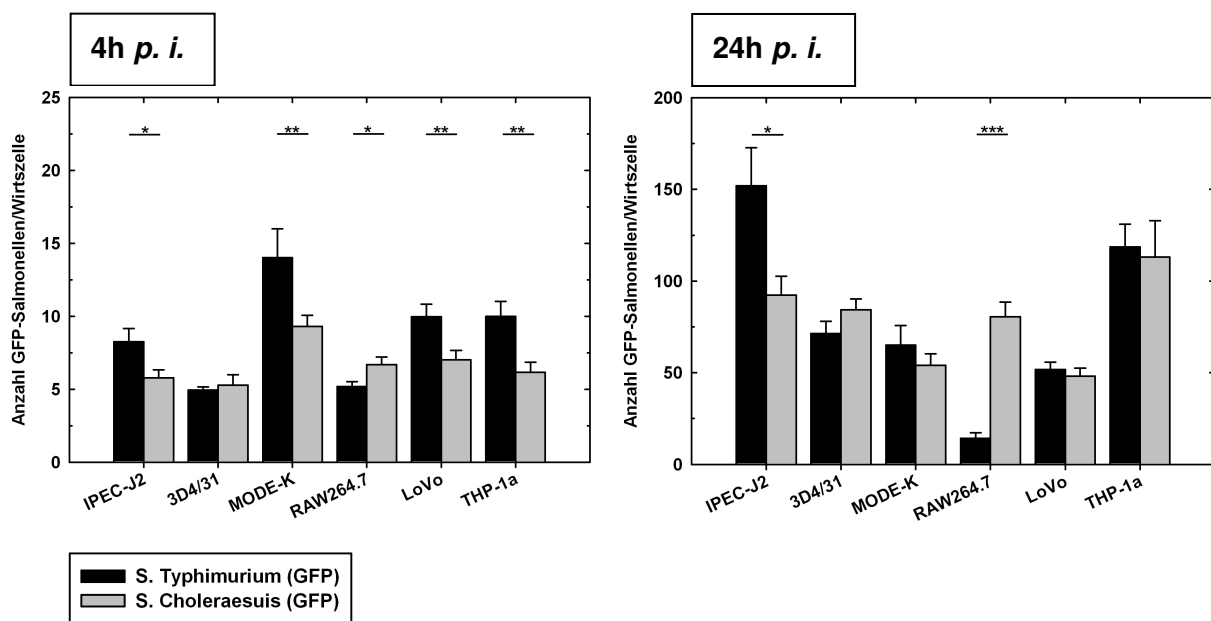


Abb. 25 Anzahl intrazellulärer GFP-markierten Salmonellen pro Einzelzelle 4h (links) und 24h *p. i.* (rechts)

Die Zellen wurden mit GFP-markierten *S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis* infiziert. Gezeigt ist die Anzahl ausgezählter intrazellulärer Salmonellen pro Einzelzelle als $\bar{x} + \sigma_n$ nach 4h *p. i.* (links) und 24h *p. i.* (rechts). Innerhalb einer Zellart wurde mittels T-Test für ungepaarte Stichproben die statistische Signifikanz zwischen den Serovaren geprüft ($\alpha \leq 0,001$ (***), $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,05$ (*)).

S. Typhimurium wurde in folgender Anzahl pro Einzelzelle 4h *p. i.* nachgewiesen: 8,26±0,90 in IPEC-J2, 4,94±0,22 in 3D4/31, 14,02±1,98 in MODE-K, 5,18±0,34 in RAW264.7, 9,96±0,86 in LoVo und 10,00±1,02 in THP-1a. Die Anzahl der intrazellulären Salmonellen pro Einzelzelle bei 4h *p. i.* zeigte, dass *S. Typhimurium* in porcinen und murinen Zellen epithelialen Ursprungs in größerer Anzahl intrazellulär vorkam als in porcinen und murinen makrophagenähnlichen Zellen. Dieser Epithel-Makrophagen-Unterschied konnte für die humanen Epithelzellen und aktivierten Makrophagen nicht nachgewiesen werden.

S. Choleraesuis wurde in folgender Anzahl pro Einzelzelle 4h *p. i.* nachgewiesen: 5,79±0,53 in IPEC-J2, 5,28±0,72 in 3D4/31, 9,30±0,76 in MODE-K, 6,69±0,52 in RAW264.7, 7,01±0,66 in LoVo und 6,16±0,70 in THP-1a. *S. Choleraesuis* war im Vergleich zu *S. Typhimurium* nach 4h *p. i.* bei vier von sechs Zellkultursystemen in geringerer Anzahl pro infizierter Einzelzelle nachweisbar (Abb. 25).

Nach 24h *p. i.* wurden *S. Typhimurium* Erreger in folgender Anzahl pro Einzelzelle nachgewiesen: 152,00±20,63 in IPEC-J2, 71,43±6,66 in 3D4/31, 65,13±10,54 in MODE-K, 14,25±3,06 in RAW264.7, 51,81±3,87 in LoVo und 118,63±12,32 in THP-1a.

S. Choleraesuis wurde in folgender Anzahl pro Einzelzelle 24h *p. i.* nachgewiesen: 92,26±10,30 in IPEC-J2, 71, 84,33±5,94 in 3D4/31, 54,04±6,27 in MODE-K, 80,54±8,00 in RAW264.7, 48,12±4,33 in LoVo und 113,11±19,88 in THP-1a. Nach 24h *p. i.* wiesen IPEC-J2-Zellen eine hohe Anzahl intrazellulärer *S. Typhimurium* auf. Die RAW264.7-Zellen beinhalteten jedoch vermehrt intrazelluläre *S. Choleraesuis* (Abb. 25).

Es wurde beobachtet, dass 24h *p. i.* die ermittelte Anzahl intrazellulärer Salmonellen pro Einzelzelle großen Schwankungen unterlag. Diese Ausreißerwerte wurden wie folgt definiert: Es waren Merkmalswerte, die mehr als das 1,5-fache des Interquartilabstandes, jedoch weniger als das 3-fache des Interquartilabstandes unter bzw. oberhalb des Quartils (Q_{75} und Q_{25}) lagen. Die Ausreißerwerte führten folglich zu einem fälschlicherweise geringeren Mittelwert. Ausreißerwerte wurden bei folgenden Infektionskombinationen festgestellt: (1) Infektion von *S. Typhimurium* (GFP) in IPEC-J2 und RAW264.7 sowie (2) Infektion mit *S. Choleraesuis* (GFP) in IPEC-J2, 3D4/31, MODE-K und THP-1a.

4.3.2 Darstellung der relativen Anzahl intrazellulärer GFP-Salmonellen

Darüber hinaus wurde die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl (mikroskopisches Sichtfeld 1000fach ($10345 \pm 10 \mu\text{m}^2$), Ölimmersion) durch die mikroskopische Auswertung für die Zeitpunkte 4h und 24h *p. i.* berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für gepaarte Stichproben geprüft.

S. Typhimurium zeigte nach 4h *p. i.* folgende relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl: 61,25±3,48 % in IPEC-J2, 43,60±2,58 % in 3D4/31, 47,83±2,39 % in MODE-K, 48,47±3,13 % in RAW264.7, 44,89±4,41 % in LoVo und 81,64±3,83 % in THP-1a. Nach 24h *p. i.* wurden folgende relative Anzahlen infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl für *S. Typhimurium* ermittelt: 60,14±4,72 % in IPEC-J2, 56,20±3,78 % in 3D4/31, 46,56±2,84 % in MODE-K, 84,90±2,78 % in RAW264.7, 49,45±3,46 % in LoVo und 85,00±6,67 % in THP-1a (Abb. 26).

S. Choleraesuis zeigte nach 4h *p. i.* folgende relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl: 42,37±2,74 % in IPEC-J2, 47,74±2,64 % in 3D4/31, 59,47±2,94 % in MODE-K, 60,89±3,87 % in RAW264.7, 44,35±3,31 % in LoVo und 68,99±5,42 % in THP-1a. Nach 24h *p. i.* wurden folgende relative Anzahlen infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl für *S. Choleraesuis* ermittelt: 46,21±4,61 % in IPEC-J2, 35,49±2,47 % in 3D4/31, 47,41±3,76 % in MODE-K, 63,84±4,51 % in RAW264.7, 39,86±3,39 % in LoVo und 73,99±6,71 % in THP-1a (Abb. 26).

Hierbei wurde deutlich, dass *S. Typhimurium* zwischen 4h und 24h *p. i.* zu einer Zunahme der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl in den Zellkulturen 3D4/31 und RAW264.7 führte. *S. Choleraesuis* hingegen zeigte zwischen 4h und 24h *p. i.* einen Abfall der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl in 3D4/31 und MODE-K (Abb. 26).

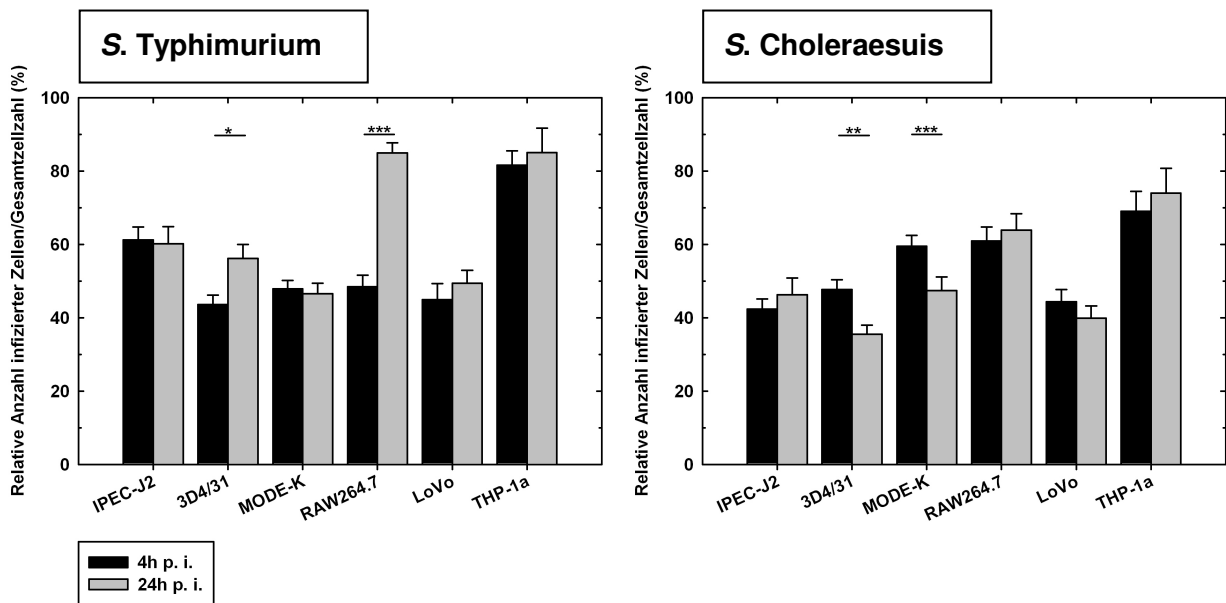


Abb. 26 Relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl für die GFP-markierten Serovare *S. Typhimurium* (links) und *S. Choleraesuis* (rechts)

Die Zellen wurden mit GFP-markierten *S. Typhimurium* (links) oder *S. Choleraesuis* (rechts) infiziert. Gezeigt ist die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl (mikroskopisches Sichtfeld, $10345 \pm 10 \mu\text{m}^2$, 1000fache Vergrößerung,) als $\bar{x} + \sigma_n$ für 4h *p. i.* und 24h *p. i.*. Innerhalb einer Zellart wurde für die zwei untersuchten Serovare die relative Anzahl infizierter Zellen mittels T-Test für gepaarte Stichproben auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,001$ (***), $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,05$ (*)).

4.3.3 Darstellung der Gesamtzellzahl nach Salmonelleninfektion 4h *p. i.* und 24h *p. i.*

Des Weiteren wurde die Gesamtzellzahl pro Sichtfeld im Mikroskop ermittelt, um einen Eindruck über mögliche Zellverluste durch eine entsprechende Salmonelleninfektion zwischen 4h und 24h *p. i.* zu gewinnen. Das mikroskopische Sichtfeld betrug hierbei $10345 \pm 10 \mu\text{m}^2$ (1000fache Vergrößerung, Ölimmersion).

4h nach der *S. Typhimurium* Infektion wurden folgende Zellzahlen nachgewiesen: $6,50 \pm 0,56$ IPEC-J2, $47,90 \pm 3,29$ 3D4/31, $16,80 \pm 1,65$ MODE-K, $51,90 \pm 3,96$ RAW264.7, $40,78 \pm 4,14$ LoVo und $16,20 \pm 1,50$ THP-1a. Nach 24h wurden folgende Zellzahlen bei der *S. Typhimurium* Infektion ermittelt: $2,70 \pm 0,30$ IPEC-J2, $44,40 \pm 5,30$ 3D4/31, $15,50 \pm 1,86$ MODE-K, $49,00 \pm 5,44$ RAW264.7, $28,80 \pm 2,43$ LoVo und $3,60 \pm 0,81$ THP-1a. *S. Typhimurium* führte zu einem Abfall der Gesamtzellzahl *in vitro* bei porcinen IPEC-J2 sowie bei den humanen LoVo und THP-1a-Zellen (Abb. 27).

4h nach der *S. Choleraesuis* Infektion wurden folgende Zellzahlen nachgewiesen: $6,50 \pm 0,97$ IPEC-J2, $36,00 \pm 4,24$ 3D4/31, $17,60 \pm 2,28$ MODE-K, $51,60 \pm 5,03$ RAW264.7, $46,80 \pm 3,43$ LoVo und $13,30 \pm 2,28$ THP-1a. Nach 24h wurden folgende Zellzahlen bei der *S. Choleraesuis* Infektion ermittelt: $4,80 \pm 0,47$ IPEC-J2, $45,57 \pm 2,92$ 3D4/31, $14,30 \pm 1,61$ MODE-K, $50,89 \pm 3,16$ RAW264.7, $45,90 \pm 7,20$ LoVo und $11,80 \pm 1,85$ THP-1a. Die *S. Choleraesuis* Infektion resultierte, im Gegensatz zur *S. Typhimurium* Infektion, nicht in einen Zellverlust zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h *p. i.* (Abb. 27).

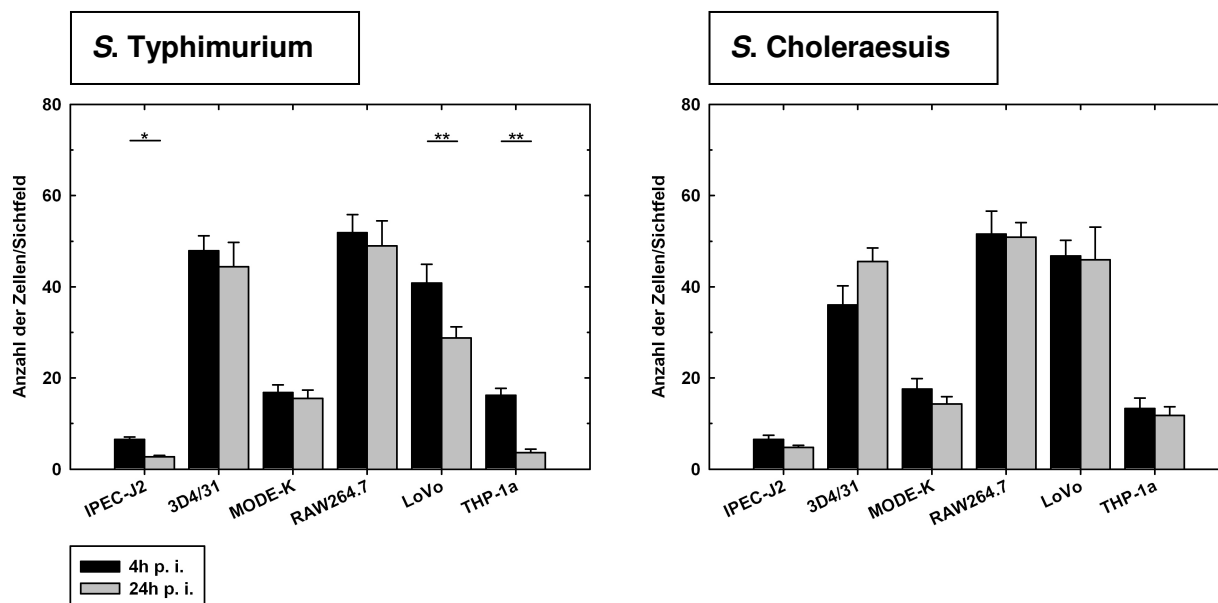


Abb. 27 Gesamtzellzahl pro mikroskopischem Sichtfeld für die GFP-markierten Serovare *S. Typhimurium* (links) und *S. Choleraesuis* (rechts)

Gezeigt ist die Gesamtzellzahl pro mikroskopischem Sichtfeld (1000fache Vergrößerung, $10345 \pm 10 \mu\text{m}^2$) als $\bar{x} + \sigma_n$ für die Serovare *S. Typhimurium* (links) und *S. Choleraesuis* (rechts) nach 4h *p. i.* und 24h *p. i.*. Innerhalb einer Zellart wurde die Gesamtzellzahl mittels Test für gepaarte Stichproben auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01(**)$ und $\alpha \leq 0,05(*)$).

4.4 Transfektion der Zelllinien

Für die Verwendung der verschiedenen permanenten Zelllinien im Chemolumineszenzversuch wurden zunächst die optimalen Transfektionsbedingungen definiert, da diese in der Literatur für die porcinen und murinen Zelllinien nicht vorhanden waren (Tab. 4 und Abb. 28).

Die ermittelte Transfektionseffizienz gab den Prozentsatz positiv-transfizierter Zellen an der Gesamtzellzahl an. Für die Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem pDsRed-Monomer-N1-Mito-Vektor (Clontech) transfiziert. Anschließend wurden die positiv-transfizierten und damit rot-fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Die Transfektion der Zelllinien führte weder zu einer veränderten Zelldichte noch zu einem statistisch signifikanten Anstieg apoptotischer Zellkerne.

Die Abb. 28 zeigen beispielhaft die Transfektionseffizienzen, getestet unter optimalen Bedingungen für die porcinen Zellkulturen IPEC-J2 und 3D4/31. Dies sind die ersten beschriebenen Transfektionseffizienzbestimmungen von IPEC-J2 und 3D4/31. Die Zellen IPEC-J2 konnten im Durchschnitt zu $77 \pm 10,1$ % transfiziert werden, mit einem maximalen Untersuchungswert von 96 % positiv-transfizierten Zellen unter den Bedingungen: 7:2 FuGene:DNA Verhältnis, 25 % der FuGene:DNA Gemischmenge, 48h *post transfectionem*. Die porcinen Zellen 3D4/31 konnten im Durchschnitt zu $74 \pm 8,0$ % transfiziert werden unter den Bedingungen: 5:2 FuGene:DNA Verhältnis, 25 % der FuGene:DNA Gemischmenge, 24h *post transfectionem* (Tab. 4 und Abb. 28).

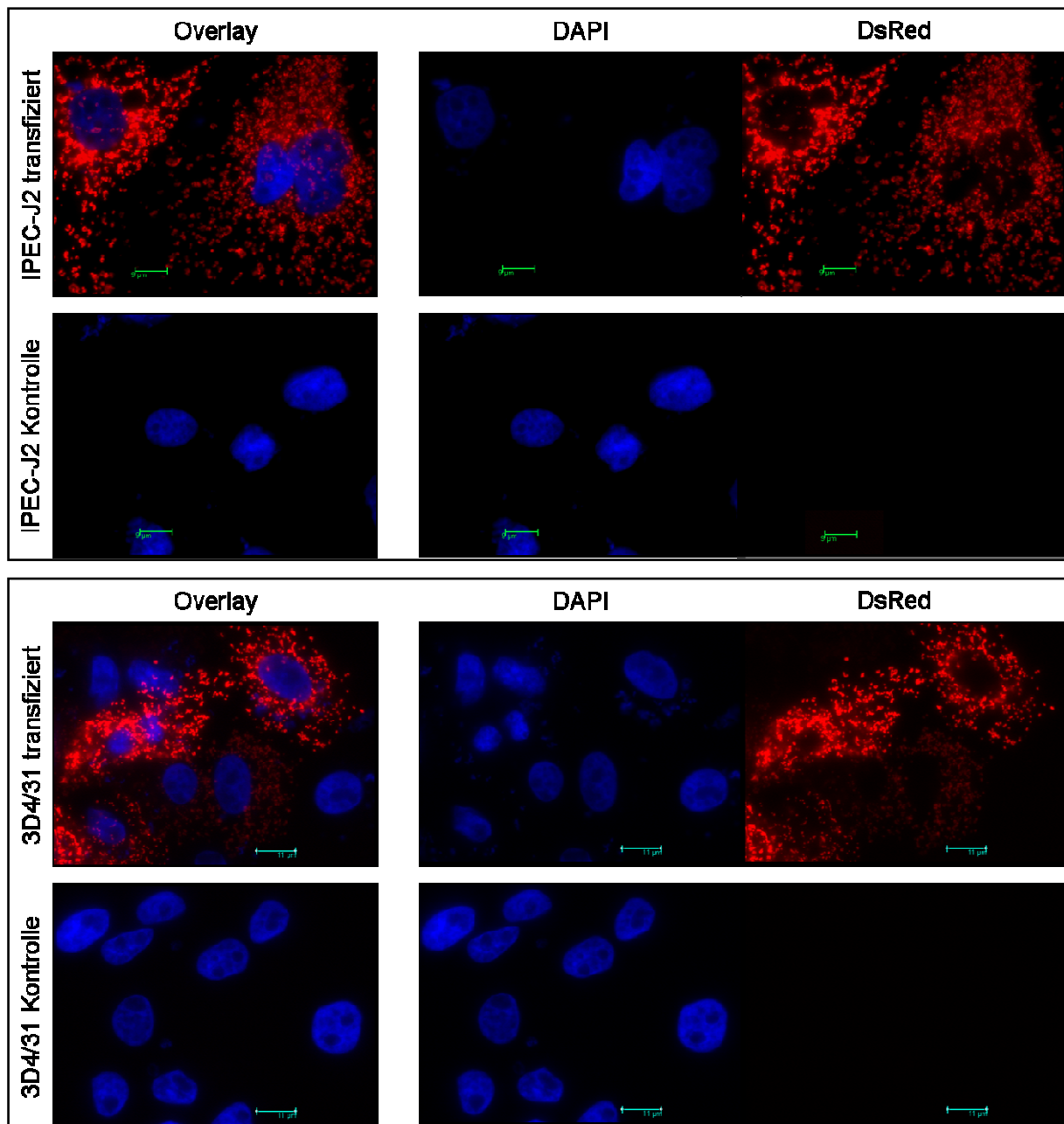


Abb. 28 Transfektion von porcinen IPEC-J2 (oben) und porcinen 3D4/31 (unten)
 Gezeigt sind die Transfektionseffizienzen für die porcinen IPEC-J2 (1. und 2. Reihe; Balken = 9 µm) und 3D4/31 (3. und 4. Reihe, Balken = 11 µm). Die Zellen wurden mit dem pDsRed-Monomer-N1-Mito-Vektor (Clontech) transfiziert. Die untransfizierte Kontrolle wurde mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Positiv-transfizierte und damit rot-leuchtende Zellen wurden gezählt. Darüber hinaus wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und somit die Gesamtzellzahl bestimmt.

4.5 Chemolumineszenzversuch (NF-κB-Aktivierung)

Für die Ermittlung der Chemolumineszenz wurden die Zellen zunächst transfiziert und anschließend einem Infektionstest unterzogen. Die Chemolumineszenz wurde im Luminometer in so genannten *Relative Luminescence Units* (RLU) erfasst. Die Höhe der ermittelten RLU entsprach hierbei der Menge an gebildetem Luciferaseenzym. Die Luciferase unterlag der Kontrolle eines NF-κB-abhängigen Promotors, somit konnte daraus indirekt auf die gebildete NF-κB-Menge nach einem gesetzten Stimulus, hier die

Salmonelleninfektion, geschlossen werden. Darüber hinaus wurden positive Stimuli durch die Gabe von *Salmonella*-LPS oder UV-inaktivierten Salmonellen gesetzt. Als negative Kontrolle dienten die transfizierten aber unstimulierten Zellen. Als Leerwert wurden unstimulierte und nicht transfizierte Zellen genutzt, der Leerwert wurde vom Messwert abgezogen. Im Chemolumineszenzversuch wurden entsprechend dem Infektionsversuch die gleichen Zellkulturen und Serovare verwendet. Dazu gehörten jeweils eine epitheliale und eine makrophagenähnliche Zelllinie pro betrachteten Wirtsorganismus Schwein, Maus und Mensch. Die makrophagenähnliche Zelllinie THP-1 konnte jedoch aufgrund der mangelhaften Transfektionseffizienz nicht mit in den Versuch aufgenommen werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse getrennt nach den Wirtsorganismen dargestellt.

4.5.1 RLU in porcinen Zellen

In dieser Arbeit wurden die porcinen adhärennten Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 für die Chemolumineszenzstudien verwendet. Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität über 4h und 24h *p. i.* als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n). Der Wert der unstimulierten Negativkontrolle wurde eins gesetzt und die Messwerte wurden auf diesen Kontrollwert bezogen. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt.

Die porcinen epithelialen IPEC-J2-Zellen zeigten nach 4h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Dublin* 5,72±0,18, *S. Enteritidis* 5,02±0,12 gefolgt von *S. Typhimurium* 4,11±0,13, *S. Choleraesuis* 3,25±0,11, LPS 2,10±0,04 und UV-inaktivierten Salmonellen 5,10±0,05. Die porcinen epithelialen IPEC-J2-Zellen zeigten nach 24h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Enteritidis* 4,07±0,13, *S. Dublin* 3,46±0,07 gefolgt von *S. Typhimurium* 3,38±0,08, *S. Choleraesuis* 2,72±0,11, LPS 2,18±0,08 und UV-inaktivierten Salmonellen 2,20±0,02. In porcinen IPEC-J2-Zellen wurde bereits 4h *p. i.* ein deutlicher Anstieg der RLU, vor allem durch den Einfluss von *S. Dublin* gefolgt von *S. Enteritidis* ermittelt. Nach 24h *p. i.* fielen jedoch die Luciferaseaktivitäten deutlich ab (Abb. 29).

Die porcinen makrophagenähnlichen 3D4/31-Zellen zeigten nach 4h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Dublin* 1,97±0,06, *S. Enteritidis* 1,95±0,04 gefolgt von *S. Typhimurium* 1,91±0,07, *S. Choleraesuis* 1,91±0,06, LPS 1,39±0,05 und UV-inaktivierten Salmonellen 2,64±0,04. Nach 24h *p. i.* wurden folgende relative Luciferaseaktivitäten in 3D4/31-Zellen ermittelt: *S. Enteritidis* 3,40±0,05, *S. Typhimurium* 2,62±0,06 gefolgt von *S. Choleraesuis* 2,29±0,07, *S. Dublin* 2,06±0,02, LPS 1,28±0,02 und UV-inaktivierten Salmonellen 1,40±0,02. Die 3D4/31-Zellen wiesen erst 24h *p. i.* einen deutlicheren Anstieg der RLU auf. Hier waren es vor allem die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, welche zu einer intrazellulären NF-κB-Antwort führte (Abb. 29).

Beide Zellarten konnten mit den verwendeten Kontrollen, LPS und UV-inaktivierten Salmonellen, erfolgreich stimuliert werden. Hierbei reagierten die epithelialen Zellen deutlich stärker. Die Luciferaseaktivität beider Zellarten ließ 24h *p. i.* nach Stimulusgabe durch UV-inaktivierte Salmonellen deutlich nach. Die Relative Luciferaseaktivität zwischen *S. Typhimurium* und den UV-inaktivierten Salmonellen war für die Zeitpunkte 4h *p. i.* und auch 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in IPEC-J2 und 3D4/31 (MANOVA, Post Hoc Scheffé, $\alpha \leq 0,001$ (***) (nicht eingezeichnet) (Abb. 29).

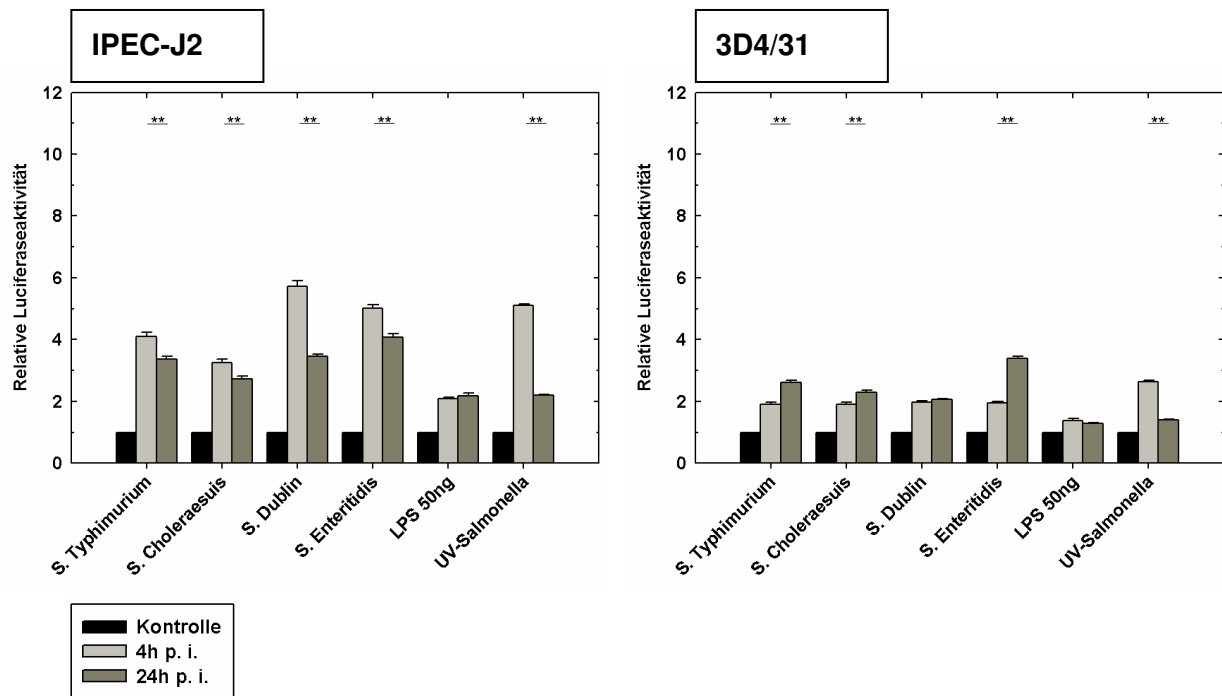


Abb. 29 Darstellung der relativen Luciferaseaktivität nach Salmonelleninfektion in porcinen IPEC-J2 (links) und porcinen 3D4/31 (rechts)

Gezeigt sind die relativen RLU als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) mit Standardfehler (σ_n) für IPEC-J2 (links) und 3D4/31 (rechts) über 4h und 24h *p. i.*. Die unstimulierte Kontrolle wurde eins gesetzt. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die NF- κ B-Aktivierungsraten über 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (T-Test für gepaarte Stichproben, $\alpha \leq 0,01$ (**)). Die RLU zwischen *S. Typhimurium* und den UV-inaktivierten Salmonellen war für die Zeitpunkte 4h *p. i.* und auch 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in beiden Zellen (MANOVA, Post Hoc Scheffé mit $\alpha \leq 0,001$ (***); nicht eingzeichnet).

4.5.2 RLU in murinen Zellen

Als Zellkulturmodell murinen Ursprungs wurden die MODE-K-Zellen und RAW264.7-Zellen verwendet. Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität über 4h und 24h *p. i.* als $\bar{x} + \sigma_n$. Der Wert der unstimulierten Negativkontrolle wurde eins gesetzt und die Messwerte wurden auf diesen Kontrollwert bezogen. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt.

Die murinen epithelialen MODE-K-Zellen zeigten nach 4h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Dublin* $3,17 \pm 0,08$, *S. Enteritidis* $2,97 \pm 0,09$ gefolgt von *S. Choleraesuis* $2,81 \pm 0,11$, *S. Typhimurium* $2,63 \pm 0,09$, LPS $1,99 \pm 0,07$ und UV-inaktivierten Salmonellen $2,91 \pm 0,05$. Die murinen MODE-K-Zellen zeigten nach 24h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Enteritidis* $3,77 \pm 0,08$, *S. Dublin* $3,57 \pm 0,13$ gefolgt von *S. Typhimurium* $3,52 \pm 0,11$, *S. Choleraesuis* $2,38 \pm 0,06$, LPS $2,53 \pm 0,05$ und UV-inaktivierten Salmonellen $1,81 \pm 0,04$. In murinen MODE-K-Zellen wurde bereits 4h *p. i.* ein deutlicher Anstieg der RLU vor allem durch den Einfluss von *S. Dublin* und *S. Enteritidis* ermittelt. Nach 24h *p. i.* stiegen die Luciferaseaktivitäten deutlich an, dies galt nicht für *S. Choleraesuis* (Abb. 30).

Die murinen makrophagenähnlichen RAW264.7-Zellen zeigten nach 4h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Enteritidis* $1,77 \pm 0,04$, *S. Typhimurium* $1,77 \pm 0,05$ gefolgt von

S. Dublin 1,73±0,03 und S. Choleraesuis 1,72±0,04, LPS 1,44±0,04 und UV-inaktivierten Salmonellen 2,15±0,04. Nach 24h *p. i.* konnten folgende relative Luciferaseaktivitäten in RAW264.7-Zellen ermittelt werden: S. Enteritidis 2,75±0,10, S. Dublin 2,50±0,09 gefolgt von S. Typhimurium 2,33±0,09, S. Choleraesuis 2,28±0,09, LPS 1,59±0,07 und UV-inaktivierten Salmonellen 1,86±0,06. Die murinen RAW264.7-Zellen wiesen, ähnlich wie die porcinen Makrophagen, keinen deutlichen Anstieg der RLU im initialen 4h *p. i.* Wert auf. Nach 24h *p. i.* zeigte die Serovar S. Enteritidis den höchsten Anstieg der RLU. Die epithelialen MODE-K-Zellen wiesen im Vergleich zu den makrophagenähnlichen RAW264.7-Zellen eine höhere relative Luciferaseaktivität auf (Abb. 30).

Auch hier konnten beide Zellarten mit LPS und UV-inaktivierten Salmonellen stimuliert werden. Die Luciferaseaktivität beider Zellen ließ 24h nach Stimulusgabe durch UV-inaktivierte Salmonellen deutlich nach.

Die Relative Luciferaseaktivität zwischen S. Typhimurium und den UV-inaktivierten Salmonellen war für die Zeitpunkte 4h *p. i.* und auch 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in RAW264.7 und für den Zeitpunkt 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in MODE-K (MANOVA, Post Hoc Scheffé, $\alpha \leq 0,001$ (***) (nicht eingezeichnet) (Abb. 30).

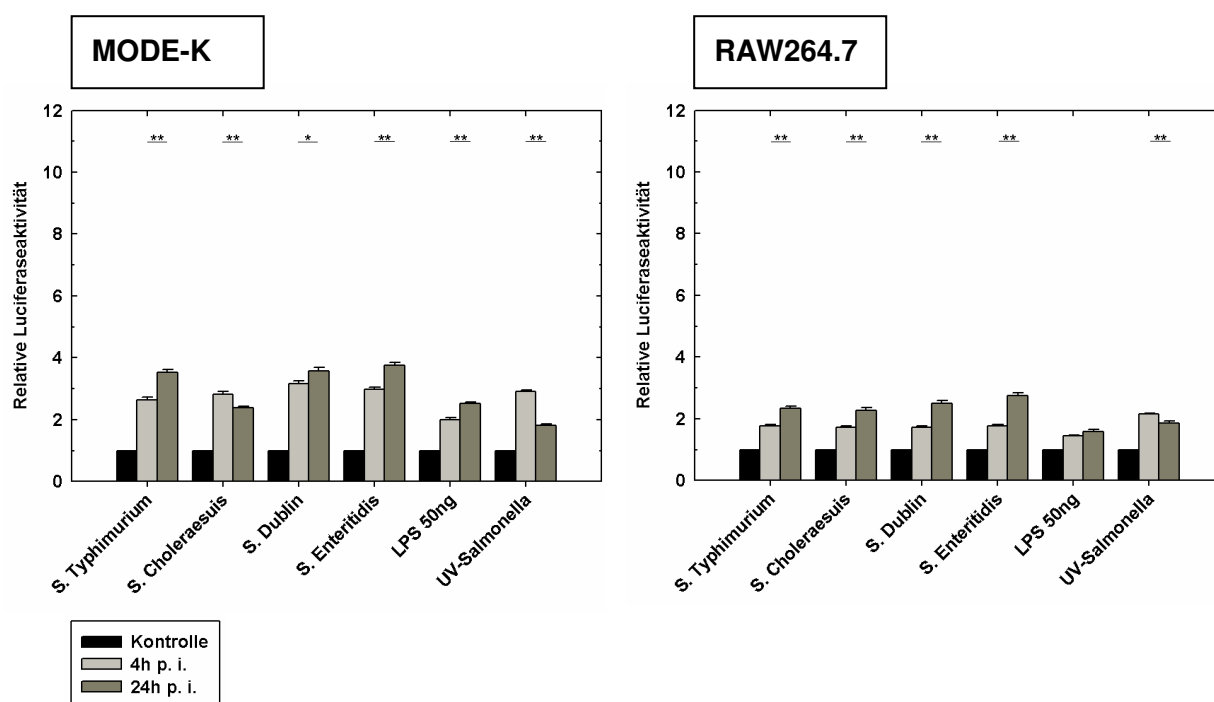


Abb. 30 Darstellung der relativen Luciferaseaktivität in murinen MODE-K (links) und murinen RAW264.7 (rechts)

Gezeigt sind die relativen RLU als $\bar{x} + \sigma_n$ für MODE-K (links) und RAW264.7 (links) über 4h und 24h *p. i.*. Die unstimulierte Kontrolle wurde eins gesetzt. Innerhalb eines betrachteten Serovars waren die NF- κ B-Aktivierungsraten über 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (T-Test für gepaarte Stichproben, $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,05$ (*)). Die RLU zwischen S. Typhimurium und den UV-inaktivierten Salmonellen war für RAW264.7 (beide Zeitpunkte) und für MODE-K bei 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (MANOVA, Post Hoc Scheffé mit $\alpha \leq 0,001$ (***) (nicht eingezeichnet).

4.5.3 RLU in humanen Zellen

Aufgrund der ungenügenden Transfektionseffizienz der THP-1-Zellen konnten die NF- κ B-Aktivierungsversuche nur mit der humanen Zelllinie LoVo durchgeführt werden. Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität über 4h und 24h *p. i.* als $\bar{x} + \sigma_n$. Der Wert der unstimulierten Negativkontrolle wurde eins gesetzt und die Messwerte wurden auf diesen Kontrollwert bezogen. Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test für gepaarte Stichproben ermittelt.

Die humanen epithelialen LoVo-Zellen zeigten nach 4h *p. i.* folgende relative Luciferaseaktivitäten: *S. Dublin* $6,82 \pm 0,16$, *S. Choleraesuis* $6,11 \pm 0,17$ gefolgt von *S. Typhimurium* $5,59 \pm 0,20$, *S. Enteritidis* $4,20 \pm 0,09$, LPS $1,98 \pm 0,03$ und UV-inaktivierten Salmonellen $9,41 \pm 0,21$. Nach 24h *p. i.* wurden folgende relative Luciferaseaktivitäten in LoVo ermittelt: *S. Typhimurium* $5,43 \pm 0,18$, *S. Enteritidis* $5,56 \pm 0,11$ gefolgt von *S. Dublin* $4,94 \pm 0,13$, *S. Choleraesuis* $4,33 \pm 0,08$, LPS $1,67 \pm 0,20$ und UV-inaktivierten Salmonellen $3,06 \pm 0,11$. Die epithelialen LoVo zeigten initial eine deutliche Zunahme der relativen Luciferaseaktivität, vor allem nach Infektion mit *S. Dublin* und *S. Choleraesuis*. 24h *p. i.* wiesen die Zoonoseerreger *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* die höchsten messbaren RLU auf (Abb. 31).

Auch bei den LoVo-Zellen ließ 24h nach Stimulusgabe durch UV-inaktivierte Salmonellen die Luciferaseaktivität deutlich nach. Die Relative Luciferaseaktivität zwischen *S. Typhimurium* und den UV-inaktivierten Salmonellen war für die Zeitpunkte 4h *p. i.* und auch 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in LoVo (MANOVA, Post Hoc Scheffé, $\alpha \leq 0,001$ (***) (nicht eingezeichnet) (Abb. 31).

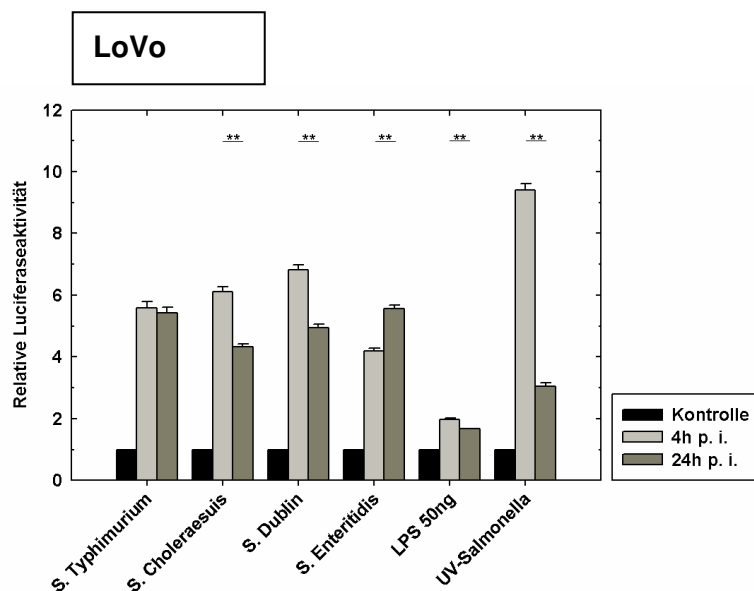


Abb. 31 Darstellung der relativen Luciferaseaktivität in humanen epithelialen Zellen (LoVo) nach Salmonelleninfektion

Gezeigt sind die relativen RLU als $\bar{x} + \sigma_n$ für LoVo. Die unstimulierte Kontrolle wurde eins gesetzt. Innerhalb eines betrachteten Serovars war die NF- κ B-Aktivierungsraten über 4h und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich (T-Test für gepaarte Stichproben, $\alpha \leq 0,01$ (**)). Die RLU zwischen *S. Typhimurium* und den UV-inaktivierten Salmonellen war für die Zeitpunkte 4h *p. i.* und 24h *p. i.* statistisch hoch signifikant unterschiedlich in LoVo (MANOVA, Post Hoc Scheffé mit $\alpha \leq 0,001$ (***) (nicht eingezeichnet).

4.5.4 Weiterführende statistische Auswertung zum Chemolumineszenzversuch

Für die Darstellung und statistische Auswertung des Einflusses des jeweiligen Serovars auf die Zellkultursysteme wurde die relative Luciferaseaktivität nach Zellarten sortiert aufgeführt. Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität pro betrachteter Zelllinie als $\bar{x} + \sigma_n$. Innerhalb einer Zellart wurde die NF- κ B-Aktivierung durch die vier Serovare mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé) (Abb. 32 und 33).

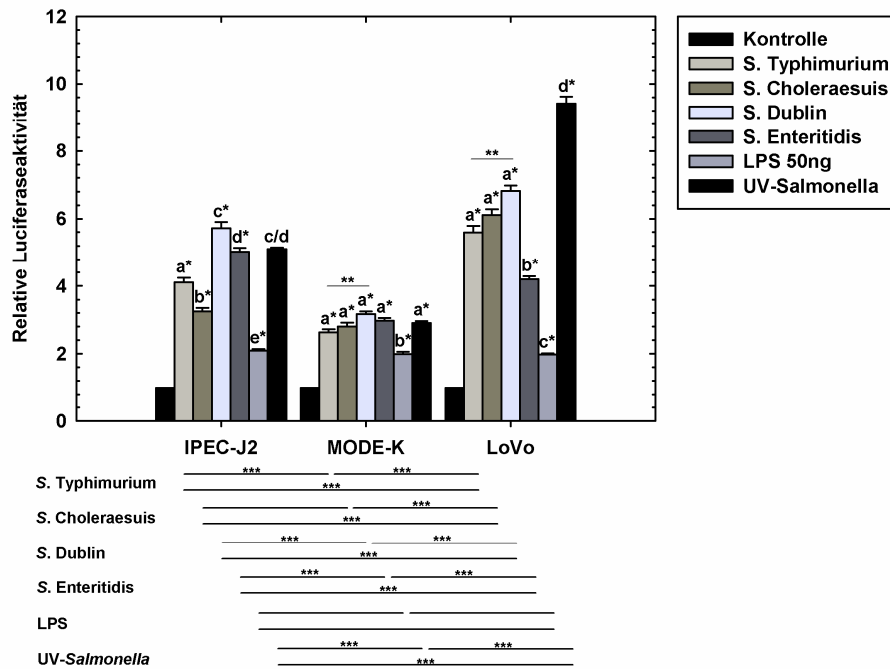
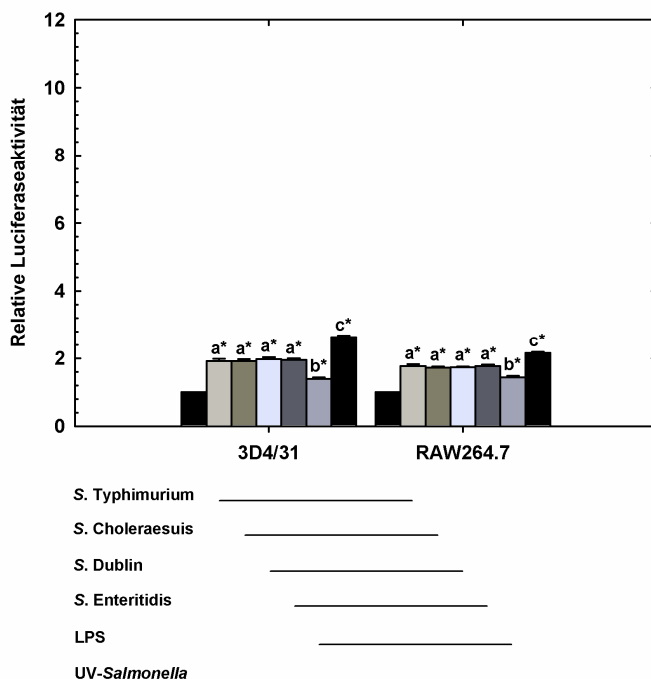


Abb. 32 Darstellung der Luciferaseaktivierung 4h *p. i.*

Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität pro betrachteter Zelllinie als $\bar{x} + \sigma_n$. Die unstimulierte Kontrolle wurde eins gesetzt. Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 2 makrophagenähnliche Zellen) wurde die relative Luciferaseaktivität mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-e*) und $\alpha \leq 0,05$ (Buchstaben a-e ohne*)). Gleiche Buchstaben (a-e) bedeuten keine statistische Signifikanz (Ausnahme sind Querbalken mit $\alpha \leq 0,01$ (**)). Unterhalb der Abbildung wurde die Luciferaseaktivität der sechs Stimuli zwischen den drei Wirtsmodellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,001$ (***)).



4. Ergebnisse

Die wirtsadaptierten Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* sowie auch der Zoonoseerreger *S. Enteritidis* zeigten deutliche Luciferaseaktivierungen in den epithelialen Zellen porcinen und humanen Ursprungs. Die Serovar *S. Typhimurium* erzeugte in epithelialen Zellen porcinen und humanen Ursprungs deutlich höhere NF- κ B-Aktivierungen als in murinen Zellen. Mittelte man die Werte beider Zellarten (Epithel und Makrophagen), so war die Luciferaseaktivität der murinen Zellen statistisch hoch signifikant niedriger im Vergleich zu den beiden porcinen und der humanen Zellart (MANOVA, Post Hoc Scheffé, $\alpha \leq 0.01$ (**)) (nicht separat dargestellt).

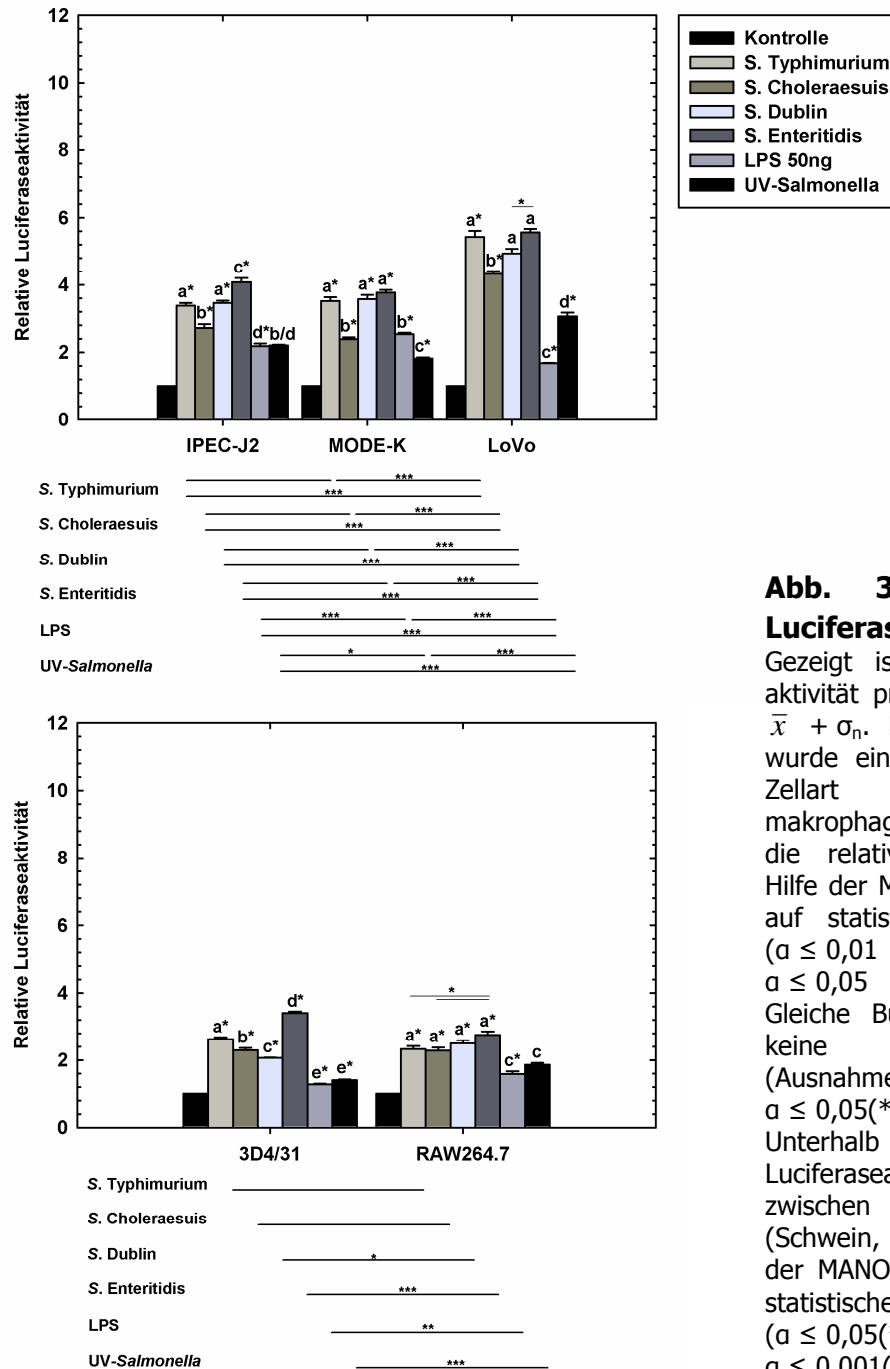


Abb. 33 Darstellung der Luciferaseaktivierung 24h *p. i.*

Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität pro betrachteter Zelllinie als $\bar{x} + \sigma_n$. Die unstimulierte Kontrolle wurde eins gesetzt. Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 2 makrophagenähnliche Zellen) wurde die relative Luciferaseaktivität mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-e*) und $\alpha \leq 0,05$ (Buchstaben a-e ohne*)). Gleiche Buchstaben (a-e) bedeuten keine statistische Signifikanz (Ausnahme sind Querbalken mit $\alpha \leq 0,05$ (*)).

Unterhalb der Abbildung wurde die Luciferaseaktivität der sechs Stimuli zwischen den drei Wirtsmodellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,01$ (**), $\alpha \leq 0,001$ (***)).

Die makrophagenähnlichen Zellen 3D4/31 und RAW264.7 zeigten zum Zeitpunkt 4h *p. i.* keine Unterschiede durch die Salmonelleninfektion in Bezug auf die Luciferaseaktivität. Erst 24h *p. i.* waren Unterschiede, hervorgerufen durch die Serovare, deutlich.

Nach 24h *p. i.* konnten bei den Zoonoseerregern *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* im Allgemeinen die höchsten Luciferaseaktivitäten in Epithelzellen und makrophagenähnlichen Zellen gemessen werden (Abb. 32 und 33).

Beim Vergleich der Zellarten Epithel mit Makrophagen zeigte sich, dass die epithelialen Zellen stärker auf den bakteriellen Stimulus mit NF- κ B reagierten. Die makrophagenähnlichen Zellen zeigten eine geringere NF- κ B-Aktivierung, welche darüber hinaus erst 24h *p. i.* an Intensität zunahm. Betrachtete man die Luciferaseaktivität gemittelt aus den drei epithelialen und den zwei makrophagenähnlichen Zellarten, so zeigte sich, dass die epithelialen Zellen eine statistisch signifikant höhere NF- κ B-Aktivierung sowohl 4h als auch 24h *p. i.* aufwiesen (Abb. 34).

Dieser Epithel-Makrophagen-Unterschied aus Abb. 34 wurde darüber hinaus auch für die einzelnen vier Serovare zu den Zeitpunkten 4 und 24h *p. i.* auf statistische Signifikanz mittels T-Test für ungepaarte Stichproben geprüft. Hierbei zeigte sich, dass sowohl für den Zeitpunkt 4 als auch für 24h *p. i.* alle vier Serovare einen statistisch signifikanten Epithel-Makrophagen-Unterschied aufwiesen ($\alpha \leq 0,001$ (***) (Daten nicht gezeigt).

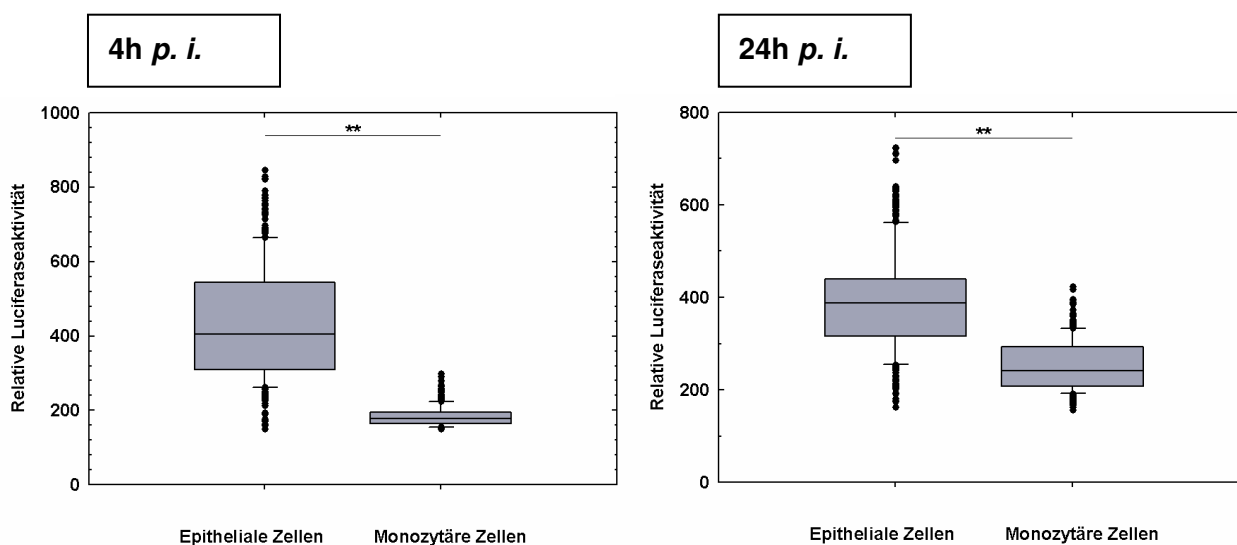


Abb. 34 Darstellung der Luciferaseaktivität nach Zellart zum Zeitpunkt 4h *p. i.* (links) und 24h *p. i.* (rechts)

Dargestellt sind die relativen Luciferaseaktivitäten ermittelt aus allen epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen für alle vier verwendeten Serovare als Median (\tilde{x}), Quartil Q_{25} und Q_{75} , Dezil Q_{10} und Q_{90} sowie den Minimum-, Maximumwerten. Auf statistische Signifikanz wurde getestet mittels T-Test für ungepaarte Stichproben ($\alpha \leq 0,01$ (**)).

4.6 Korrelation zwischen den Ergebnissen der Infektions- und Chemolumineszenzversuche

Die Korrelation beschreibt eine Beziehung zwischen mehreren statistischen Variablen. Die Korrelation gibt jedoch lediglich die Stärke eines linearen Zusammenhangs wieder und kann keine Aussage zur Kausalität treffen. Eine positive Korrelation steht hierbei für einen positiven linearen Zusammenhang und eine negative Korrelation für einen negativen linearen Zusammenhang zwischen zwei oder mehreren Variablen.

Um die Korrelation zwischen den Infektions- (x_I) und Chemolumineszenzergebnissen (x_C) zu ermitteln, wurden zunächst die Differenzen der 4h und 24h *p. i.* Ergebnisse aus den Rohdaten für die Infektionsversuche ($x_{I24}-x_{I4}$) sowie die Differenzen der 4h und 24h *p. i.* Ergebnisse aus den Rohdaten der Chemolumineszenzversuche ($x_{C24}-x_{C4}$) gebildet. Beide Zahlenwerte wurden anschließend über eine bivariate Korrelation nach Spearmann-Rho auf zweiseitige Signifikanz geprüft. Gezeigt sind die berechneten Korrelationskoeffizienten r_s für die Differenzwerte aus den Infektions- und Chemolumineszenzversuchen, wobei $r_s \geq 0,300$ für eine geringe Korrelation und $r_s \geq 0,800$ für eine hohe Korrelation steht. Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten (\bar{x}_r) wurden über die Fisher z-Transformation errechnet (Tab. 15).

Tab. 15 Darstellung der Korrelationskoeffizienten (r_s)

Für die Differenzwerte aus den Infektions- und Chemolumineszenzversuchen sind die berechneten Korrelationskoeffizienten (r_s) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) gezeigt ($r_s \geq 0,300$ geringe Korrelation; $r_s \geq 0,800$ hohe Korrelation). Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten (\bar{x}_r) wurden über die Fisher z-Transformation errechnet. Über eine bivariate Korrelation nach Spearmann-Rho wurden die Korrelationskoeffizienten (r_s) auf zweiseitige Signifikanz ($\alpha \leq 0,05$ (*) und $\alpha \leq 0,01$ (**)) geprüft.

	IPEC-J2	3D4/31	MODE-K	RAW264.7	LoVo	\bar{x}_r
Salmonella Typhimurium	$r_s = +0,264$ $p = 0,159$	$r_s = -0,379^*$ $p = 0,039$	$r_s = -0,066$ $p = 0,730$	$r_s = -0,047$ $p = 0,804$	$r_s = +0,065$ $p = 0,734$	-0,035
Salmonella Choleraesuis	$r_s = -0,003$ $p = 0,989$	$r_s = -0,201$ $p = 0,287$	$r_s = -0,343$ $p = 0,064$	$r_s = +0,004$ $p = 0,984$	$r_s = +0,161$ $p = 0,396$	-0,079
Salmonella Dublin	$r_s = +0,438^{**}$ $p = 0,010$	$r_s = +0,075$ $p = 0,692$	$r_s = +0,053$ $p = 0,780$	$r_s = -0,168$ $p = 0,376$	$r_s = +0,439^*$ $p = 0,015$	+0,178
Salmonella Enteridis	$r_s = -0,323$ $p = 0,082$	$r_s = +0,063$ $p = 0,739$	$r_s = -0,483^{**}$ $p = 0,007$	$r_s = -0,386^*$ $p = 0,035$	$r_s = -0,159$ $p = 0,401$	-0,267
\bar{x}_r	+0,100	-0,116	-0,221	-0,154	+0,134	

Die Tendenzen der negativen linearen Korrelation von *S. Enteritidis* und der positiven linearen Korrelation von *S. Dublin* in den Zelllinien wurden mittels T-Test aus den errechneten z-Werten auf statistische Signifikanz geprüft (T-Test, ungepaarte Stichprobe). Demnach zeigten alle drei epithelialen Zellen zusammengenommen eine statistisch positive lineare Korrelation für *S. Dublin* Infektionen ($\bar{x}_r = +0,320^*$, $p = 0,021$) sowie eine negative lineare Korrelation für *S. Enteritidis* Infektionen ($\bar{x}_r = -0,328^*$, $p = 0,041$). Das heißt, es existierte ein positiver linearer Zusammenhang in den epithelialen Zellen zwischen der Invasion mit *S. Dublin* und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung. Die Infektion mit *S. Enteritidis* hingegen wies im Epithel einen negativen linearen Zusammenhang zur darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung auf.

Darüber hinaus wurden die Korrelationskoeffizienten r_s zwischen den Rohdaten der Infektions- und Chemolumineszenzerggebnisse für die Zeitpunkte 4h und 24h *p. i.* separat berechnet. Die Rohdaten wurden jeweils über eine bivariate Korrelation nach Spearman-Rho auf zweiseitige Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse dieser Korrelation sind für die 4h und 24h *p. i.* in Tabelle 16 separat dargestellt. Hierbei wies *S. Dublin* einen signifikant negativen linearen Zusammenhang zwischen Infektion und NF- κ B-Aktivierung für 4h *p. i.* auf. Das heißt, nach 4h gibt es einen negativen linearen Zusammenhang in den epithelialen Zellen zwischen der Invasion mit *S. Dublin* und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung. Humane LoVo-Zellen zeigten einen positiven linearen Zusammenhang 4h *p. i.*, jedoch nach 24h *p. i.* einen negativen linearen Zusammenhang für die Infektion mit *S. Typhimurium* und die NF- κ B-Aktivierung. Darüber hinaus besaß die nicht-wirtsadaptierte Serovar *S. Enteritidis* einen positiven linearen Zusammenhang für die Infektion von Makrophagen im porcinen und murinen System (3D4/31 und RAW264.7) nach 24h *p. i.* und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung (Tab.16). Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass 24h *p. i.* die epithelialen Zellen im Gegensatz zu den makrophagenähnlichen Zellen eine statistisch signifikant positive Korrelation zwischen Invasionswerten und NF- κ B-Aktivierung aufwiesen (T-Test, $\alpha \leq 0,05$ (*), nicht dargestellt).

Tab. 16 Darstellung der Korrelationskoeffizienten (r_s) für 4h *p. i.* (oben) und 24h *p. i.* (unten)

Gezeigt sind die Korrelationskoeffizienten (r_s) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für die Ergebnisse aus den Infektions- und Chemolumineszenzversuchen zum Zeitpunkt 4h (oben) und 24h *p. i.* (unten) ($r_s \geq 0,300$ geringe Korrelation; $r_s \geq 0,800$ hohe Korrelation). Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten (\bar{x}_r) wurden über die Fisher z-Transformation errechnet und über eine bivariate Korrelation nach Spearman-Rho auf zweiseitige Signifikanz ($\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,001$ (***) geprüft.

4h <i>p. i.</i>	IPEC-J2	3D4/31	MODE-K	RAW264.7	LoVo	\bar{x}_r
<i>Salmonella Typhimurium</i>	$r_s = -0,029$ $p = 0,880$	$r_s = -0,127$ $p = 0,504$	$r_s = -0,168$ $p = 0,376$	$r_s = -0,231^*$ $p = 0,049$	$r_s = -0,667^{***}$ $p = 0,000$	-0,267
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	$r_s = +0,100$ $p = 0,600$	$r_s = +0,146$ $p = 0,440$	$r_s = -0,140$ $p = 0,460$	$r_s = +0,515^{**}$ $p = 0,008$	$r_s = -0,041$ $p = 0,830$	+0,126
<i>Salmonella Dublin</i>	$r_s = -0,418^*$ $p = 0,022$	$r_s = -0,335^*$ $p = 0,041$	$r_s = +0,252$ $p = 0,180$	$r_s = -0,238$ $p = 0,206$	$r_s = -0,658^{***}$ $p = 0,000$	-0,304
<i>Salmonella Enteritidis</i>	$r_s = +0,223$ $p = 0,274$	$r_s = +0,328$ $p = 0,077$	$r_s = -0,321$ $p = 0,084$	$r_s = -0,387^*$ $p = 0,035$	$r_s = +0,126$ $p = 0,506$	-0,009
\bar{x}_r	-0,037	+0,003	-0,096	-0,079	-0,360	

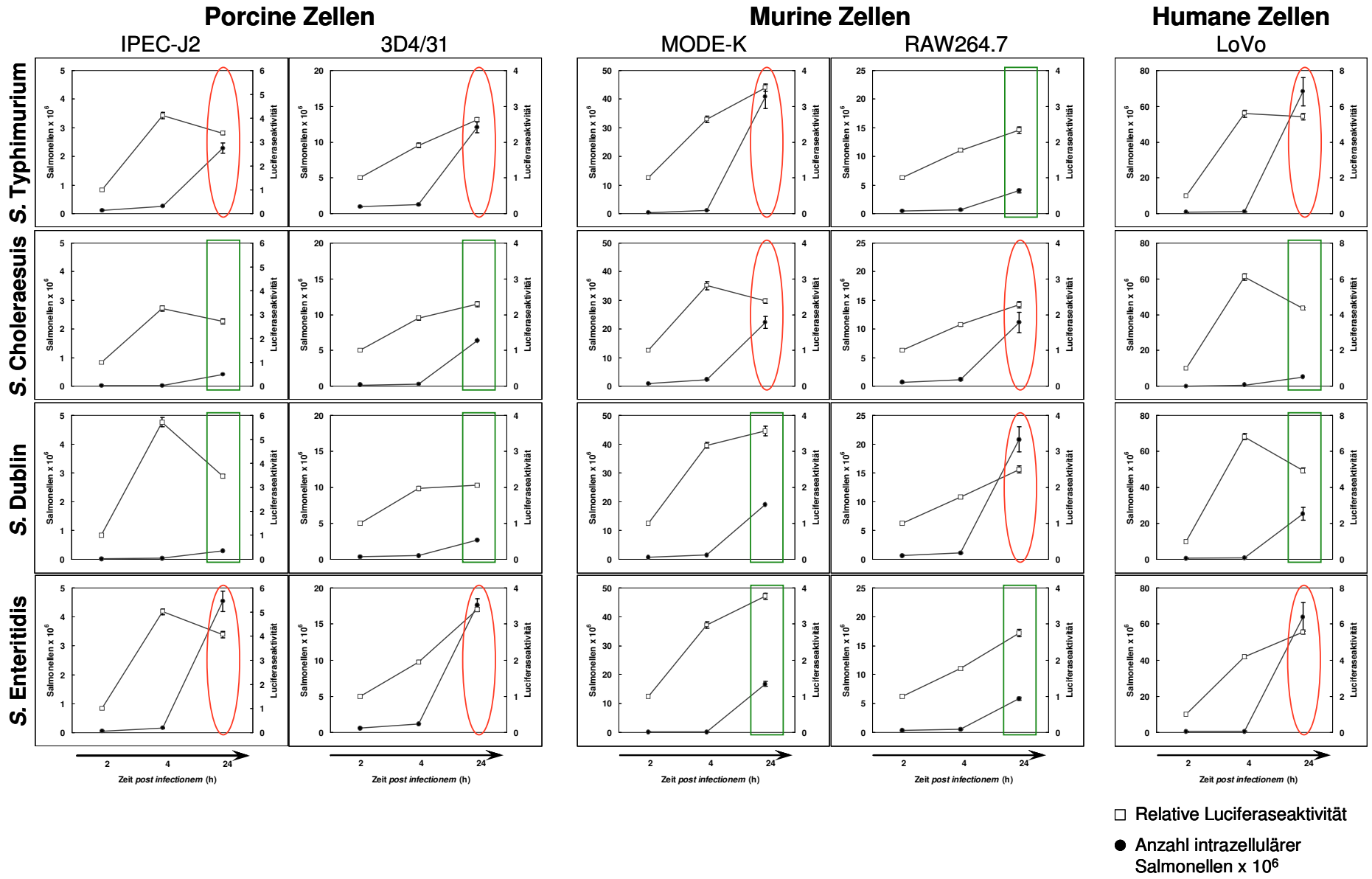
24h <i>p. i.</i>	IPEC-J2	3D4/31	MODE-K	RAW264.7	LoVo	\bar{x}_r
<i>Salmonella Typhimurium</i>	$r_s = +0,346$ $p = 0,061$	$r_s = -0,375^*$ $p = 0,041$	$r_s = +0,126$ $p = 0,506$	$r_s = -0,046$ $p = 0,811$	$r_s = +0,623^{***}$ $p = 0,000$	+0,154
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	$r_s = -0,025$ $p = 0,895$	$r_s = +0,015$ $p = 0,936$	$r_s = -0,136$ $p = 0,474$	$r_s = +0,008$ $p = 0,971$	$r_s = +0,153$ $p = 0,421$	+0,003
<i>Salmonella Dublin</i>	$r_s = -0,466^{**}$ $p = 0,010$	$r_s = -0,117$ $p = 0,537$	$r_s = +0,211$ $p = 0,263$	$r_s = -0,097$ $p = 0,610$	$r_s = -0,239$ $p = 0,203$	-0,149
<i>Salmonella Enteritidis</i>	$r_s = +0,193$ $p = 0,088$	$r_s = -0,556^{***}$ $p = 0,001$	$r_s = +0,331$ $p = 0,074$	$r_s = -0,463^{**}$ $p = 0,010$	$r_s = +0,094$ $p = 0,622$	-0,099
\bar{x}_r	+0,007	-0,274	+0,136	-0,136	+0,182	

Aufgrund dieser Korrelationshinweise wurden die Ergebnisse der Infektionsversuche (Anzahl intrazellulärer Salmonellen $\times 10^6$) und die Ergebnisse der NF- κ B-Aktivierungsversuche (Relative Luciferaseaktivität) gleichzeitig auf zwei Y-Achsen gegen die Zeit (X-Achse) aufgetragen, so dass der Verlauf und die Verhältnisse zwischen Infektion und NF- κ B-Aktivierung graphisch deutlich wurde (Abb. 35).

In dieser Übersicht zeigte sich, dass die nicht-wirtsadaptierten *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* für das Schwein und den Menschen in porcinen Zellen und in humanen Zellen einen deutlichen Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert besitzen (Hervorhebung rot, wenn geringer oder kein Abstand zwischen den Graphen). Im Gegenzug zeigten die wirtsadaptierten *S. Choleraesuis* (Schwein) und *S. Dublin* (Rind) in den porcinen Zellen und auch in den humanen LoVo einen deutlich verringerten Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert (Hervorhebung grün, wenn großer Abstand zwischen den Graphen). Die mäusepathogene Serovar *S. Typhimurium* hingegen und *S. Enteritidis*, welcher ebenfalls zu Bakteriämien in Mäusen führt, zeigten in murinen Makrophagen und zumindest teils auch in murinen Epithelzellen einen geringeren Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert (Abb. 35).

Abb. 35 Einfluss des Faktors Zeit auf eine Salmonelleninfektion (rechte Seite)

Nicht-wirtsadaptierte Serovare zeigten einen deutlichen Anstieg (rote Markierung) und wirtsadaptierte Serovare einen geringen Anstieg (grüne Markierung) zwischen den Infektionsraten im Vergleich zur NF- κ B-Aktivierung.



4.7 Nachweis der NOD-Expression

Die NOD-Proteine zählen zu den *pattern recognition receptors* (PRR) und stellen ein intrazelluläres Detektionssystem der Zellen dar. Die PRR erkennen hoch-konservierte Molekularstrukturen von möglichen Erregern und gehören zum Komplex der angeborenen Immunität.

Inwieweit die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien über eine NOD1- und NOD2-Genexpression verfügten, wurde mit Hilfe der PCR untersucht. Bis auf wenige Studien an den Zelllinien THP-1 und RAW264.7 (Takahashi *et al.*, 2006; Uehara *et al.*, 2005) existierten keine Publikationen zum Vorkommen und der Expression von NOD1 und NOD2 in den Zellkulturen LoVo, MODE-K, 3D4/31 sowie IPEC-J2. Deshalb wurde in dieser Arbeit über die gewonnene cDNA aus den porcinen, murinen und humanen Zellkulturen sowie im porcinen Darmgewebe die Expression der Moleküle NOD1 und NOD2 nachgewiesen.

4.7.1 NOD-Expression in porcinen Zelllinien und porcinem Darmgewebe

Die Expression von porcinem NOD1 sowohl in jejunalem Darmgewebe als auch in den porcinen epithelialen IPEC-J2-Zellen und makrophagenähnlichen 3D4/31-Zellen wurde mit Hilfe selbst synthetisierter Primer verifiziert. Dies galt auch für die Expression von porcinem NOD2. Das erwartete NOD1-PCR-Produkt war 604 bp und das NOD2-PCR-Produkt war 553 bp lang (Abb. 36).

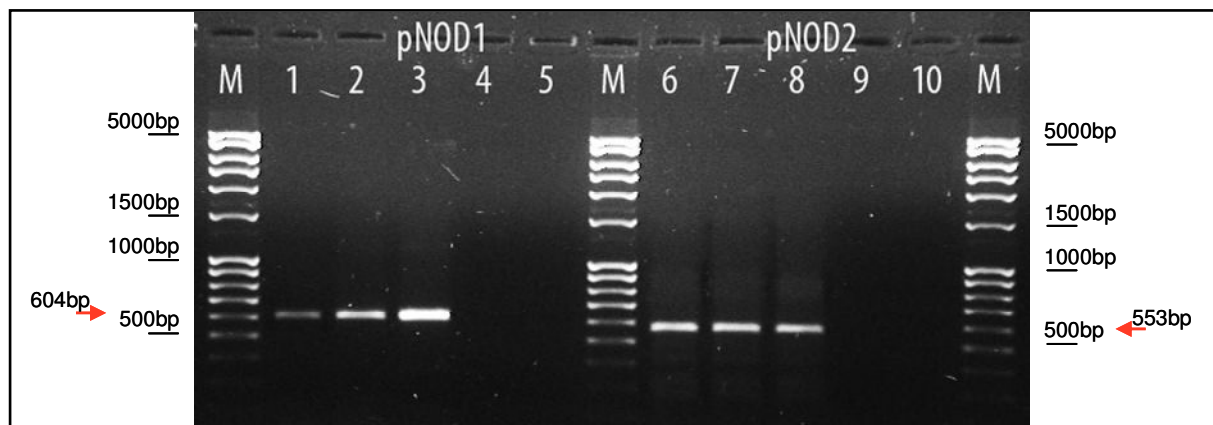


Abb. 36 Darstellung der Expression von porcinem NOD1 und NOD2

Gezeigt ist der Nachweis von porcinem NOD1 (pNOD1) und porcinem NOD2 (pNOD2). Die PCR erfolgte für das Primerpaar pNOD1_exon3 mit einer Primeranlagerungstemperatur von 67 °C und 30 Zyklen, das erwartete Produkt war 604 bp lang. Für das pNOD2_exon3 wurde eine Primeranlagerungstemperatur von 60 °C und 30 Zyklen verwendet (Produktlänge 553 bp).

Nr. 1, 6 = porcines Jejunum; Nr. 2, 7 = IPEC-J2; Nr. 3, 8 = 3D4/31; Nr. 4, 9 = Leerwertkontrolle der PCR; Nr. 5, 10 = Negativkontrolle der Agarosegelelektrophorese; M = 100 bp-DNA-Leiter *extended* (100-5000 bp, Roth)

4.7.2 NOD-Expression in murinen und humanen Zelllinien

Der Nachweis des murinen NOD1 und NOD2 in den epithelialen MODE-K-Zellen erfolgte erstmals in dieser Arbeit und wurde bestätigt für die RAW264.7-Zellen. Das erwartete murine NOD1-PCR-Produkt war 469 bp und das murine NOD2-PCR-Produkt war 515 bp lang (Abb. 37).

Die humane NOD1- und NOD2-Expression in epithelialen LoVo-Zellen erfolgte erstmals in dieser Arbeit. Ebenfalls erfolgreich war der Expressionsnachweis in der humanen makrophagenähnlichen THP-1s-Zelllinie. Das erwartete humane NOD1-PCR-Produkt war 592 bp und das humane NOD2-PCR-Produkt war 319 bp lang (Abb. 38).

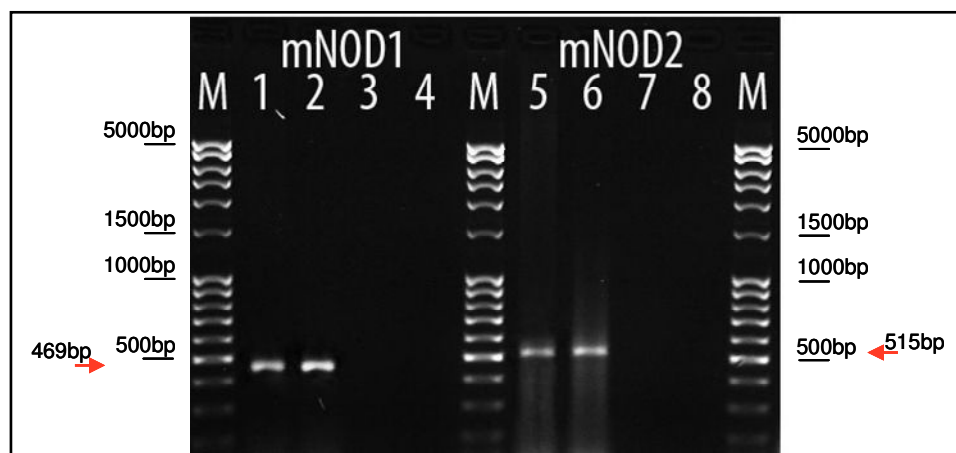


Abb. 37 Darstellung der Expression von murinen NOD1 und NOD2

Die PCR erfolgte für murines NOD1 (mNOD1) mit einer Primeranlagerungstemperatur von 59 °C und 30 Zyklen, das erwartete Produkt war 469 bp lang. Für das murine NOD2 (mNOD2) wurde eine Primeranlagerungstemperatur von 58 °C und 30 Zyklen verwendet (Produktlänge 515 bp).

Nr. 1, 5 = MODE-K; Nr. 2, 6 = RAW264.7, Nr. 3, 7 = Leerwertkontrolle der PCR; Nr. 4, 8 = Negativkontrolle der Agarosegelelektrophorese; M = 100 bp-DNA-Leiter *extended* (100-5000 bp, Roth)

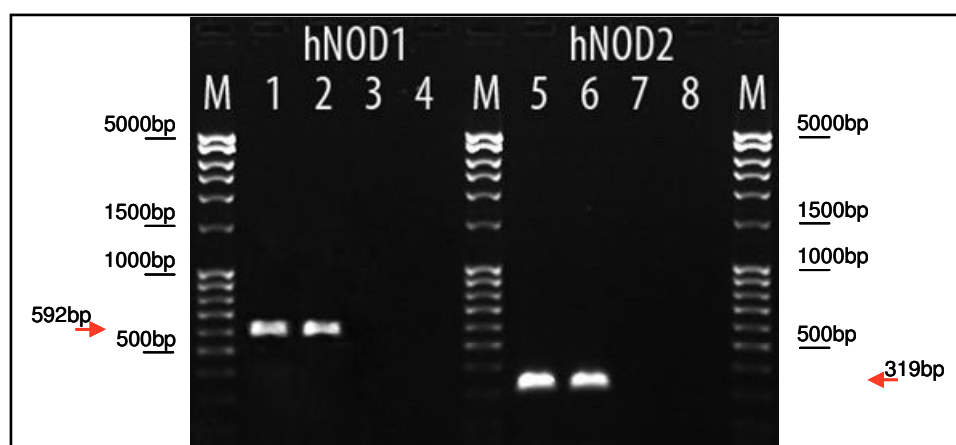


Abb. 38 Darstellung der Expression von humanem NOD1 und NOD2

Die PCR erfolgte für humanes NOD1 (hNOD1) mit einer Primeranlagerungstemperatur von 58 °C und 30 Zyklen, das erwartete Produkt war 592 bp lang. Für das humane NOD2 (hNOD2) wurde eine Primeranlagerungstemperatur von 57 °C und 30 Zyklen verwendet (Produktlänge 319 bp).

Nr. 1, 5 = THP-1s; Nr. 2, 6 = LoVo; Nr. 3, 7 = Leerwertkontrolle der PCR; Nr. 4, 8 = Negativkontrolle der Agarosegelelektrophorese; M = 100 bp-DNA-Leiter *extended* (100-5000 bp, Roth)

4.8 Untersuchung der porcinen NOD-Sequenz

4.8.1 Das porcine NOD1 und NOD2 sowie die Sequenzvergleiche

Die cDNA für porcines NOD1 (pNOD1) und porcines NOD2 (pNOD2) stammte aus mRNA isoliert vom Dünndarmgewebe eines adulten Schweines. Die Analyse der Primärstrukturen erfolgte mit Hilfe der SMART- und der PSI-BLAST-Software.

(1) Die in dieser Arbeit sequenzierte pNOD1-cDNA umfasste 2862 bp und kodierte für ein 953 Aminosäuren (aa) großes Protein. Strukturell zeigte sich ein Domänenaufbau in sieben C-terminale LRR-Domänen (727-922 aa), einer zentralen NACHT-Domäne (196-368 aa) und einer N-terminalen CARD-Domäne (20-105 aa) (Anhang, Abb. 50). Die vorausgesagte Sekundärstruktur des pNOD1-Proteins wurde im Anhang dargestellt (Abb. 52).

(2) Die pNOD2-cDNA umfasste 3042 bp und kodierte für ein 1013 aa großes Protein. Der strukturelle Domänenaufbau umfasste hier sieben C-terminale LRR-Domänen (759-982aa), eine zentrale NACHT-Domäne (266-436 aa) und zwei N-terminale CARD-Domänen (104-189 aa und 4-94 aa) (Anhang, Abb. 51). Die vorausgesagte Sekundärstruktur des pNOD2-Proteins wurde im Anhang dargestellt (Abb. 53).

Die ermittelten porcinen NOD-Sequenzen (bp und aa) wurden einer Alignierung mit Hilfe des BLAST-Algorithmus unterzogen. Die Alignierung diente dem Vergleich zweier oder mehrerer Sequenzen. Die Ergebnisse des Nukleotid- und Aminosäuresequenzvergleiches von pNOD1 mit dem NOD1 anderer Spezies sowie von pNOD2 mit NOD2 anderer Spezies wurden in den Tabellen 17-20 auf den folgenden Seiten dargestellt. Hierbei wurde anhand der *bit-score* Werte und Kongruenz der Sequenzen deutlich, dass die porcinen NOD1- und NOD2-Sequenzen die höchsten Ähnlichkeiten mit den näher verwandten Paar- und Unpaarhufer *Bos taurus*, *Ovis aries* und *Equus caballus* besaßen. Darüber hinaus wiesen sowohl die Aminosäure- als auch die Nukleotidsequenzen auf einen höheren Verwandtschaftsgrad von NOD zwischen *Sus scrofa* und *Homo sapiens* gegenüber *Homo sapiens* und *Mus musculus* hin (Tab. 17-20).

4.8.2 Molekulare Phylogenie von porcinem NOD

Um den Verwandtschaftsgrad der porcinen NOD1- und NOD2-Sequenzen zwischen den verschiedenen Spezies (vor allem des murinen und humanen Systems) aufzuzeigen, wurde ein ungewurzelter phylogenetischer Baum basierend auf den Aminosäuresequenzdaten mittels *Clustering*-Verfahren, hier dem *Neighbor Joining* (NJ) als genetisches Distanzverfahren durchgeführt (Saitou und Nei, 1987).

Zur Darstellung der genetischen Distanzen wurde ein Phylogramm gewählt unter Angabe der errechneten *Bootstrap*-Werte. Das Phylogramm gibt hierbei ein Verzweigungsmuster wieder, wobei die Längen der Äste der molekulargenetischen Distanz entsprechen (Abb. 39, Seite 102).

Tab. 17 Vergleich pNOD1 (diese Arbeit) mit NOD1 anderer Spezies (Teil 1)

Spezies	Nukleotidsequenz			Aminosäuresequenz				Referenz für Nukleotid- und Aminosäuresequenz (NCBI)
	Kongruenz (%) und Anzahl der Basenpaare (bp)	Lücken (% und bp)	bit-score und E-Wert	Kongruenz (%) und Anzahl der Aminosäuren (aa)	Vergleichbarkeit (%), Anzahl der Aminosäuren (aa)	Lücken (% und aa)	bit-score und E-Wert	
<i>Bos taurus</i>	88,73 % (2544 bp/2867 bp)	0,17 % (5 bp/2867 bp)	3705 0,0	88,16 % (841 aa/954 aa)	93,92 % (896 aa/954 aa)	0,11 % (1 aa/954 aa)	1697 0,0	XM_598513.5 XP_598513.3
<i>Equus caballus</i>	88,89 % (2545 bp/2863 bp)	0,07 % (2 bp/2863 bp)	3723 0,0	86,75 % (825 aa/951 aa)	91,90 % (874 aa/951 aa)	0,00 % (0 aa/951 aa)	1680 0,0	XM_001499566.1 XP_001499616.1
<i>Canis familiaris</i>	87,98 % (2518 bp/2862 bp)	0,00 % (0 bp/2862 bp)	3611 0,0	85,10 % (811 aa/953 aa)	91,40 % (871 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1657 0,0	XM_539499.2 XP_539499.2
<i>Homo sapiens</i>	86,78 % (2488 bp/2867 bp)	0,07 % (2 bp/2867 bp)	3454 0,0	83,74 % (798 aa/953 aa)	90,14 % (859 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1620 0,0	NM_006092.2 NP_006083.1
<i>Pan troglodytes</i>	86,50 % (2346 bp/2712 bp)	0,07 % (2 bp/2712 bp)	3234 0,0	81,22 % (774 aa/953 aa)	87,20 % (831 aa/953 aa)	2,94 % (28 aa/953 aa)	1553 0,0	XM_527711.2 XP_527711.2
<i>Pongo abelii</i>	86,40 % (2477 bp/2867 bp)	0,07 % (2 bp/2867 bp)	3406 0,0	83,84 % (799 aa/953 aa)	90,35 % (861 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1624 0,0	XM_002818085.1 XP_002818131.1
<i>Macaca mulatta</i>	86,43 % (2478 bp/2867 bp)	0,07 % (2 bp/2867 bp)	3409 0,0	83,11 % (792 aa/953 aa)	90,35 % (861 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1615 0,0	XM_001085719.2 XP_001085719.1
<i>Callithrix jacchus</i>	85,77 % (2466 bp/2875 bp)	0,49 % (14 bp/2875 bp)	3341 0,0	82,97 % (794 aa/957 aa)	89,66 % (858 aa/957 aa)	0,42 % (4 aa/957 aa)	1603 0,0	XM_002751433.1 XP_002751479.1
<i>Mus musculus</i>	81,17 % (2332 bp/2873 bp)	0,56 % (16 bp/2873 bp)	2708 0,0	79,14 % (755 aa/954 aa)	88,26 % (842 aa/954 aa)	0,21 % (2 aa/954 aa)	1524 0,0	NM_001171007.1 NP_001164478.1
<i>Rattus norvegicus</i>	80,61 % (2312 bp/2868 bp)	0,21 % (6 bp/2868 bp)	2645 0,0	79,64 % (759 aa/953 aa)	88,46 % (843 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1551 0,0	NM_001109236.1 NP_001102706.1
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	85,19 % (2438 bp/2862 bp)	0,00 % (0 bp/2862 bp)	3250 0,0	80,48 % (767 aa/953 aa)	89,82 % (856 aa/953 aa)	0,00 % (0 aa/953 aa)	1561 0,0	XM_002713735.1 XP_002713781.1

Tab. 18 Vergleich pNOD1 (diese Arbeit) mit NOD1 anderer Spezies (Teil 2)

Spezies	Nukleotidsequenz			Aminosäuresequenz				Referenz für Nukleotid- und Aminosäuresequenz (NCBI)
	Kongruenz (%) und Anzahl der Basenpaare (bp)	Lücken (% und bp)	bit-score und E-Wert	Kongruenz (%) und Anzahl der Aminosäuren (aa)	Vergleichbarkeit (%), Anzahl der Aminosäuren (aa)	Lücken (% und aa)	bit-score und E-Wert	
<i>Taeniopygia guttata</i>	66,40 %	1,66 %	340	64,68 % (606 aa/937 aa)	81,32 % (742 aa/937 aa)	0,75 % (7 aa/937 aa)	1274 0,0	XM_002196284.1 XP_002196320.1
	(840 bp/1265 bp)	(21 bp/1265 bp)	0,0					
	73,89 % (696 bp/942 bp)	0,85 % (8 bp/942 bp)	589 0,0					

Tab. 19 Vergleich pNOD2 (diese Arbeit) mit NOD2 anderer Spezies (Teil1)

Spezies	Nukleotidsequenz			Aminosäuresequenz				Referenz für Nukleotid- und Aminosäuresequenz (NCBI)
	Kongruenz (%) und Anzahl der Basenpaare (bp)	Lücken (% und bp)	bit-score und E-Wert	Kongruenz (%) und Anzahl der Aminosäuren (aa)	Vergleichbarkeit (%), Anzahl der Aminosäuren (aa)	Lücken (% und aa)	bit-score und E-Wert	
<i>Bos taurus</i>	87,36 % (2661 bp/3046 bp)	0,00 % (0 bp/3046 bp)	3757 0,0	85,88 % (870 aa/1013 aa)	91,61 % (928 aa/1013 aa)	0,00 % (0 aa/1013 aa)	1750 0,0	NM_001002889.1 NP_001002889.1
<i>Canis familiaris</i>	85,42 % (2537 bp/2970 bp)	0,00 % (0 bp/2970 bp)	3404 0,0	82,93 % (821 aa/990 aa)	89,60 % (887 aa/990 aa)	0,00 % (0 aa/990 aa)	1640 0,0	XM_544412.2 XP_544412.2
<i>Ovis aries</i> (partiell)	85,87 % (1373 bp/1599 bp)	0,00 % (0 bp/1599 bp)	1884 0,0	85,43 % (340 aa/398 aa)	92,21 % (367 aa/398 aa)	0,00 % (0 aa/398 aa)	707 0,0	AM932877.1 CAP69986.1 und CAP69987.1
	87,23 % (1045 bp/1198 bp)	0,00 % (0 bp/1198 bp)	1474 0,0	84,18 % (447 aa/531 aa)	88,51 % (470 aa/531 aa)	0,00 % (0 aa/531 aa)	1884 0,0	
<i>Homo sapiens</i>	84,69 % (2622 bp/3096 bp)	2,97 % (92 bp/3096 bp)	3007 0,0	81,64 % (827 aa/1013 aa)	90,03 % (912 aa/1013 aa)	0,00 % (0 aa/1013 aa)	1684 0,0	NM_022162.1 NP_071445.1
<i>Pan troglodytes</i>	84,35 % (2566 bp/3042 bp)	0,00 % (0 bp/3042 bp)	3341 0,0	81,94 % (830 aa/1013 aa)	90,43 % (916 aa/1013 aa)	0,00 % (0 aa/1013 aa)	1690 0,0	NM_001105240.1 NP_001098710.1

Tab. 20 Vergleich pNOD2 (diese Arbeit) mit NOD2 anderer Spezies (Teil2)

Spezies	Nukleotidsequenz			Aminosäuresequenz)				Referenz für Nukleotid- und Aminosäuresequenz (NCBI)
	Kongruenz (%) und Anzahl der Basenpaare (bp)	Lücken (% und bp)	bit-score und E-Wert	Kongruenz (%) und Anzahl der Aminosäuren (aa)	Vergleichbarkeit (%), Anzahl der Aminosäuren (aa)	Lücken (% und aa)	bit-score und E-Wert	
<i>Macaca mulatta</i>	84,09 % (2563 bp/3048 bp)	0,20 % (6 bp/3048 bp)	3306 0,0	81,15 % (822 aa/1013 aa)	89,64 % (908 aa/1013 aa)	0,00 % (0 aa/1013 aa)	1671 0,0	XM_001084287.2 XP_001084287.1
<i>Mus musculus</i>	78,36 % (2394 bp/3055 bp)	0,59 % (18 bp/3055 bp)	2482 0,0	76,60 % (776 aa/1013 aa)	86,18 % (873 aa/1013 aa)	0,00 % (0 aa/1013 aa)	1550 0,0	NM_145857.2 NP_665856.2
<i>Rattus norvegicus</i>	78,11 % (2195 bp/2810 bp)	0,46 % (13 bp/2810 bp)	2266 0,0	77,49 % (723 aa/933 aa)	86,17 % (804 aa/933 aa)	0,11 % (1 aa/933 aa)	1463 0,0	NM_001106172.1 NP_001099642.1
<i>Monodelphis domestica</i>	70,29 % (2127 bp/3026 bp)	0,83 % (25 bp/3026 bp)	1346 0,0	66,57 % (675 aa/1014 aa)	79,98 % (811 aa/1014 aa)	0,30 % (3 aa/1014 aa)	1365 0,0	XM_001371542.1 XP_001371579.1
<i>Ictalurus punctatus</i> (partiell)	64,97 % (445 bp/685 bp)	0,59 % (4 bp/685 bp)	140 0,0	45,98 % (257 aa/559 aa)	62,08 % (347 aa/559 aa)	7,87 % (44 aa/559 aa)	474 0,0	FJ004845.1 ACM45225.1
<i>Danio rerio</i>	65,91 % (379 bp/575 bp) 66,15 % (215 bp/325 bp)	0,00 % (0 bp/575 bp) 1,23 % (4 bp/325 bp)	154 0,0 77 0,0	46,40 % (470 aa/1013 aa)	61,90 % (627 aa/1013 aa)	6,22 % (63 aa/1013 aa)	855 0,0	XM_692832.4 XP_697924.3
<i>Takifugu rubripes</i>	67,28 % (218 bp/324 bp) 74,81 % (101 bp/135 bp)	0,00 % (0 bp/324 bp) 2,96 % (4 bp/135 bp)	107 0,0 86 0,0	43,72 % (449 aa/1027 aa)	60,57 % (622 aa/1027 aa)	5,06 % (52 aa/1027 aa)	810 0,0	NM_001042448.1 NP_001035913.1

Der ungewurzelte phylogenetische Baum zur Darstellung der genetischen Distanzen gibt ein Verzweigungsmuster wieder. Die Längen der Äste entsprechen der molekulargenetischen Distanz, somit sind die Abstände zwischen den Spezies ein Maß für den Grad der Verwandtschaft. Die errechneten und dargestellten *Bootstrap*-Werte hingegen stellen die Wahrscheinlichkeit dar, dass das hier gezeigte Verzweigungsmuster der Wahrheit entspricht (100 = sehr wahrscheinlich; 0 = sehr unwahrscheinlich).

Die phylogenetischen Untersuchungen zeigten einen hohen Verwandtschaftsgrad von porcinen NOD1 zu humanen NOD1 und porcinen NOD2 zu humanen NOD2 (Abb. 39).

Darüber hinaus wurden die molekulargenetischen Distanzen zwischen den Spezies berechnet. Die molekulargenetischen Distanz von NOD1 zwischen Maus und Schwein lag bei 0,2386, zwischen Maus und Mensch bei 0,2250 und zwischen Mensch und Schwein bei 0,1788. Die molekulargenetischen Distanzen von NOD2 zwischen Maus und Schwein lagen bei 0,2933, zwischen Maus und Mensch 0,3056 und zwischen Mensch und Schwein 0,2295. Alle ermittelten molekulargenetischen Distanzen zwischen den Spezies für NOD1 und NOD2 wurden in den Tabelle 21 und 22 auf den folgenden Seiten dargestellt.

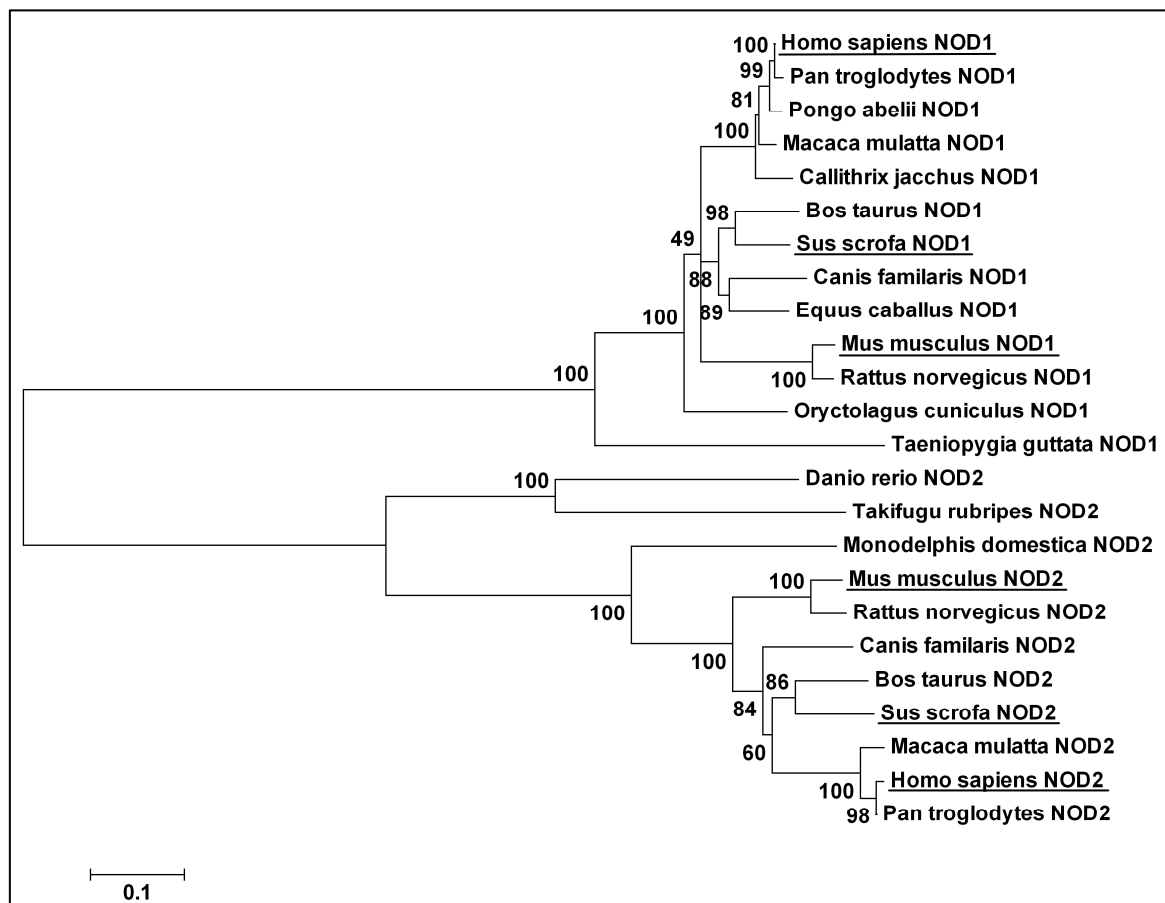


Abb. 39 Phylogenetischer Baum von NOD1 und NOD2

Der dargestellte ungewurzelte phylogenetische Baum basiert auf der Aminosäuresequenz von NOD1 und NOD2 (Multiple Sequenzalignierung mittels ClustalW). Die *Bootstrap*-Werte (in %) stehen für die Höhe der errechneten Wahrscheinlichkeit des phylogenetischen Baumes (1000 *Bootstrap*-Rechenkreisläufe). Die Skala gibt Hinweise zum Verwandtschaftsgrad zwischen den beobachteten Spezies (molekulargenetische Distanz).

Tab. 21 Darstellung der molekulargenetischen Distanzen für NOD1

Der Verwandtschaftsgrad der NOD1-Sequenz wurde basierend auf den Aminosäuresequenzdaten mittels *Clustering*-Verfahren, hier dem *Neighbor Joining* (NJ) als genetisches Distanzverfahren durchgeführt (Saitou und Nei, 1987). Die ermittelten molekulargenetischen Distanzen zwischen den Spezies sind im Folgenden dargestellt. Hierbei wurden die Spezies Schwein, Maus und Mensch fett markiert.

	<i>Sus scrofa</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes</i>	<i>Pongo abelii</i>	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Taeniopygia guttata</i>
<i>Sus scrofa</i>	-	0,1265	0,1529	0,1700	0,1788	0,1883	0,1830	0,1813	0,1905	0,2386	0,2388	0,2241	0,5799
<i>Bos taurus</i>		-	0,1620	0,1791	0,1879	0,1974	0,1921	0,1904	0,1996	0,2477	0,2479	0,2332	0,5890
<i>Equus caballus</i>			-	0,1467	0,1747	0,1842	0,1789	0,1772	0,1864	0,2345	0,2347	0,2200	0,5158
<i>Canis familiaris</i>				-	0,1918	0,2013	0,1960	0,1943	0,2035	0,2516	0,2518	0,2371	0,5329
<i>Homo sapiens</i>					-	0,0095	0,0188	0,0367	0,0589	0,2250	0,2252	0,2105	0,5063
<i>Pan troglodytes</i>						-	0,0283	0,0462	0,0684	0,2345	0,2347	0,2200	0,5158
<i>Pongo abelii</i>							-	0,0409	0,0631	0,2292	0,2294	0,2147	0,5105
<i>Macaca mulatta</i>								-	0,0614	0,2275	0,2277	0,2130	0,5088
<i>Callithrix jacchus</i>									-	0,2367	0,2369	0,2222	0,5180
<i>Mus musculus</i>										-	0,0472	0,2573	0,5531
<i>Rattus norvegicus</i>											-	0,2575	0,5533
<i>Oryctolagus cuniculus</i>												-	0,5232
<i>Taeniopygia guttata</i>													-

Tab. 22 Darstellung der molekulargenetischen Distanzen für NOD2

Der Verwandtschaftsgrad der NOD2-Sequenz wurde basierend auf den Aminosäuresequenzdaten mittels *Clustering*-Verfahren, hier dem *Neighbor Joining* (NJ) als genetisches Distanzverfahren durchgeführt (Saitou und Nei, 1987). Die ermittelten molekulargenetischen Distanzen zwischen den Spezies sind im Folgenden dargestellt. Hierbei wurden die Spezies Schwein, Maus und Mensch fett markiert.

	<i>Sus scrofa</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Pan troglodytes</i>	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Takifugu rubripes</i>
<i>Sus scrofa</i>	-	0,1619	0,2150	0,2295	0,2212	0,2297	0,2933	0,2987	0,5057	0,9526	1,0093
<i>Bos taurus</i>		-	0,2063	0,2208	0,2125	0,2210	0,2846	0,2900	0,4970	0,9439	1,0006
<i>Canis familiaris</i>			-	0,2273	0,2190	0,2275	0,2677	0,2731	0,4801	0,9270	0,9837
<i>Homo sapiens</i>				-	0,0089	0,0510	0,3056	0,3110	0,5180	0,9649	1,0130
<i>Pan troglodytes</i>					-	0,0427	0,2973	0,3027	0,5097	0,9566	1,0047
<i>Macaca mulatta</i>						-	0,3058	0,3112	0,5182	0,9651	1,0218
<i>Mus musculus</i>							-	0,0722	0,4730	0,9199	0,9766
<i>Rattus norvegicus</i>								-	0,4784	0,9253	0,9820
<i>Monodelphis domestica</i>									-	0,9159	0,9726
<i>Danio rerio</i>										-	0,5695
<i>Takifugu rubripes</i>											-

4.8.3 Untersuchung der porcinen NOD1- und NOD2-Domänenstruktur

Neben der Alignierung mit anderen Spezies wurden die ermittelten porcinen Sequenzen auch mit den bestehenden porcinen Sequenzen aus der Datenbank NCBI verglichen.

(1) Hierbei zeigte die Untersuchung der Nukleotidsequenz von pNOD1 (diese Arbeit) mit dem porcinen NOD1 aus der Datenbank NCBI (AB187219.1) (Tohno *et al.*, 2008b), dass es insgesamt acht veränderte Basenpaarungen zwischen beiden Sequenzen gab. Die Nukleotidsequenzen besaßen eine Kongruenz von 99,69 % (2870bp/2879bp). Es wurden keine Lücken in der Sequenz gefunden (0bp/2879bp). Der *bit-score* Wert betrug 5151 und der E-Wert 0,0 (Anhang, Abb. 50). Von diesen acht veränderten Nukleotidbasen führten jedoch nur fünf zu einem veränderten Aminosäureeinbau im pNOD1-Protein. Der Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen pNOD1 (diese Arbeit) und porcinem NOD1 aus der Datenbank NCBI (BAG12313.1) wies einen veränderten Aminosäureeinbau an den Positionen 13.aa, 649.aa, 693.aa, 756.aa und 920.aa auf (Abb. 40). Die Aminosäuresequenzen besaßen eine Kongruenz von 99,48 % (948aa/953aa). Es wurden keine Lücken in der Sequenz gefunden (0aa/953aa). Der *bit-score* Wert betrug 1948 und der E-Wert 0,0. Die Aminosäuren an den Positionen 756.aa und 920.aa des porcinen NOD1 (eigene Arbeit) stellen eine veränderte Aminosäure im Vergleich zum porcinen NOD1 aus der Datenbank NCBI dar und betreffen die 2. und 7. LRR-Domäne (Abb. 40 und 43).

(2) Der Vergleich der Nukleotidsequenz zwischen pNOD2 (diese Arbeit) und porcinem NOD2 aus der Datenbank NCBI (AB195466.1) (Tohno *et al.*, 2008a) zeigte keine veränderten Basen. Die Nukleotidsequenzen besaßen eine Kongruenz von 100,00 % (3057bp/3057bp). Es wurden keine Lücken in der Sequenz gefunden (0bp/3057bp). Der *bit-score* Wert betrug 5646 und der E-Wert 0,0 (Anhang, Abb. 51).

Des Weiteren wurde der strukturelle Domänenaufbau aus mehreren C-terminalen LRR-Domänen, einer zentralen NACHT-Domäne und eins bis zwei N-terminalen CARD-Domänen von porcinem NOD1 und porcinem NOD2 im Vergleich zu den NOD-Proteinen anderer Spezies untersucht und graphisch dargestellt (Abb. 41 und 42).

(1) Hierbei zeigte sich, dass die sieben LRR-Domänen vom pNOD1, essentiell für die Erkennung von PGN, hohe Homologien zu anderen Spezies besaßen (Abb. 41). Eine Ausnahme war hierbei das bovine NOD1 mit insgesamt acht LRR-Domänen. Da *Sus scrofa* und *Bos taurus* beide phylogenetisch zur Ordnung der Paarhufer gehören, war dieser LRR-Domänenunterschied nicht zu erwarten. Es existierten keine veröffentlichten NOD-Sequenzen von weiteren Paarhufern, somit konnte der Aufbau der LRR-Domänen in dieser Ordnung nicht näher betrachtet werden (Abb. 41).

(2) Die sieben LRR-Domänen des porcinen NOD2 als auch das NOD2 der Primaten und das humane NOD2 zeigten eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Die bovinen und murinen NOD2-Sequenzen besaßen hingegen acht LRR-Domänen (Abb. 42).

4. Ergebnisse

Porcine (1)	1	MEKQGRSENEVAL ES ESHSYIKLLKVNREHLVTHIRNTQCLVDNLLHNDYFSAEDAEIVCA	60
Porcine (2)	1	MEKQGRSENEVAL ES ESHSYIKLLKVNREHLVTHIRNTQCLVDNLLHNDYFSAEDAEIVCA	60
Porcine (1)	61	GPTQPKVRRVLDLVQSKGEEVSEFFVFLVQLQADAVVDLRPWLAEIGFSPSQLVQSKAV	120
Porcine (2)	61	GPTQPKVRRVLDLVQSKGEEVSEFFVFLVQLQADAVVDLRPWLAEIGFSPSQLVQSKAV	120
Porcine (1)	121	VNTDPVSRYSQKLRHQGRDSKFLICYAÇKEELLEENYTDTIMELVDFGNEISLGSVGS	180
Porcine (2)	121	VNTDPVSRYSQKLRHQGRDSKFLICYAÇKEELLEENYTDTIMELVDFGNEISLGSVGS	180
Porcine (1)	181	ACLLDPSTGVLNKEGETIFIFGDAGVGKSMLLQRLQSLWASQQLDPGLKFFHFRCRMFS	240
Porcine (2)	181	ACLLDPSTGVLNKEGETIFIFGDAGVGKSMLLQRLQSLWASQQLDPGLKFFHFRCRMFS	240
Porcine (1)	241	CFKESATLCLQDLLFKHYCFPEQDPPEEVFTFLLRFPHTALFTFDGLDELHSDFDLSGEPD	300
Porcine (2)	241	CFKESATLCLQDLLFKHYCFPEQDPPEEVFTFLLRFPHTALFTFDGLDELHSDFDLSGEPD	300
Porcine (1)	301	TSSPWEFAHPLALLANLLSKLLKGARKLLTARTGVEIPRQLLUKKVLLRGSFSPSHLRAF	360
Porcine (2)	301	TSSPWEFAHPLALLANLLSKLLKGARKLLTARTGVEIPRQLLUKKVLLRGSFSPSHLRAF	360
Porcine (1)	361	TRRNFFPERAVRQRLLDQLEANPNLCSLCAVPLFCWIIFRCFQHFHDAFDSSLQLPDRVT	420
Porcine (2)	361	TRRNFFPERAVRQRLLDQLEANPNLCSLCAVPLFCWIIFRCFQHFHDAFDSSLQLPDRVT	420
Porcine (1)	421	LTDVFLLVTEVHLNRTQFTSLVQRNTRSQTETFRAGQGTLRSLGQVARUGMERSLFLFNQ	480
Porcine (2)	421	LTDVFLLVTEVHLNRTQFTSLVQRNTRSQTETFRAGQGTLRSLGQVARUGMERSLFLFNQ	480
Porcine (1)	481	EEVQASEVQEGDLQGLFRAVPELGLGGDQOSTEFLHLTLQAFFAALFLVVDVSVGPQEL	540
Porcine (2)	481	EEVQASEVQEGDLQGLFRAVPELGLGGDQOSTEFLHLTLQAFFAALFLVVDVSVGPQEL	540
Porcine (1)	541	LRFFQEVVPPGEAEAASCFPLPFGQCLGGRGLVGEDPFKNKDHFFHTNLFLCGLLSKGG	600
Porcine (2)	541	LRFFQEVVPPGEAEAASCFPLPFGQCLGGRGLVGEDPFKNKDHFFHTNLFLCGLLSKGG	600
Porcine (1)	601	QKLLRHLVPAITLRRKRKALWAHLFSSLSRSHLKNLPRVQSGGFSQVQ LP TFIWHLRCIY	660
Porcine (2)	601	QKLLRHLVPAITLRRKRKALWAHLFSSLSRSHLKNLPRVQSGGFSQVQ LP TFIWHLRCIY	660
Porcine (1)	661	ETQSEKVGQLAARGICANYLKLTPCNACSA DC ALSFVLHFRKQLALDLDNMINLNDYGV	720
Porcine (2)	661	ETQSEKVGQLAARGICANYLKLTPCNACSA DC ALSFVLHFRKQLALDLDNMINLNDYGV	720
Porcine (1)	721	RELQPCFSRLTVIRLSVNQITDSGVKVLYEELTK IK IVTFLGLYNNQITDVGARYVARIL	780
Porcine (2)	721	RELQPCFSRLTVIRLSVNQITDSGVKVLYEELTK IK IVTFLGLYNNQITDVGARYVARIL	780
Porcine (1)	781	DECKGLKCLKLGNKITSEGGKCLARAVENSRSIFEVGMVGNQIGDEGAKAF AEAALRNHF	840
Porcine (2)	781	DECKGLKCLKLGNKITSEGGKCLARAVENSRSIFEVGMVGNQIGDEGAKAF AEAALRNHF	840
Porcine (1)	841	SLTNLSLAFNGISTEGGESLAQALQQNASLRIFWLTQNELDDEVAESLAENLKVNQTLKH	900
Porcine (2)	841	SLTNLSLAFNGISTEGGESLAQALQQNASLRIFWLTQNELDDEVAESLAENLKVNQTLKH	900
Porcine (1)	901	LWLIQNQITARGTARLAD AL QMNNTGIMEICLNGNLIKFEEAKVFDEKRIYCF	953
Porcine (2)	901	LWLIQNQITARGTARLAD AL QMNNTGIMEICLNGNLIKFEEAKVFDEKRIYCF	953

Abb. 40 Darstellung des Aminosäuresequenzvergleiches vom porcinen NOD1

Unterschiede in den Proteinsequenzen zwischen pNOD1 (diese Arbeit (1)) und pNOD1 aus der NCBI-Datenbank (BAG12313.1 (2)) wurden farblich hervorgehoben. Von diesen veränderten Aminosäuren sind es vor allem die an Position 756.aa und 920.aa welche einen Einfluss auf die Funktionalität des NOD1 ausüben könnten, da sie sich im Bereich der LRR-Domänen des pNOD1-Proteins befinden.

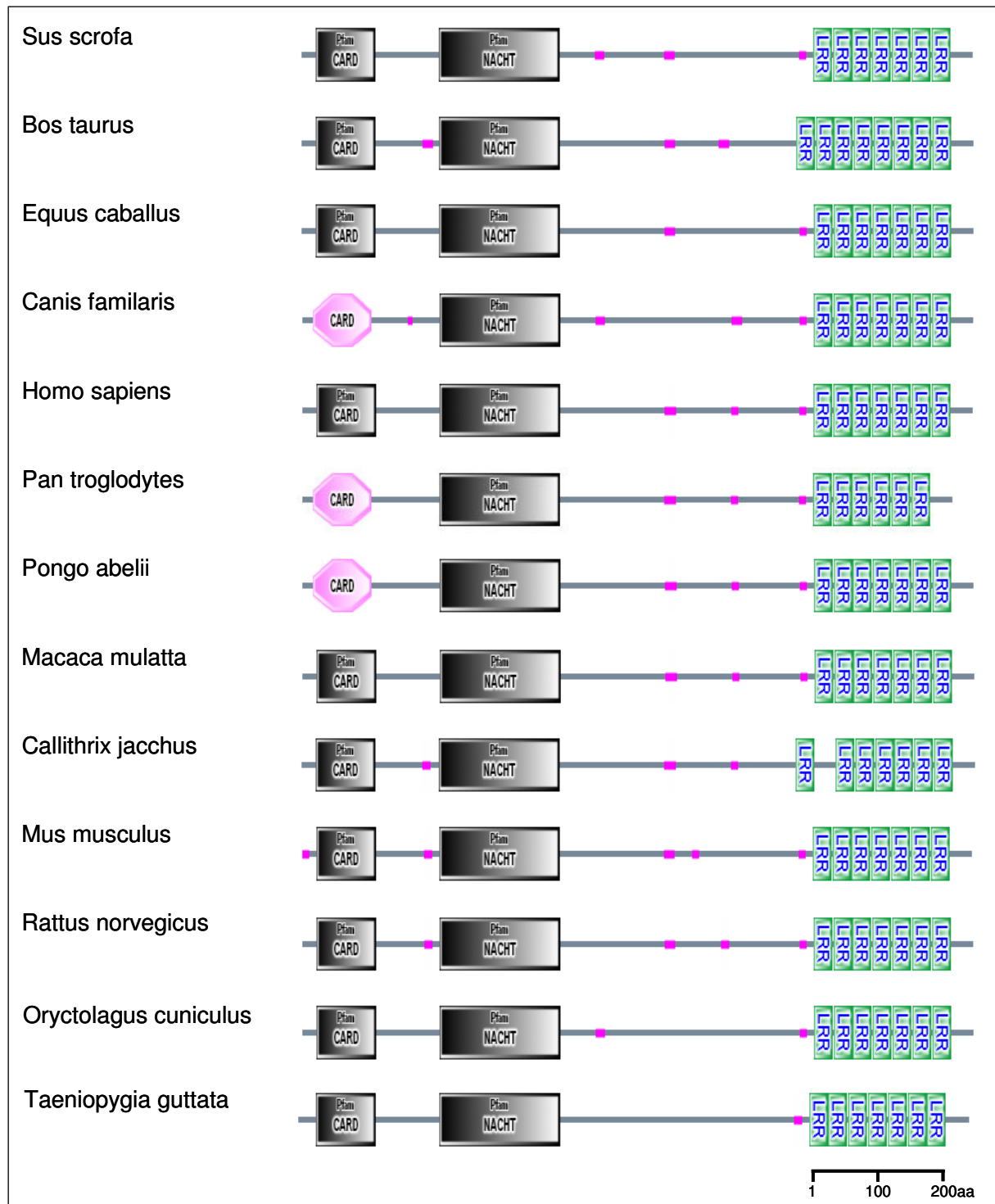


Abb. 41 Darstellung der Architektur des NOD1-Proteins von verschiedenen Spezies.

Die SMART-Software erstellte auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Proteinarchitektur. Die pNOD1-Struktur (diese Arbeit) wurde hier mit der NOD1-Struktur von verschiedenen Spezies verglichen. Vor allem die LRR-Domänen zeigten deutliche Unterschiede im Aufbau und der Zusammensetzung.

Segmente mit geringer Komplexität wurden mit markiert. Die dargestellte Skalierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren (aa).

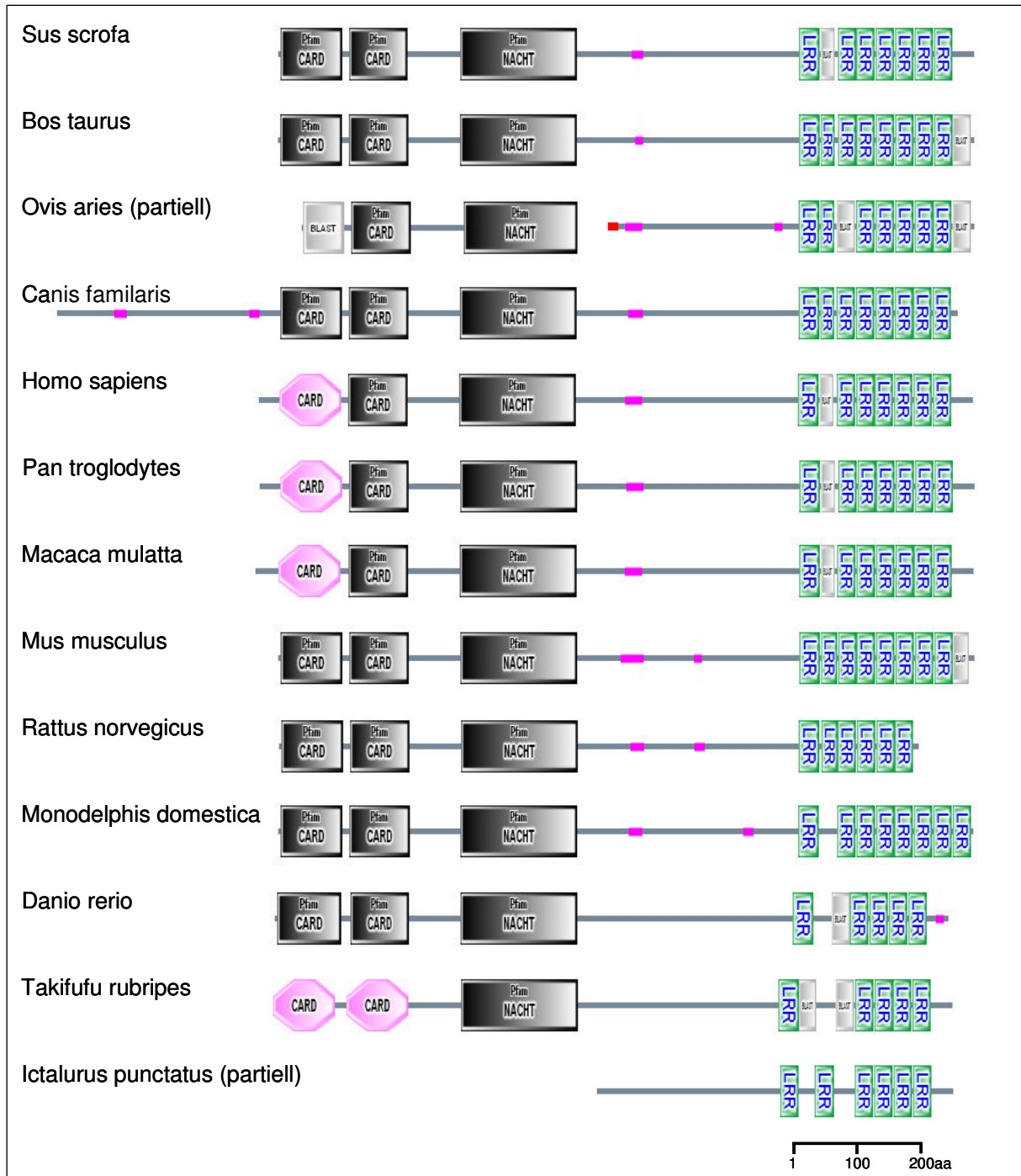


Abb. 42 Darstellung der Architektur des NOD2-Proteins von verschiedenen Spezies.

Die SMART-Software erstellte auf Grundlage der Aminosäuresequenz eine Proteinarchitektur. Die pNOD2-Struktur (diese Arbeit) wurde mit NOD2-Struktur von verschiedenen Spezies verglichen. Vor allem die LRR-Domänen zeigten deutliche Unterschiede im Aufbau und der Zusammensetzung. Segmente mit geringer Komplexizität wurden mit markiert. Die dargestellte Skalierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren (aa).

Die sieben LRR-Domänen von pNOD1 und pNOD2 besaßen folgende Konsensussequenz: xxxLxxLxLxxNxLxxxgoxxLxxoLxx (Kajava, 1998; Kobe und Kajava, 2001) und gehören somit zu den RI-ähnlichen LRR-Domänen. Die LRR-Domänen der porcinen NOD-Proteine wurden in der Aminosäuresequenz dargestellt (Zahlen entsprechen hierbei der Position der Aminosäure im Protein). Hierbei wurde deutlich, dass pNOD1 sieben hintereinander gelegene RI-ähnliche LRR-Domänen aufwies. Porcines NOD2 hingegen besaß zwar ebenfalls sieben RI-ähnliche LRR-Domänen, hierbei bildeten die Aminosäuren zwischen der Position 791-811 keine funktionelle LRR-Domäne (Abb. 43).

Somit war der strukturelle Aufbau der LRR-Domäne vom porcinen NOD2 und dem humanen NOD2 sehr ähnlich (Abb. 41 und 42).

LRR-Domänen des porcinen NOD1

727	FSRLTVIRLSVNQITDSGVKVL YEEL TK	754
755	YKIVTF LGLYNNQITDVGARYVARIL DE	782
783	CKGLKCLKLGKNKITSEGGKCLARAVKN	810
811	SRSIFEVGMWGNQIGDEGAKAF AEALRN	838
839	HPSLTNLSLAFNGISTEGGKSLAQALQQ	866
867	NASLRI FWLTQNELDDEVAESLAEM LKV	894
895	NQTLKHLWLIQNQITARGTARLADAIQN	922
	xxxLxxLxLxxNxLxxxgoxxLxxoLxx	(RI-ähnliche LRR-Domäne (Kajava, 1998))

LRR-Domänen des porcinen NOD2

759	LRHLQWPVALQLDHNSVGDIGVEQLLPCLN	789
791	KALYLRDNNISDRGFCKLVEH	811
815	CEQLQKLALFNKLTGCAHSMARLLAC	842
843	KRNFLALRLGNHFTAVGAQVLAQGLRA	870
871	NTPLQFLGFWGNQVGDKGAQALAEALRD	898
899	NQSLKWL SLVGN NIGSVGAQALALMLEK	926
927	NMALEELCLEENHVQDEGVCSLARGLER	954
955	NSSLKVLKLSNNHVTSRGAEALLQALEQ	982
	xxxLxxLxLxxNxLxxxgoxxLxxoLxx	(RI-ähnliche LRR-Domäne (Kajava, 1998))

Abb. 43 Darstellung der porcinen NOD1- (oben) und NOD2-Aminosäuresequenz (unten) der LRR-Domänen

Die sieben RI-ähnlichen LRR-Domänen wurden der Konsensussequenz nach Kajava, 1998 gegenübergestellt (rot-markierte Aminosäuren). Die LRR-Region des porcinen NOD2 (eigene Arbeit) war dem strukturellen Aufbau des humanen NOD2 ähnlich. Darüber hinaus stellte die Aminosäure an Position 756 und 920 von porcinem NOD1 eine veränderte Aminosäure im Vergleich zum porcinen NOD1 aus der Datenbank NCBI (BAG12313.1) dar.

Darüber hinaus wurde für humanes NOD1 die Aminosäuren an Position 816-844 als essentielle Struktur für die Detektion von DAP-Tetrapeptiden beschrieben (Girardin *et al.*, 2005). Beim Vergleich der porcinen NOD1-LRR-Sequenz dieser Arbeit und der humanen NOD1-LRR-Sequenz zeigte sich, dass sich beide Spezies an der Position 824.aa und 844.aa unterschieden, dies entspricht der 4. und 5. LRR-Domäne (Abb. 43 und 44).

porcines NOD1	816aa	EVGMWGNQIGDEGAKAF AEALRN HPSLTN	844aa
humanes NOD1	816aa	EVGMWGNQVGDEGAKAF AEALRN HPSLT T	844aa

Abb. 44 Unterschiede in der LRR-Domäne von porcinem NOD1 und humanem NOD1

Der Vergleich der porcinen NOD1-Sequenz dieser Arbeit und der humanen NOD1-Sequenz zeigte einen Unterschied an der Position 824.aa und 844.aa zwischen beiden Spezies, dies entspricht der 4. und 5. LRR-Domäne.

5. Diskussion

S. Enteritidis und *S. Typhimurium* machten zusammen 79,9 % aller nachgewiesenen Serovaren bei humanen *Salmonella*-Erkrankungen 2008 in Europa aus. Die Dominanz dieser nicht-wirtsadaptierten Serovaren im Menschen korreliert mit ihrem gesteigerten Vorkommen in Lebensmittelprodukten (EFSA Journal 2010). Die Evolution von wirtsspezifischen und auch wirtsadaptierten Serovaren korreliert wiederum mit einer gesteigerten Pathogenität der Erreger für den jeweiligen Wirt (Baumler *et al.*, 1998). Die biologische Grundlage jedoch, welche dieser Spezialisierung zu Grunde liegt, blieb bislang ungeklärt. Ursache hierfür ist auch die geringe Anzahl an Untersuchungen zur Pathogenese von wirtsspezifischen, wirtsadaptierten und nicht-wirtsadaptierten Salmonellen in anderen Tiermodellen als der Maus. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die *in vitro* Interaktion von wirtsadaptierten und nicht-wirtsadaptierten Serovaren in je zwei Zellarten aus drei untersuchten Wirtsmodellen untersucht.

5.1 Die Rolle der *Salmonella*-Wachstumskurven

Das mikrobielle Wachstum unterteilt sich in die lag-Phase, die Phase des beschleunigten Wachstums, die log-Phase, die Phase des limitierten Wachstums, die stationäre Phase und in die Absterbephase. In dieser Arbeit wurde die Zeitspanne bis zum Erreichen der OD₆₀₀ 2,2, also kurz vor der spätlogarithmischen Wachstumsphase in LB-Medium, ermittelt. Die OD₆₀₀ 2,2 in LB-Medium wurden nach 210-290min erreicht, hierbei zeigten die Serovaren *S. Enteritidis* und *S. Dublin* eine geringere Verdopplungszeit und erreichten somit die OD₆₀₀ 2,2 in einer kürzeren Zeitspanne. Die Zeit bis zum Erreichen dieser spätlogarithmischen Wachstumsphase war unabhängig vom Wachstumsmedium (LB- oder Zellkulturmedium). Die Serovaren erreichten jedoch im Zellkulturmedium zeitlich später die stationäre Phase. Des Weiteren wurden Unterschiede in der bakteriellen Dichte bei der stationären Wachstumsphase festgestellt. Die bakteriellen Wachstumsphasen werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, hierzu zählen der pH-Wert, das Vorhandensein von Nährstoffen, Metaboliten, Ionen, Sauerstoff und Wasser, die Temperatur sowie Umweltstressoren (Gibson *et al.*, 1988). Die unterschiedliche Zusammensetzung von DMEM/HAM'S und LB-Medium scheint somit einen Einfluss auf die bakterielle Dichte auszuüben, da zwar die Salmonellen die spätlogarithmische Wachstumsphase zu fast gleichen Zeitpunkten erlangten, aber die Limitation des Wachstums (stationäre Phase) war bei DMEM/HAM'S zeitlich später erreicht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Versorgung mit Nährstoffen und Ionen im LB-Medium für die bakteriellen Wachstumsbedingungen eher gegeben sind. Des Weiteren könnte sich im Verlauf des Wachstums der Abfall des pH-Wertes und die Ansammlung von Metaboliten im DMEM/HAM'S als Wachstumsstress auf die Salmonellen auswirken. Diese Hypothese wird durch Arbeiten um Abe *et al.* (2002) bestätigt. Diese zeigten, dass *E. coli* Erreger eine erhöhte Adhärenz an epithelialen Zellen aufwiesen, wenn sie zuvor in DMEM- im Gegensatz zu LB-Medium angezüchtet wurden. Dieser Effekt war auf die verbesserte Virulenzgenexpression, ausgelöst durch Wachstumsstressoren hier eine erhöhte NaHCO₃-Konzentration, in DMEM-Medium zurückzuführen. Für *Vibrio parahaemolytica* konnte nachgewiesen werden, dass die Virulenzgenexpression bei Wachstum in DMEM ebenfalls

deutlich höher war im Vergleich zum Wachstum in LB-Medium (Zhou *et al.*, 2008). Eine verbesserte Salmonelleninvasivität von in Zellkulturmedium-kultivierten Erregern wurde bisher nicht beschrieben.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wachstumsraten der Salmonellen intrazellulär geringer sind als extrazellulär im Zellkulturmedium. Dies bestätigt die Beobachtungen von Maw und Meynell (1968), welche eine Verdopplungszeit für *S. Typhimurium* in infizierten Mäusen zwischen 5-10h ermittelten. Geringere Wachstumsraten der Salmonellen intrazellulär im Vergleich zum extrazellulären Wachstum wurden auch von Abshire und Neidhardt (1993) sowie Buchmeier und Heffron (1989) beschrieben.

Die Ermittlung der Wachstumskurven in dieser Arbeit war essentiell, da die Wachstumsphase ein bedeutender Faktor für die Invasivität der Salmonellen ist und sie die Expression von Virulenzgenen beeinflusst (Adkins *et al.*, 2006; Guiney *et al.*, 1995). Deshalb wurden in dieser Arbeit alle Salmonellen mit der gleichen optischen Dichte von OD₆₀₀ 2,2 eingesetzt und zuvor eine Wachstumskurve jedes Serovars angefertigt, um den optimalen Zeitpunkt, die späte logarithmische Wachstumsphase, für den Invasionsversuch zu erreichen. Während der frühen log-Phase werden nachweislich keine *spv*-Gene exprimiert. Die Expression von Virulenzgenen ist während der späten log-Phase und der frühen Phase des limitierten Wachstums am höchsten. Die Invasionsraten korrelieren jedoch nicht 100 %ig mit diesen Expressionsraten, so sind die Invasionsraten am höchsten in der spätlogarithmischen Wachstumsphase und fallen in der frühen Phase des limitierten Wachstums und der stationären Wachstumsphase schnell ab (Guiney *et al.*, 1995). Das Salmonellenprotein RpoS¹⁵ reguliert hierbei die Expression von einer Vielzahl von Genen über Einflussfaktoren wie Nährstoffmangel, pH-Wertabfall, oxidativer Stress oder auch über eine gesteigerte Umgebungstemperatur (Fang *et al.*, 1992). Darüber hinaus wird die Genexpression der Salmonellen in den Wirtszellen auch reguliert über die Hitzeschockproteine und Chaperone (GroEL, Dank) sowie über das PhoP-PhoQ-Regulationssystem (Buchmeier und Heffron, 1990; Groisman *et al.*, 1989). Auch der Mangel an Glukose, Stickstoff, Eisen und Phosphat kann die Expression von Virulenzgenen unabhängig von der bakteriellen Dichte beeinflussen (Valone *et al.*, 1993).

5.2 Die Serovare-Bedeutung und die Ergebnisse der *Salmonella*-Infektionsversuche

Salmonelleninfektionen manifestieren sich in drei klinischen Ausprägungsformen: Enteritis, Septikämie und Abort. Diese können allein oder in Kombination auftreten, abhängig vom Serovar und dem betrachteten Wirtssystem. Uzzau *et al.* (2000) unterschieden die Erreger der Gruppe I der *S. enterica* spp. *enterica* in wirtsspezifisch (z. B. *S. Typhi*, *S. Typhisuis*), wirtsadaptiert (z. B. *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*) und nicht-wirtsadaptiert (z. B. *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Einteilung in wirtsspezifisch, wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert in der bestehenden Literatur nicht immer eindeutig und gleichsam genutzt wird. Bei *in vitro* Invasionsstudien steht die Anzahl wiederkultivierbarer, Gentamicin-resistenter Erreger als Anteil des initialen Inokulums für die Invasionsrate (Bolton *et al.*, 1999). *Salmonella*-Infektionsstudien wurden in

¹⁵ rpoS = RNA polymerase sigma factor

den unterschiedlichsten Zellkulturmodellen durchgeführt, eine experimentelle Aussage konnte hierbei nur für die im Versuch verwendeten ein bis zwei Serovare in Korrelation zu meist einem einzigen Zellkulturmodell gegeben werden. Die Möglichkeit eines Erregers, innerhalb der Wirtszellen zu überleben und sich zu replizieren, geht jedoch einher mit dessen Fähigkeit, systemische Infektionen im Wirt auszulösen (Fields *et al.*, 1986). Bolton *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Invasion in Darmepithelien sowohl in M-Zellen als auch in Enterozyten stattfindet. Makrophagen spielen hingegen im Salmonelleninfektionsgeschehen eine bedeutende Rolle, da sie, einmal aktiviert, die Salmonellen abtöten können, aber auch als Transportvehikel zur systemischen Streuung beitragen (Lindgren *et al.*, 1996). Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils vier verschiedene *Salmonella*-Serovare (wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert) mit je zwei bereits etablierten Zellarten (Epithel und Makrophagen) aus je drei verschiedenen Wirtssystemen (Schwein, Maus, Mensch) verwendet.

(1) In der vorliegenden Arbeit waren die porcinen Zellkulturen (IPEC-J2 und 3D4/31) vermehrt mit *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* infiziert. Die Haupterreger der Zoonosen zeigten eine hohe Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate. Im Gegensatz dazu wies die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* eine vergleichbar geringere Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate in porcinen Zellen auf. In dieser Arbeit wurden erstmals porcine 3D4/31 im Invasionsversuch mit den vier Serovaren untersucht. Ebenfalls neu waren die Infektionen von porcinen IPEC-J2 mit *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*. In der vorliegenden Arbeit wurden nach 2h *p. i.* $1,15 \pm 0,09 \times 10^5$ *S. Typhimurium* SL1344 in IPEC-J2-Zellen gefunden. Dies bestätigt die Ergebnisse um Schierack *et al.* (2011), welche zeigten, dass nach 2h *p. i.* $1-2 \times 10^5$ *S. Typhimurium* SL1344 intrazellulär in IPEC-J2-Zellen detektiert wurden (MOI 1). Schmidt *et al.* (2008) demonstrierten hierzu in ihrer Studie, dass sich die Invasivität von *S. Typhimurium* in IPEC-J2-Zellen und porcinen ilealen Explantaten nur geringfügig unterschied. Die in dieser Arbeit gezeigte geringe Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate vom schweineadaptierten Serovar *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen, bestätigt wiederum Versuche von Watson *et al.* (2000a), welche *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* sowohl bei *in vivo* Infektionsstudien als auch in einer primären Alveolarmakrophagen-Zellkultur verglichen. Hierzu wurden die Zellen mit einer MOI 5 ohne zusätzliche Zentrifugation infiziert. *S. Typhimurium* und auch *S. Dublin*, nicht jedoch die wirtsadaptierte Serovar *S. Choleraesuis*, erzeugten eine Zerstörung der porcinen Makrophagenplasmamembran. *S. Choleraesuis* konnte jedoch *in vivo* allein auf der systemischen Seite wieder nachgewiesen werden. Im Gegenzug zeigten die *in vitro* Daten aber, dass *S. Choleraesuis* in deutlich geringeren Mengen im Invasionsversuch in den Makrophagen wieder auffindbar waren. Dies bestätigt wiederum die erhobenen Invasions-Daten aus der vorliegenden Arbeit.

(2) Es wurden erstmals murine MODE-K im Invasionsversuch mit *S. Choleraesuis* und *S. Enteritidis* in dieser Arbeit untersucht. Ebenfalls neu waren die Infektionen von murinen RAW264.7 mit *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*. Die murinen Zellen MODE-K wurden in dieser Arbeit vor allem von *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* infiziert. *S. Typhimurium* besaß hierbei die stärkste intrazelluläre Vermehrungsrate. Nach 2h *p. i.* wurden $41,63 \pm 2,10$ % *S. Typhimurium* und $74,86 \pm 3,45$ % *S. Dublin* intrazellulär in MODE-K-Zellen detektiert. Dem entgegen stehen Ergebnisse um Weinstein *et al.* (1998), welche zeigten, dass nach 1,5h *p. i.* 18 % *S. Typhimurium* und 51 % *S. Dublin* intrazellulär vorkamen. Eine

mögliche Erklärung für diese Infektionsunterschiede sind, trotz gleicher MOI, gleicher Zellkultur, ähnlichem Infektionsprotokoll (Zentrifugationsschritt), die Verwendung von klinischen Isolaten in der Arbeit um Weinstein *et al.* (1998). Bereits 2000 wurde von Carlson *et al.* gezeigt, dass auch hypoinvasive klinische *S. Typhimurium* Serovare vorkommen können. Aufgrund dessen wurden, für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten, in der vorliegenden Arbeit ausschließlich klassifizierte und bereits bekannte Serovare verwendet und keine neu aufgetretenden klinischen Isolate. Dies könnte die Infektionsunterschiede zwischen dieser Arbeit und der Studie um Weinstein *et al.* (1998) erklären.

In der vorliegenden Arbeit waren die murinen RAW264.7 hingegen vermehrt mit *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* infiziert, welche eine hohe Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate zeigten. Im Gegensatz dazu wies die mausadaptierte Serovar *S. Typhimurium* eine vergleichbar geringere Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate in den murinen RAW264.7 auf. Monack *et al.* (1996) konnten hierzu mit *S. Typhimurium* in RAW264.7-Zellen Invasionsraten von ~13-14 % 2h *p. i.* nachweisen, hierbei wurde jedoch eine MOI von 100 gewählt. In der vorliegenden Arbeit konnten 28,68±0,72 % der initialen Inokulummenge aus RAW264.7-Zellen kultiviert werden, obwohl eine MOI von eins verwendet wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Invasionsunterschiede ist, trotz gleicher Zellkultur und ähnlichem Infektionsprotokoll (Zentrifugationsschritt), die Verwendung von in Mäusen passagierten Serovaren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Serovar *S. Typhimurium* SL1344 im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin in Mäusen passagiert, um dessen Virulenz zu erhöhen. Die Steigerung der Virulenz durch das Passagieren *in vivo* wurde bereits Mastroeni *et al.* (2011) belegt. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit in RAW264.7-Zellen durch eine MOI von eins nach der *S. Typhimurium*-, nicht jedoch bei *S. Choleraesuis* Infektion, das Vorhandensein von abgestorbenen Zellen und eine DNA-Defragmentierung nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Arbeiten mit murinen J774A.1-Zellen um Lindgren *et al.* (1996), welche für *S. Typhimurium* zeigten, dass mit einer MOI 100 eine DNA-Fragmentierung und eine morphologische Zytotoxizität nachweisbar waren.

(3) In dieser Arbeit wurden erstmals humane LoVo im Invasionsversuch mit den vier Serovaren untersucht. Ebenfalls neu waren die Infektionen von humanen THP-1 mit *S. Choleraesuis* und *S. Enteritidis*. In dieser Arbeit zeigten die humanen LoVo-Zellen eine erhöhte Invasivität für die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Dublin*. Die stärkste intrazelluläre Vermehrung wiesen jedoch die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* auf. In LoVo-Zellen wurden für die Serovare *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* folgende Invasionsraten 2h *p. i.* gefunden: 122,09±4,61 %, 38,40±0,69 % und 124,11±8,08 %. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Arbeiten um Bolton *et al.* (1999), welche in ihrer Arbeit die Serovare *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* im humanen CaCo-2-Zellkultursystem und einem ilealen Invasionsversuch untersuchten. Sie erhielten folgende Invasionsraten: 100 %, 35 % und 70 % (Anteil der initialen Inokulummenge). Carlson *et al.* (2000) zeigten für verschiedenste *S. Typhimurium* Serovare in HEp-2-Zellen Invasionsraten nach 60min *p. i.* zwischen 20-150 % (MOI 100). Diese Unterschiede in den Invasionsraten könnten auch bedingt sein durch eine veränderte LPS-Zusammensetzung der verwendeten *S. Typhimurium* Isolate. Einen Hinweis hierzu gab die Arbeit um Kihlstrom (1977), hierbei wurden Invasionsunterschiede in HeLa-Zellen durch *S. Typhimurium* Infektionen mit glattem oder rauhem LPS beschrieben.

Die humanen THP-1a- und THP-1s-Zellen zeigten in dieser Arbeit eine vergleichbar hohe Invasivität und intrazelluläre Vermehrungsrate für die Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*. Im Vergleich zu den Suspensionszellen waren die Infektionsraten von den aktivierten, adhärenen THP-1a deutlich höher. In dieser Arbeit wurden erstmals THP-1 als unstimulierte und aktivierte, adhärenente Zellen im Infektionsversuch verglichen. Beispielsweise wurden in der vorliegenden Arbeit 2h *p. i.* $1,46 \pm 0,11 \times 10^5$ *S. Dublin* in THP-1s und $7,82 \pm 0,84 \times 10^5$ *S. Dublin* in THP-1a detektiert. Die hohen Invasionsraten von THP-1a dieser Arbeit bestätigen Versuche von Valle und Guiney (2005), welche zeigten, dass bereits nach 1h *p. i.* $\sim 3 \times 10^6$ *S. Dublin* in THP-1 wieder gefunden wurden. Hierbei wurden PMA-aktivierte THP-1-Zellen mit einer MOI 10 infiziert. Die verbesserte Invasivität in THP-1a-Zellen im Vergleich zu unstimulierten THP-1s betraf in dieser Arbeit vor allem die Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*. Die verbesserte intrazelluläre Vermehrungsrate als Ausdruck der Steigung *m* in THP-1a-Zellen im Vergleich zu THP-1s betraf jedoch die Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Es existieren derzeit keine Literaturquellen zur Beschreibung der unterschiedlichen Invasivität oder der intrazellulären Vermehrungsraten von verschiedenen *Salmonella*-Serovaren in PMA-aktivierten Makrophagen. Musa und Rowley (1990) hingegen untersuchten die bakterizide Wirkung von aktivierten und nicht-aktivierten murinen Makrophagen auf eine *S. Typhimurium* Infektion, eine Aussage zur unterschiedlichen Invasivität wurde nicht gemacht. Darüber hinaus wurden die aktivierten Makrophagen aus *Salmonella*-infizierten Tieren gewonnen und nicht wie in dieser Arbeit durch einen extrazellulären Stimulus *in vitro*. Musa und Rowley (1990) zeigten weiterhin, dass weniger Salmonellen in den aktivierten Makrophagen aufgrund von Komplementfaktoren im Serum überlebten. Dieser Effekt konnte durch hitzeinaktiviertes Serum aufgehoben werden. Da in dieser Arbeit nur hitzeinaktiviertes Serum verwendet wurde, können Komplementfaktoren für die verbesserte Invasivität der Salmonellen für die THP-1a-Zellen ausgeschlossen werden. Demgegenüber stehen Arbeiten um Langermans *et al.* (1990), welche zeigten, dass aktivierte murine Makrophagen keine bakterizide Wirkung und keinen Effekt auf die intrazelluläre Vermehrungsrate nach einer *S. Typhimurium* Infektion aufwiesen. McCollister *et al.* (2005) wiederum demonstrierten, dass aufgrund der verminderten SPI2-Expression, die SCV vermehrt mit Bestandteilen des Endosomen/Lysosomen-Systems interagierten und somit die bakterizide Wirkung von aktivierten Makrophagen durch NO zustande kommt. Hierbei wurden Makrophagen mit IFN- γ aktiviert. Es ist bekannt, dass IFN- γ -aktivierte Makrophagen essentiell sind bei der Salmonellenabwehr. In der vorliegenden Arbeit wurden die Makrophagen jedoch mit PMA aktiviert. Daigneault *et al.* (2010) zeigten hierzu, dass PMA-aktivierte THP-1-Zellen nicht vermehrt NO produzieren. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine vermehrte NO-Produktion der THP-1a die unterschiedlichen intrazellulären Vermehrungsraten erklären könnte. PMA bindet in den Zellen an die Proteinkinase C und induziert deren Aktivierung (Lin *et al.*, 1999). Darüber hinaus führt PMA zu einer Inhibierung des Zellwachstums über den Kruppel-ähnlichen Transkriptionsfaktor und zum anderen zu einer Steigerung der Zelladhäsion über die Phosphorylierung von Integrinuntereinheiten (Tahara *et al.*, 2009; Dumont und Bitonti, 1994). Die Migration in dreidimensionalen Gelen von Makrophagen konnte ebenfalls durch PMA induziert werden (Castellucci und Montesano, 1988). Dies lässt den Rückschluss zu, dass PMA-aktivierte Makrophagen eine veränderte Oberflächenproteinzusammensetzung oder Oberflächenproteinaktivierung besitzen, welche wiederum dazu führt, dass mit PMA-aktivierte Makrophagen erleichtert Salmonellen aufnehmen und diese intrazellulären Salmonellen sich besser in der SCV vermehren können. Dies wurde

durch Arbeiten von Daigneault *et al.* (2010) bestätigt, welche zeigten, dass PMA-aktivierte THP-1-Zellen eine Differenzierung zu Gewebsmakrophagen durchmachten. THP-1a-Zellen wiesen ein vermindertes Zytoplasma-Kern-Verhältnis auf, eine gesteigerte Anzahl an Lysosomen und Mitochondrien und eine Expression von Oberflächenmarkern, welche denen der Gewebsmakrophagen *in vivo* entsprechen. Die THP-1a produzierten zwar nicht vermehrt NO, aber es kam zu einer Verminderung der ursprünglichen Phagozytoserate, vergleichbar mit der Abnahme der Phagozytoserate von Monozyten im Vergleich zu Makrophagen. Somit ist nicht die Phagozytoserate bei THP-1a im Vergleich zu THP-1s allein entscheidend, sondern PMA-aktivierte Makrophagen scheinen empfänglicher für eine Salmonelleninfektion aufgrund ihrer veränderten Morphologie und Zelloberflächenzusammensetzung nach PMA-Stimulation zu sein. Dieses Phänomen allein kann jedoch nicht die Serovar-Unterschiede in der vorliegenden Arbeit erklären. Vielmehr zeigte sich in dieser Arbeit, dass invasive Serovare wie *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* ihren invasiven Charakter verstärken konnten in THP-1a. Auf der anderen Seite schienen die nicht-wirtsadaptierten Serovare wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* sich deutlich besser in THP-1a intrazellulär zu vermehren. Möglicherweise führt hierbei die vermehrte Anzahl an Lysosomen in THP-1a zum unterschiedlichen Verhalten der intrazellulären Salmonellen, so dass Salmonellen, welche die Lysosom-Endosom-Fusion effektiver umgehen können, dies in THP-1a verbessert nutzen konnten. Demgegenüber stehen Arbeiten mit anderen bakteriellen Erregern. Durch Jelinek *et al.* (2007) wurde gezeigt, dass *Encephalitozoon cuniculi* in nicht-aktivierten Makrophagen im Vergleich zu IFN- γ -aktivierten Makrophagen eine verminderte Vermehrungsrate aufwies. Wiederum durch Shaughnessy und Swanson (2007) wurde beschrieben, dass sich *Listeria monocytogenes* stärker in nicht-aktivierten Makrophagen vermehren und in aktivierten Makrophagen früher und effektiver abgetötet wurden. Dennoch bleibt es schwierig diese erlangten Hinweise von fremden Erregern auf die Salmonellenpathogenese zu übertragen.

Im Anschluss wird auf den folgenden Seiten (Seite 116-118) eine aktuelle Literaturübersicht zu erhobenen Daten von *Salmonella*-Infektionsstudien in epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen dargestellt (Tab. 23).

Tab. 23 Darstellung von Daten zur Salmonelleninfektion *in vitro*

<i>Salmonella</i> Serovar	Zellkultursystem und MOI	Anzahl invasiver Erreger (<i>p. i.</i>)	Referenz	
S. Typhimurium	SL1344	IPEC-J2 (MOI 1)	91,15±5,37 % (2h <i>p. i.</i>) und 1816,63±66,87 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	3D4/31 (MOI 1)	70,86±1,16 % (2h <i>p. i.</i>) und 885,46±41,09 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	MODE-K (MOI 1)	41,63±2,10 % (2h <i>p. i.</i>) und 2736,79±162,98 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	RAW264.7 (MOI 1)	28,68±0,72 % (2h <i>p. i.</i>) und 229,63±11,94 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	LoVo (MOI 1)	122,09±4,61 % (2h <i>p. i.</i>) und 11570,69±538,26 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	THP-1 (stimuliert und unstimuliert) (MOI 1)	32,72±1,56 % und 20,10±1,42 % (2h <i>p. i.</i>); sowie 463,90±54,16 % und 96,84±6,88 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SL1344	IPEC-J2 (MOI 1 oder 10)	1-2 x 10 ⁵ KbE oder ~27 % der initialen Inokulum- menge (2h <i>p. i.</i>)	Schierack <i>et al.</i> , 2011; Schierack <i>et al.</i> , 2006
	SL1344	RAW264.7 (MOI 10)	3-7,1 % der initialen Inokulummenge (5-10min <i>p. i.</i>)	Pascopella <i>et al.</i> , 1995
	SL1344; DT104	HEp-2 (MOI 100)	~140 % bsw. ~120 % der initialen Inokulummenge (1h <i>p. i.</i>)	Carlson <i>et al.</i> , 2000
	SL1344, ATCC14028 DT104	IPEC-J2	3,22±0,09, 3,56±0,07 sowie 4,06±0,15 log ₁₀ cfu/Loch (1,5h <i>p. i.</i>)	Schmidt <i>et al.</i> , 2008
	SL1344	RAW264.7 (MOI 100)	~13-14 % der initialen Inokulummenge (2h <i>p. i.</i>)	Monack <i>et al.</i> , 1996
	DT104	IPEC-J2 (MOI 0,1)	25,22 % bsw. 47,48 % der initialen Inokulummenge (2h bsw. 30h <i>p. i.</i>)	Brown und Price (2007)
	ATCC14028	Primäre murine Peritonealmakrophagen (MOI 1)	55-60 % bsw. 20-35 % der initialen Inokulum- menge (3h bsw. 24h <i>p. i.</i>)	Fields <i>et al.</i> , 1986
	LT2 (TT16729)	J774A.1 (MOI 1)	~200 % der initialen Inokulummenge (16h <i>p. i.</i>)	Eriksson <i>et al.</i> , 2000
	SR-11	J774A.1 (MOI 100)	~13,3 % der initialen Inokulummenge (3h <i>p. i.</i>)	Lindgren <i>et al.</i> , 1996
	TML	CaCo-2	~100 % der initialen Inokulummenge (3h <i>p. i.</i>)	Bolton <i>et al.</i> , 2000
	112910a	Primäre porcine Alveolar- makrophagen (MOI 10)	~100 % der initialen Inokulummenge (1h <i>p. i.</i>)	Boyen <i>et al.</i> , 2006
14028	T84 sowie MDCK (MOI 20)	0,37 x 10 ⁶ sowie 0,61 x 10 ⁶ Salmonellen/Loch (1h <i>p. i.</i>)	Reed <i>et al.</i> (2002)	

Salmonella Serovar	Zellkultursystem und MOI	Anzahl invasiver Erreger (<i>p. i.</i>)	Referenz	
S. Typhimurium	779C-SmS	Primäre murine und humane Makrophagen, sowie J774A.1 (MOI 10)	90,32 %-74,19 %, 59,52 %-76,19 %, sowie 161,29 %-141,94 % der initialen Inokulummenge (5h bsw. 24h <i>p. i.</i>)	Vladoianu <i>et al.</i> , 1990
	395MS; 395MR10	HeLa (1,2 x 10 ⁸ Bakterien/Loch)	5,1±0,4 % bzw. 17,9±01,9 % der initialen Inokulummenge (1,5h <i>p. i.</i>)	Kihlstrom, 1977
	ST4/74; ST12/75	Primäre porcine Alveolar-makrophagen (MOI 5)	88,46 % bsw. 75,39 % der initialen Inokulummenge (1h bzw. 24h <i>p. i.</i>)	Watson <i>et al.</i> , 2000b
	TML (wt ¹⁶)	Int407 und MODE-K (MOI 2)	~15 % und ~18 % der initialen Inokulummenge (90min <i>p. i.</i>)	Weinstein <i>et al.</i> , 1998
	IR715	T84 (MOI 5)	10 % der initialen Inokulummenge (2,5h <i>p. i.</i>)	Winter <i>et al.</i> , 2009
S. Choleraesuis	SARB4	IPEC-J2 (MOI 1)	10,84±0,85 % (2h <i>p. i.</i>) und 282,07±14,79 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB4	3D4/31 (MOI 1)	11,19±0,45 % (2h <i>p. i.</i>) und 472,46±17,86 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB4	MODE-K (MOI 1)	64,40±2,25 % (2h <i>p. i.</i>) und 1514,11±44,21 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB4	RAW264.7 (MOI 1)	35,36±1,85 % (2h <i>p. i.</i>) und 611,35±28,27 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB4	LoVo (MOI 1)	38,40±0,69 % (2h <i>p. i.</i>) und 363,60±12,07 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB4	THP-1 (stimuliert und unstimuliert) (MOI 1)	76,84±6,38 % und 39,16±1,59 % (2h <i>p. i.</i>) sowie 971,71±23,17 % und 75,37±3,11 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SCSA50; SCS14/74	Primäre porcine Alveolar-makrophagen (MOI 5)	80,77 % bsw. 59,23 % der initialen Inokulummenge (1h bsw. 24h <i>p. i.</i>)	Watson <i>et al.</i> , 2000a
	A50	CaCo-2	~35 % der initialen Inokulummenge (3h <i>p. i.</i>)	Bolton <i>et al.</i> , 2000
S. Dublin	SARB12	IPEC-J2 (MOI 1)	15,81±0,75 % (2h <i>p. i.</i>) und 280,66±15,62 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB12	3D4/31 (MOI 1)	39,97±2,14 % (2h <i>p. i.</i>) und 305,60±9,54 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit
	SARB12	MODE-K (MOI 1)	74,86±3,45 % (2h <i>p. i.</i>) und 2086,17±66,05 % (24h <i>p. i.</i>)	diese Arbeit

¹⁶ wt = Wildtyp

5. Diskussion

Salmonella Serovar	Zellkultursystem und MOI	Anzahl invasiver Erreger (p. i.)	Referenz	
S. Dublin	SARB12	RAW264.7 (MOI 1)	70,25±2,89 % (2h p. i.) und 2049,85±86,45 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB12	LoVo (MOI 1)	124,11±8,08 % (2h p. i.) und 4766,67±180,81 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB12	THP-1 (stimuliert und unstimuliert) (MOI 1)	138,18±11,67 % und 39,16±1,59 % (2h p. i.) sowie 794,12±66,31 % und 75,37±3,11 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SD3246	CaCo-2	~75 % der initialen Inokulummenge (3h p. i.)	Bolton <i>et al.</i> , 2000
	SD2229; SD3246	Primäre porcine Alveolar-makrophagen (MOI 5)	82,31 % bsw. 69,23 % der initialen Inokulummenge (1h bsw. 24h p. i.)	Watson <i>et al.</i> , 2000b
	Lane (wt)	Int407 und MODE-K (MOI 2)	~37 % und ~51 % der initialen Inokulummenge (90min p. i.)	Weinstein <i>et al.</i> , 1998
	-keine Angabe-	THP-1 (MOI 10)	~3 x 10 ⁶ sowie 6 x 10 ⁶ Salmonellen/Loch (1h und 2,5h p. i.)	Valle und Guiney, 2005
S. Enteritidis	SARB16	IPEC-J2 (MOI 1)	46,11±1,79 % (2h p. i.) und 3441,43±126,89 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB16	3D4/31 (MOI 1)	44,96±0,78 % (2h p. i.) und 1329,94±69,97 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB16	MODE-K (MOI 1)	13,98±0,99 % (2h p. i.) und 1541,20±71,71 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB16	RAW264.7 (MOI 1)	26,55±1,55 % (2h p. i.) und 473,61±27,43 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB16	LoVo (MOI 1)	83,02±5,21 % (2h p. i.) und 9169,45±278,81 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	SARB16	THP-1 (stimuliert und unstimuliert) (MOI 1)	29,14±2,35 % und 14,72±1,96 % (2h p. i.) sowie 528,31±42,63 % und 20,84±2,25 % (24h p. i.)	diese Arbeit
	Klinisches Isolat	L-Zellen (MOI 200)	~1,26 x 10 ³ Salmonellen/1000 Zellen (2h p. i.)	Virtala <i>et al.</i> , 1997
	Klinisches Isolat	Henle-407 (CCL-6) (MOI 70)	~1-3 Salmonellen/Zelle (1h p. i.)	Saarinen <i>et al.</i> , 1996
	Phagentyp (PT)1	Primäre humane/murine dendritische Zellen (MOI 50)	~28 % der initialen Inokulummenge (12h p. i.)	Bueno <i>et al.</i> , 2008
	Klinisches Isolat	U937 (MOI 5-40)	~0,1-4 Bakterien/Zelle (1h p. i.)	Laitio <i>et al.</i> , 1997

Im Gegensatz zu vielen Studien wurden in dieser Arbeit die Salmonellen durch einen kurzen Zentrifugationsschritt in direkten Kontakt mit dem Zellmonolayer gebracht. Dies ermöglichte annähernd ähnliche Infektionsbedingungen in den verschiedenen Zellkulturmodellen und somit eine geringere Streuung der Ergebnisse. Nach Bolton *et al.* (2000) führt der Zentrifugationsschritt im Invasionsversuch zu einer erhöhten Invasionsrate und zur Ablösung der Zellmonolayer. In der vorliegenden Arbeit konnte die Ablösung des Zellmonolayers nicht beobachtet werden. In der Arbeit um Bolton *et al.* (2000) wurden jedoch keine detaillierten Angaben zur eigentlichen Durchführung der Zentrifugation gefunden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zentrifugation mit zu hohen g -Werten, zu langen Zentrifugationszeiten oder mit der falschen Temperatur durchgeführt wurde. Um dennoch einen möglichen Einfluss der Zentrifugation zu testen, kann für weitergehende Studien empfohlen werden, nicht-invasive *Salmonella*-Deletionsmutanten und/oder Phagozytoseinhibitoren als Kontrollen zu verwenden.

Ferner wurde in dieser Arbeit für die Infektionsversuche eine MOI von eins eingesetzt. Die hieraus ermittelten Daten können nur bedingt mit den Ergebnissen aus der Literatur verglichen werden, da oftmals unterschiedliche MOI's genutzt wurden (Tab. 23). Kusters *et al.* (1993) zeigten, dass die MOI einen entscheidenden Einfluss auf die Adhäsion und Invasion von *Salmonella*-Serovaren besitzt. Hierbei wurden die höchsten Invasionsraten von *S. Typhimurium* erzielt mit einer MOI 100 für 60min in epithelialen Zellen. Huang *et al.* (1998) zeigten hingegen für *S. Typhi* eine optimale MOI in epithelialen Zellen von MOI~40. Für die in dieser Arbeit verwendeten vier Serovare wurden im Vorfeld keine Optimierungen hinsichtlich ihrer besten MOI für jede der sieben verwendeten Zellkultursysteme erstellt. Es wurde eine MOI von eins gewählt, so dass die Serovar-Unterschiede umgangen werden konnten und somit die Bedingungen und auch die Ergebnisse für die sieben Zellkultursysteme untereinander vergleichbar waren.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit an drei epithelialen und drei makrophagenähnlichen Zellen gezeigt werden, dass alle vier Serovare eine signifikant höhere Infektionsrate, intrazelluläre Vermehrungsrate in den Epithelzellen nach 4h und 24h *p. i.* aufwiesen. Nur *S. Dublin* zeigte 2h *p. i.* keinen Unterschied bei den Infektionsraten zwischen den epithelialen und makrophagenähnlichen Zellen. Dieser Epithel-Makrophagen-Unterschied wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, es gibt somit keine vergleichbaren Angaben zu Studien von einem Serovar in mehreren epithelialen als auch in makrophagenähnlichen Zellen. Lu *et al.* (1999) zeigten hierzu Invasionswerte von *S. Enteritidis* in HeLa-Zellen und verglichen diese mit der Überlebensfähigkeit der Salmonellen in Peritonealmakrophagen, aber es wurden keine Aussagen zu den Invasionswerten in den Makrophagen gemacht. Budiarti *et al.* (1991) wiederum wiesen zwar die Adhärenz von *S. Derby* an Hep-2-Zellen nach, zeigten aber die Infektionsraten nur in Makrophagen. Der beobachtete Epithel-Makrophagen-Unterschied dieser Arbeit muss jedoch vorsichtig interpretiert werden, da Makrophagen als Fresszellen des Immunsystems eine deutlich höhere Phagozytoserate aufweisen im Vergleich zu den Epithelzellen. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit die Inkubationszeiten der Infektionsversuche angepasst. Dies wiederum könnte einen entscheidenden Einfluss auf den ermittelten Epithel-Makrophagen-Unterschied besitzen. Um diese Möglichkeiten auszuschließen, wird empfohlen, bei Epithel-Makrophageninfektionen gleiche Inkubationszeiten zu verwenden und zusätzlich Versuche mit Phagozytoseinhibitoren

(z. B. Cytochalasin D, Swinholid A) durchzuführen, um die unterschiedlichen Phagozytoseraten zu berücksichtigen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit somit gezeigt, dass die wirtsadaptierten Serovare ein verlangsamtes Wachstum und eine verminderte Invasivität in den entsprechenden Wirtssystemen aufwiesen, wie *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen. Neben den genannten Daten aus der Literatur zu den *Salmonella*-Infektionsversuchen *in vitro* können die vorliegenden Ergebnisse auch durch Literaturquellen von *in vitro* ilealen Invasionsstudien bestätigt werden. Bolton *et al.* (1999) beispielsweise zeigten mit *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Typhimurium* in porcinen ilealen Invasionsstudien deutliche Unterschiede in der Anzahl wiedergefundener Bakterien. Hierbei war *S. Typhimurium* 4/74 deutlich invasiver als die verwendeten *S. Choleraesuis* A50 und *S. Dublin* 3246 Serovare im Schwein. Darüber hinaus erzeugte *S. Dublin*, nicht jedoch *S. Choleraesuis*, die schwerwiegendsten Epithelzellzerstörungen mit Kollaps der Villusstruktur, Villusturorverlust und Zerstörung der epithelialen Barriere. Paulin *et al.* (2007) konnten ebenfalls in ihrem porcinen ilealen Invasionsstest vermehrt den Erreger *S. Typhimurium* 4/74, nicht jedoch *S. Choleraesuis* A50, nachweisen. Jedoch war es auch hier die wirtsadaptierte Serovar *S. Choleraesuis*, welche in Lymphgeweben des Ileums wiedergefunden wurde. Diese verminderte Invasivität von den wirtsadaptierten/wirtsspezifischen Serovaren wird durch Untersuchungen um Uzzau *et al.* (2001) bekräftigt. Uzzau *et al.* (2001) zeigten hierzu, dass die wirtsspezifische *S. Abortusovis* Serovar im Vergleich zu *S. Typhimurium* in ovinen ilealen Invasionsstudien keine Villusatrophie, keine Infiltration von Entzündungszellen bewirkte und deutlich geringere Invasionsraten aufwies. Aus den Daten dieser Arbeit und der Literaturlage kann geschlussfolgert werden, dass hohe Invasionsraten nicht korrelierbar sind mit der Fähigkeit von den Serovaren, morphologisch-pathologische Veränderungen auszulösen. Dieser Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der intestinalen Invasion und der Virulenz wurde bereits in früheren Studien an Schweinen bestätigt (Bolton *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2000a). Analog hierzu konnte gezeigt werden, dass die wirtsadaptierten Serovare *S. Pullorum* und *S. Gallinarum* in Hühnern nur geringe intestinale Entzündungsreaktionen bewirkten, jedoch schnell und effizient systemisch streuten (Henderson *et al.*, 1999). Diese geringe intestinale Entzündungsreaktion von wirtsspezifischen/wirtsadaptierten Serovaren korreliert mit einer geringen Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und mit einer geringen immunologischen Antwort der Enterozyten (Kaiser *et al.*, 2000; Montagne *et al.*, 2001). Daraus kann geschlossen werden, dass die nicht-wirtsadaptierte Serovar über eine schnellere Vermehrung zu einer vermehrten Zytokinexpression führten und somit ihre eigene Zerstörung durch das Wirtsimmunsystem fördert - im Gegensatz zu wirtsadaptierten Serovaren, wie *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen, welche die Immunabwehrmechanismen zu umgehen scheinen und eine geringere Vermehrungsrate aufweisen, dafür jedoch können diese Serovare systemisch streuen.

5.3 Die intrazellulären GFP-Salmonellen und Sifs

Mittels Nutzung der plasmidvermittelten GFP-Markierung der Salmonellen wurden die intrazellulären Salmonellen, hier beispielhaft für *S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis*, mikroskopisch untersucht. *S. Typhimurium* zeigte hierbei 24h *p. i.* ein intrazelluläres Wachstum in Form von meist linienförmigen Strukturen. *S. Choleraesuis* hingegen wurde

intrazellulär vor allem in Form von vereinzelt runden oder ovalen Strukturen detektiert. Dieses Phänomen der unterschiedlichen Morphologie und Verteilung von intrazellulären Salmonellen mit einem auf der einen Seite eher filamentär wirkendem Wachstum und auf der anderen Seite der Bildung von eher kugelförmigen, kompakten Kolonien wurde in den sechs verwendeten Zellkultursystemen bisher nicht beschrieben. Lindgren *et al.* (1996) zeigten hierzu 14h *p. i.* eine deutlich unterschiedliche intrazelluläre Morphologie und Verteilung von *S. Typhimurium* in murinen J774A.1-Makrophagen. Hierbei formte die zytotoxisch-wirksame, nicht jedoch die nicht-zytotoxische *Salmonella*-Mutante, große *Salmonella*-gefüllte Vakuolen. In der vorliegenden Arbeit konnten die Variablen 'Zelluntergang' an sechs verschiedenen Zellkultursystemen und 'große *Salmonella*-gefüllte Vakuolen' nach 24h *p. i.* nicht miteinander in Zusammenhang gebracht werden. Bestätigt werden die vorliegenden Beobachtungen der unterschiedlichen intrazellulären Morphologie durch Studien um Bolton *et al.* (1999). Diese zeigten, dass *S. Choleraesuis* A50 vor allem als Einzelbakterium oder in geringer Anzahl in Vakuolen von intakten Epithelzellen im porcinen ilealen Invasionsversuch vorkamen, im Gegensatz zu *S. Typhimurium* und *S. Dublin*, die in Form von größeren Mikrokolonien intrazellulär zu detektieren waren.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Morphologie von intrazellulären Salmonellen könnten die *Salmonella*-spezifischen Tubuli, die sogenannten *Salmonella-induced-filaments* (Sifs), sein. Die Entstehung der Sifs wird maßgeblich durch SPI1 und SPI2 verursacht, hierzu gehören das SPI1-Effektorprotein SopD2 sowie die Effektorproteine der SPI2: SspH2, SteC, SseF, SseG und SifA (Bakowski *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2008). Hierzu demonstrierten Birmingham *et al.* (2005) und Drecktrah *et al.* (2008) den dynamischen Phänotyp, die Mikrotubuli-abhängige Motilität und die Interaktion der Sifs mit den Endosomen. Birmingham *et al.* (2005) zeigten hierbei, dass die Sifs abhängig sind von der Wirtszelldichte (Konfluenz), den Wachstumsbedingungen der Wirtszellen (10 % FKS) und der MOI. Sifs wurden hierbei nur in 50-80 % der *S. Typhimurium* infizierten HeLa-Zellen *in vitro* detektiert (MOI 325). Die Salmonellen mit Sifs waren assoziiert mit einer schnellen intrazellulären Replikation *in vitro*, da LAMP1¹⁷-positive Vakuolen (Sifs) mehr Salmonellen pro Einzelzelle besaßen, als LAMP1-negative Vakuolen (keine Sifs). Untersuchungen an Sifs sind, soweit bekannt, nur mit *S. Typhimurium* durchgeführt worden und wurden bisher bei anderen Serovaren nicht beschrieben. Auch wenn andere *Salmonella*-Serovare die entsprechenden Effektorproteine, essentiell für die Sif-Bildung besitzen, so kann derzeit nicht gezeigt oder ausgeschlossen werden, dass die Tubuli-Strukturen auch durch andere Serovare induziert werden könnten. Rajashekar *et al.* (2008) konnten jedoch zeigen, dass sich die Sifs unabhängig von der Zellart formieren, sowohl in Makrophagen als auch in Epithelzellen. Ob die Sifs eine Rolle bei der unterschiedlichen Morphologie und Verteilung von intrazellulären Salmonellen besitzen, konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Hierzu kann empfohlen werden, die Rolle der Sif-Strukturen mittels entsprechender Deletionsmutanten (z. B. SopD2, SseF, SseG, PipB2, SifA) und durch Zellkulturinhibitoren (z. B. Brefeldin A oder YM201636) zu untersuchen, um herauszufinden, ob die Sifs von unterschiedlichen Serovaren diesen morphologischen Zellunterschied hervorrufen könnten. Neben den Sifs wurden bereits drei weitere intrazelluläre Tubuli-Strukturen durch *S. Typhimurium* beschrieben: die Sortier-Nexin (SNX¹⁸)-Tubuli (z. B. SNX3 (Braun *et al.*,

¹⁷ LAMP = Lysosomen-assoziiertes Membranprotein (*lysosome-associated membrane proteine*)

¹⁸ SNX = Sortier-Nexin (*sorting-nexin*)

2010)), die *Salmonella*-induzierendes sekretorisches Trägermembranprotein (SCAMP¹⁹)-Tubuli (z. B. SCAMP3 (Mota *et al.*, 2009)) und die LAMP1-negativen Tubuli (Schroeder *et al.*, 2010). Mutationen in Effektorproteinen, essentiell für diese Tubuli-Bildung, resultierten auch in einer verminderten Virulenz, da hierbei meist die Integrität der SCV mit beeinflusst wurde (Schroeder *et al.*, 2011). Die Tubuli-Strukturen scheinen somit wichtig für die SCV-Stabilität und damit auch für die intrazelluläre Überlebensfähigkeit der Salmonellen zu sein. Dies bestätigt die Vermutung, dass beispielsweise Sifs bedeutend für die Virulenz sind, es sagt aber nicht aus, dass Serovare, welche keine Sifs bilden weniger virulent sind. Darüber hinaus ist derzeit nicht bekannt, welche Moleküle der Wirtszelle bei der Entstehung der Sifs eine Rolle spielen und inwieweit die Wirtszelle auf die Bildung der Sifs einen Einfluss nehmen kann. Es wäre denkbar, dass hierbei die unterschiedlichen Signalkaskaden/Proteine der Wirtszellen auf die Sifs in einer unterschiedlichen Art und Weise reagieren könnten.

5.4 Welche Rolle spielen die GFP-markierten Salmonellen?

Durch GFP-markierte Salmonellen wurde die intrazelluläre Anzahl an Salmonellen pro Einzelzelle bestimmt. Zunächst wurde hierfür sichergestellt, dass sich die Infektionsraten (KbE) zwischen den GFP-Mutanten und den Wildtypen nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt). Bei der GFP-Salmonelleninfektion wurde die größte Erregeranzahl pro Einzelzelle nach 4h *p. i.* vor allem in epithelialen Zellen wie den MODE-K (14,02±1,98), LoVo (9,96±0,86) und IPEC-J2 (8,26±0,90) sowie in den aktivierten THP-1a (10,00±1,02) detektiert. Nach 24h *p. i.* besaßen die IPEC-J2- und THP-1a-Zellen die meisten intrazellulären Salmonellen mit bis zu 150 Salmonellen pro Zelle. Derzeit existieren nur wenige Angaben in der Literatur zur Anzahl von intrazellulären Salmonellen pro Einzelzelle. Darüber hinaus können die Literaturdaten nur bedingt mit den vorliegenden Ergebnissen verglichen werden, da zum einen die Anzahl intrazellulärer Salmonellen in der Literatur über die Kategorie (>10, oder >16) hinaus nicht weiter aufgeschlüsselt wurde und zum anderen die Infektionsprotokolle (verwendete Zellkulturen, MOIs, Zeitpunkte) nicht übereinstimmen. Hierbei zeigten Birmingham *et al.* (2005) 4h *p. i.* in HeLa-Zellen, dass ~35 % der Zellen mit 1-3 Salmonellen pro Zelle und ~15 % mit >10 Salmonellen pro Zelle infiziert waren. Nach 23h waren jedoch ~18 % der infizierten HeLa mit 1-3 Salmonellen pro Zelle und ~58 % mit >10 Salmonellen pro Zelle infiziert. Roark und Haldar (2008) wiesen nach, dass nach 6h *p. i.* ~75 % der infizierten HeLa-Zellen 1-5 Salmonellen pro Zelle besaßen und ~10 % der HeLa 11-15 Salmonellen pro Zelle. Knodler und Steele-Mortimer (2005) wiederum demonstrierten, dass in HeLa-Zellen ~90±3,5 *S. Typhimurium* SL1344 pro Einzelzelle nach 12h *p. i.* vorkamen. Dies bestätigt wiederum die in dieser Arbeit ermittelten Daten zur Anzahl der Salmonellen pro Einzelzelle.

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass murine RAW264.7-Zellen im Vergleich zu den weiteren fünf Zellkultursystemen (z. B. humane THP-1a) nach 24h *p. i.* bedeutend weniger *S. Typhimurium* intrazellulär besaßen. Dies bestätigt Beobachtungen um Pascopella *et al.* (1995), welche in RAW264.7 zeigten, dass deutlich weniger mäusepathogene *S. Typhimurium* intrazellulär nachweisbar waren im Vergleich zu *S. Typhi* oder *S. Gallinarum*. Demgegenüber stehen jedoch Arbeiten um Bueno *et al.* (2008)

¹⁹ SCAMP = *Salmonella*-induzierendes sekretorisches Trägermembranprotein (*Salmonella*-induced secretory carrier membrane protein)

und Vladoianu *et al.* (1990), welche beobachteten, dass *S. Typhi* zwar in humanen, nicht jedoch in murinen Makrophagen überlebt und auf der anderen Seite *S. Typhimurium* zwar in murinen, nicht jedoch in humanen Makrophagen überleben konnte. Dem scheinen die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit entgegenzusprechen, da *S. Typhimurium* (GFP) nach 24h *p. i.* intrazellulär vor allem in humanen und weniger in murinen Makrophagenzellen gefunden wurde. Warum wurden also vermehrt *S. Typhimurium* in humanen THP-1a als in murinen Makrophagen wiedergefunden, obwohl in der klinischen Symptomatik eine murine Bakteriämie und beim Menschen zumeist Diarrhö durch *S. Typhimurium* ausgelöst wird? In dieser Arbeit wurde jedoch die 'Überlebensfähigkeit' der Salmonellen in Makrophagen nicht untersucht, sondern nur die reine Anzahl der GFP-Salmonellen pro Einzelzelle bestimmt. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass es vermehrt degradierte Salmonellen in humanen, als in den murinen Makrophagen zum Zeitpunkt der Fixierung gegeben hat, zumindest nicht, wenn bei diesen degradierten Erregern das GFP bis dahin nicht zersetzt oder abgebaut wurde. Bei der Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Salmonellen sollte, da nur lebende Salmonellen detektiert werden, die KbE-Methode genutzt werden. Die Messung der KbE basiert jedoch nicht auf Einzelzellniveau und ist deshalb nur bedingt genau in seiner Aussage. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise gezeigt, dass 24h *p. i.* sich die GFP-Anzahl der Salmonellen pro Einzelzelle zwischen RAW264.7 und THP-1a deutlich unterschieden. Die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl war jedoch nicht unterschiedlich bei den GFP-Versuchen. Und auch die relative Infektionsrate (KbE) 4h und auch 24h *p. i.* in dieser Arbeit war weder für RAW264.7 und THP-1a noch RAW264.7 und THP-1s signifikant unterschiedlich. Da hierbei KbE und damit lebende Erreger gemessen wurden, kann daraus geschlossen werden, dass sich in den THP-1a-Zellen degradierte GFP-Salmonellen befunden haben mussten. Ansonsten hätten im Umkehrschluss die KbE-Werte zwischen RAW264.7 und THP-1a deutlich höher und damit signifikant unterschiedlich für THP-1a-Zellen ausfallen müssen. Dies wiederum bestätigt die Arbeit um Bueno *et al.* (2008), welche dendritische Zellen aus dem Knochenmark oder dem Blut mit *S. Typhimurium* 14028s für eine Stunde infiziert haben (MOI 50). Die intrazellulären Salmonellen (*S. Typhi* in humanen und *S. Typhimurium* in murinen Makrophagen) zeigten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Degradierung nach 24h *p. i.*, dafür befanden sich jedoch degradierte *S. Typhi* in murinen und *S. Typhimurium* in humanen Makrophagen. Darüber hinaus fusionierten *S. Typhimurium*-enthaltende Vakuolen in murinen Zellen deutlich weniger mit Bestandteilen des Endosomen/Lysosomen-Systems. Bereits früher wurde spekuliert, dass Salmonellen, welche nicht in Makrophagen überleben können, auch einhergehen mit einer verminderten Virulenz *in vivo* (Fields *et al.*, 1986; Hensel *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 1994). Somit scheint die intrazelluläre Überlebensrate von Salmonellen wirtsspezifisch zu sein. Dies bestätigt die Persistenz von *S. Typhimurium* in einer Vielzahl von Makrophagen unterschiedlicher tierischer Herkunft, welche korreliert mit der Fähigkeit einer breiten Wirtsspezifität (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995; Ishibashi und Arai, 1996; Vladoianu *et al.*, 1990). Auf der anderen Seite zeigt diese Diskussion auch, dass geschädigte oder degradierte GFP-Salmonellen in der Immunfluoreszenz mit gezählt und ausgewertet wurden. Um dieses methodische Problem zu umgehen, wird empfohlen, zu definierten Zeitpunkten (beispielsweise 2h, 4h und 24h *p. i.*) elektronenmikroskopische Aufnahmen der infizierten Zellen anzufertigen, um eine Aussage zu intrazellulären Salmonellen sowohl auf Einzelzellebene als auch auf 'funktioneller' Ebene (Degradierung) erfüllen zu können.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus auch der Zelluntergang durch Ermittlung der Gesamtzellzahl ermittelt. Ein Zellverlust konnte in dieser Arbeit nach 24h *p. i.* nur durch *S. Typhimurium* Infektion bei den Zellkultursystemen IPEC-J2, LoVo und THP-1a, nicht jedoch bei einer Infektion mit *S. Choleraesuis* beobachtet werden. Dies bestätigt Arbeiten von Watson *et al.* (2000b), welche 24h *p. i.* zeigten, dass *S. Typhimurium* zu einer höheren Laktatdehydrogenase-Freisetzung führte im Gegensatz zur Infektion mit *S. Choleraesuis*. Boyen *et al.* (2006) und Browne *et al.* (2002) demonstrierten hierzu, dass die Invasion von *S. Typhimurium* und auch die frühe Zytotoxizität SPI1, SPI2 und SipB abhängig sind. Auch Guilloteau *et al.* (1996) wiesen nach, dass die Zellyse serovar- und wirtsspezifisch ist. Die Salmonelleninfektion resultiert in einer Caspase-Aktivierung, der Freisetzung von Interleukinen (z. B. IL-1 β und IL-18) und dem Zelluntergang (Apoptose, Nekrose, Autophagy und/oder Pyroptose) (Chen *et al.*, 1996; Deretic, 2011; Fink und Cookson, 2007; Guiney, 2005; Jarvelainen *et al.*, 2003; Watson *et al.* 2000b). Die Apoptose, als Antwort auf intestinale Infektionen, fördert die Eliminierung der infizierten und angegriffenen Epithelzellen und dient der Herstellung eines gesunden Epithelzelllayers (Kim *et al.*, 1998). Die Messung der Gesamtzellzahl in dieser Arbeit ist jedoch zu ungenau, um den komplexen Vorgang des Zellunterganges genauer zu betrachten. Hierzu werden entsprechende Versuche mit beispielsweise Caspase-1, -3 und -9 empfohlen.

Bei der Ermittlung der Gesamtzellzahl wird darüber hinaus vernachlässigt, dass die Zellen sich trotz der Infektion *in vitro* weiter vermehren können. Die ermittelten Unterschiede im Zelluntergang nach der *S. Typhimurium* Infektion (nur bei LoVo, THP-1a, IPEC-J2) würden somit durch die unterschiedliche Generationszeit der Zellen *in vitro* bedingt sein. Die Verdopplungszeiten der Zellen sind: THP-1 60-70h (ohne PMA; Tsuchiya *et al.*, 1980), LoVo 36,9h (Drewinko *et al.*, 1976), 3D4/31 25,5h (Weingartl *et al.*, 2002), RAW264.7 16-24h (Raschke *et al.*, 1978), IPEC-J2 19,26h (Nossol C., pers. Kommunikation) und MODE-K 15h (Vidal *et al.*, 1993). Somit kann die Generationszeit die ermittelten Unterschiede im Zelluntergang nicht erklären. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Serovare möglicherweise die sechs Zellkulturen ungleich schnell absterben lassen. Hierzu gibt es derzeit keine exakten Literaturhinweise. Es wurde hingegen gezeigt, dass das Ablösen von infizierten Makrophagen nach 20h *p. i.* durch eine *S. Dublin* oder *S. Typhimurium* Infektion abhängt von *spvB* und *spvR* (Browne *et al.*, 2002), dennoch wurden keine zeitlichen Unterschiede zwischen den Serovaren untersucht. Van der Velden *et al.* (2005) wiesen darüber hinaus nach, dass Salmonellen einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Immunzellen besitzen. Im Gegenzug ist jedoch die Freisetzung von IL-1, TNF- α und IL-6 der infizierten Zellen nach 24h *p. i.* nicht unterschiedlich zwischen den Serovaren (Watson *et al.*, 2000a), somit kann darüber hinaus ausgeschlossen werden, dass Interleukine, produziert von den infizierten Zellen, einen Serovarunterschied im Ablösen der Zellen erklären könnten.

Bei der Auswertung der GFP-Daten war darüber hinaus zu beobachten, dass Zellen auch deutlich unter dem Durchschnitt liegende Werte an intrazellulären Salmonellen aufweisen konnten. Diese sogenannten Ausreißerwerte wurden bei folgenden Infektionskombinationen festgestellt: Infektion von *S. Typhimurium* (GFP) in IPEC-J2 und RAW264.7 sowie Infektion von *S. Choleraesuis* (GFP) in IPEC-J2, 3D4/31, MODE-K und THP-1a. Diese Ausreißerwerte könnten zwei mögliche Ursachen haben: erstens, aufgrund der Methode ist es möglich, dass zwar noch grün-fluoreszierende, aber bereits degradierte Salmonellen gezählt wurden oder

zweitens, bereits infizierte Zellen sind untergegangen, es kam zur Freisetzung von Salmonellen in das Zellkulturmedium und somit konnten die Nachbarzellen reinfiziert werden. Hierbei sollte sich im ersteren Falle die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl nicht verändern oder abnehmen. Im zweiten Fall ist davon auszugehen, dass die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl zunimmt oder, wenn es ein Gleichgewicht zwischen Freisetzen/Reinfektion und Zelltod gibt, maximal gleichbleibt. Wiederum bei einer Zunahme der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl ist davon auszugehen, dass es entweder zur Freisetzung und Reinfektion kam oder dass es zum Ablösen und Absterben von nicht-infizierten Nachbarzellen gekommen sein könnte. In der Literatur existieren derzeit keine Hinweise, dass über Zytokine, Chemokine oder möglicherweise *Gap Junctions* nur die nicht-infizierten Nachbarzellen abgelöst werden. Darüber hinaus wurde bereits nachgewiesen, dass die Serovare keine unterschiedlichen Interleukin-Freisetzungen oder serovarabhängige Proliferationseffekte hervorrufen können (Velden *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2000a), damit kann diese Erklärung ausgeschlossen werden. Sofern es jedoch zu einer Abnahme der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl gekommen ist, kann davon ausgegangen werden, dass sich infizierte Zellen abgelöst haben oder abgestorben sind (Browne *et al.*, 2002), oder dass es den Wirtszellen gelungen ist, die intrazellulären Salmonellen abzubauen.

Nachfolgend seien diese Überlegungen für die verwendeten Serovare in dieser Arbeit kurz erläutert:

(1) In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl der mikroskopischen Auswertung bei einer *S. Typhimurium* Infektion zu einer Zunahme der relativen Anzahl infizierter Zellen führt bei 3D4/31, RAW264.7. Das heißt, nach 24h *p. i.* waren mehr Zellen mit Salmonellen infiziert, obwohl Gentamicin im Zellkulturmedium vorhanden war. Somit kann aufgrund des Anstieges der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl für 3D4/31 und RAW264.7 nach *S. Typhimurium* Infektion geschlussfolgert werden, dass der Ausreißerwert in RAW264.7 für einen Zelluntergang infizierter Zellen, mit Freisetzung von Salmonellen und anschließender Reinfektion von Nachbarzellen steht. Hierbei gilt, dass die Reinfektion größer ist als der Zelluntergang. Die relative Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl nach *S. Typhimurium* Infektion war hingegen in IPEC-J2 nicht verändert. Diese gleichbleibende Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl und der durch *S. Typhimurium*-induzierte Zelluntergang 24h *p. i.* lassen darauf schließen, dass entweder die Freisetzung des Erregers und die Reinfektion von Nachbarzellen ein Gleichgewicht bilden oder dass intrazelluläre Salmonellen in den Zellen ruhten, welche geschädigt waren und/oder sich nur schlecht intrazellulär vermehren konnten. Hierbei gilt, dass der Zelluntergang größer ist als die Reinfektion. Eine *S. Typhimurium* (GFP) Infektion führte nicht nur in IPEC-J2 sondern auch in LoVo und THP-1a zu einem Abfall der Zellzahl *in vitro*. Bei beiden Zellarten wurden keine Ausreißerwerte bei der Anzahl intrazellulärer Salmonellen pro Einzelzelle detektiert und es kam nicht zur Veränderung der relativen Anzahl infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl. Jedoch kann aufgrund der Abnahme der Gesamtzellzahl darauf geschlossen werden, dass es zum Untergang infizierter Zellen gekommen ist und aufgrund der gleichbleibenden relativen Anzahl demzufolge auch zur Reinfektion der Nachbarzellen.

(2) Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *S. Choleraesuis* in 3D4/31 und MODE-K zu einer Abnahme der relativen Anzahl infizierten Zellen pro Gesamtzellzahl führte. Hier scheinen dementsprechend die Ausreißerwerte von 3D4/31 und MODE-K für ein

vermindertes Wachstum intrazellulärer Salmonellen zu stehen und für ein Ablösen oder Absterben von infizierten Zellen, wobei gilt: der Zelluntergang ist größer als die Reinfektion. Möglich wäre auch, dass ruhende Salmonellen oder degradierte, aber noch grün-fluoreszierende Salmonellen intrazellulär gezählt wurden. Da bereits gezeigt wurde, dass *S. Typhimurium* nicht in murinen Immunzellen, *S. Typhi* jedoch nicht in humanen Immunzellen degradiert werden (Bueno *et al.*, 2008), ist nicht anzunehmen, dass *S. Choleraesuis* in porcinen Immunzellen degradiert wurde. Die Ausreißerwerte in IPEC-J2 und THP-1a wiederum durch *S. Choleraesuis* Infektion sprechen durch die unveränderten Werte bei den Datensätzen 'infizierte Zellen pro Gesamtzellzahl' und 'Gesamtzellzahl pro Sichtfeld' für ein vermindertes und schlechtes intrazelluläres Wachstum, für ruhende Salmonellen oder degradierte, aber noch grün-fluoreszierende intrazelluläre Salmonellen.

Beim Vergleich beider Auswertungsmethoden des Infektionsversuches (1) Ermittlung der KbE und (2) der mikroskopischen Auswertung von GFP-Salmonellen wurde somit deutlich, dass bei der mikroskopischen Auswertung auch degradierte, aber noch grün-fluoreszierende Salmonellen mitgezählt werden konnten. Darüber hinaus war es möglich, dass infizierte Zellen durch die Färbeprozedur und Waschschriffe abgespült wurden und somit nicht mehr erfasst werden konnten. Die Ermittlung der KbE hingegen beruht allein auf der Rekultivierung von lebenden Bakterien. Die Steigung m als intrazelluläre Vermehrungsrate muss dementsprechend auf lebenden, rekultivierbaren KbE basieren. Diese Steigung m kann jedoch bei Freisetzung der Erreger und Reinfektion von Nachbarzellen *in vitro* fälschlicherweise zu hoch ausfallen. Diese freigesetzten Salmonellen müssten in diesem Fall jedoch im Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Gentamicin überleben. Erwiesenermaßen gibt es vor allem bei *S. Typhimurium* rund 4,4 % Gentamicin-resistente Serovare (Ahuja *et al.*, 1984). In der vorliegenden Arbeit wurden alle verwendeten Serovare auf ihre Gentamicinempfindlichkeit hin getestet, deshalb kann diese Erklärung ausgeschlossen werden. Möglicherweise gelang es den Erregern nach dem Absterben oder Freisetzen von der infizierten Zelle A, wenige Sekunden bis Minuten in dem Gentamicin-haltigen Medium zu überleben und innerhalb kürzester Zeit die Nachbarzelle B zu infizieren. Dies würde die Arbeiten um Brown und Price (2007) bestätigen, welche in IPEC-J2-Zellen eine Aufnahme von Salmonellen bereits nach 2-5min *p. i.* zeigten. Um darüber hinaus beispielsweise ruhende intrazelluläre Salmonellen zu berücksichtigen, wird empfohlen, beide Techniken, KbE und GFP zu kombinieren. Vergleicht man folglich die ermittelten Daten dieser Arbeit aus den Infektionsversuchen, dann zeigt sich, dass *S. Typhimurium* in RAW264.7-Zellen sehr geringe Werte für intrazelluläre Salmonellen pro Einzelzelle besitzt, aber zu einer Zunahme infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl nach 24h *p. i.* führt. Dies erklärt sich aus dem raschen Absterben von murinen Makrophagen infiziert mit wenigen Salmonellen, und der schnellen Reinfektion von Nachbarzellen *in vitro*. In RAW264.7-Zellen können sich *S. Typhimurium* Erreger jedoch nur langsam oder schlecht vermehren, was durch die geringe Anzahl GFP-Salmonellen pro Einzelzellen, aber auch durch die geringe Steigung m gezeigt wurde.

Diese bisher dargestellten Ergebnisse der Salmonelleninfektionsversuche sind aufgrund der besseren Übersichtlichkeit auf den folgenden Seiten in Tabellen kurz zusammengefasst (Tab. 24 und 25)²⁰. Hieraus kann geschlossen werden, dass *S. Typhimurium* zumeist über einen Zelluntergang die Reinfektion von Nachbarzellen bewerkstelligt. Darüber hinaus zeigt sich in murinen Makrophagen das Bildnis ruhender oder sich nur schlecht vermehrender intrazellulärer Erreger. Dies trägt demzufolge zur systemischen Verbreitung des Erregers *S. Typhimurium* in der Maus bei. *S. Choleraesuis* hingegen zeigt ruhende oder sich nur schlecht vermehrende intrazelluläre Erreger nur in porcinen Zellen und in allen verwendeten Makrophagen und deutet somit auf einen im Vergleich zu *S. Typhimurium* anders gearteten Infektionsmechanismus hin.

²⁰ Erklärung zur den Tabellen 24 und 25 auf den folgenden Seiten:

Steigung m wurde berechnet aus den KbE Werten zwischen 2h-24h *p. i.* und dargestellt als $\bar{x} \pm \sigma_n$ (gering ≤ 5.000 ; mäßig ≤ 15.000 ; hoch ≤ 30.000 und sehr hoch ≤ 50.000). Zunahme der Anzahl der GFP-Salmonellen/Einzellzelle zwischen 4h-24h *p. i.* (gering ≤ 5 ; mäßig ≤ 15 ; hoch ≤ 20). Ruhende intrazelluläre (intraz.) Salmonellen - Annahme, dass es sich hierbei um nicht mehr lebende, aber noch grün-fluoreszierende Erreger handelt, welche auf Grund der Methodik in der mikroskopischen Auswertung erfasst werden. + positiv; - negativ; \approx gleichbleibend; \uparrow ansteigend; \downarrow absteigend; Immunsystem=IS

Tab. 24 Zusammenfassung der Infektionsergebnisse für *S. Typhimurium*

Beobachtete Ergebnisse		Porcine Zellen		Murine Zellen		Humane Zellen	
		IPEC-J2	3D4/31	MODE-K	RAW264.7	LoVo	THP-1a
S. Typhimurium	Steigung <i>m</i> (KbE)	1646,21±126,84 (gering)	8438,26±606,62 (mäßig)	30579,55±3137,39 (hoch)	2651,01±237,48 (gering)	51093,69±5944,82 (sehr hoch)	2893,50±402,99 (gering)
	Zelluntergang 24h <i>p. i.</i> (Mikroskop)	+	-	-	-	-	-
	Ausreißerwerte 24h <i>p. i.</i> Salmonellen/Zelle	+	-	-	+	-	-
	Anzahl rel. infizierter Zellen/Gesamtzellzahl zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	≈	↑	≈	↑	≈	≈
	Gesamtzellzahl/Sichtfeld zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	↓	≈	≈	≈	↓	↓
	Zunahme der Anzahl Salmonellen/Zelle zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	x18,40 (hoch)	x14,46 (mäßig)	x4,65 (gering)	x2,75 (gering)	x5,20 (gering)	x11,83 (mäßig)
Schlussfolgerung	Reinfektion < <u>Zelluntergang</u>	Reinfektion > <u>Zelluntergang</u>	Reinfektion ≈ Zelluntergang	Reinfektion > <u>Zelluntergang</u>	Reinfektion < <u>Zelluntergang</u>	Reinfektion < <u>Zelluntergang</u>	
	<i>m</i> geringer weil inf./geschädigte Zellen abgelöst (Zelluntergang) und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen	<i>m</i> mäßig	<i>m</i> viel höher aufgrund leicht ablösbarer/geschädigter und stark infizierter Zellen	<i>m</i> gering aufgrund schnellem Untergang von Zellen mit wenigen Salmonellen und starke Reinfektion und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen	<i>m</i> viel höher aufgrund leicht ablösbarer/geschädigter und stark infizierter Zellen	<i>m</i> geringer weil inf./geschädigte Zellen abgelöst	
Vergleich zur klinischen Symptomatik der Serovare	Diarrhö und Persistenz	Zeitfaktor ↑ für Immunsystem (IS)	Verbreitung und Diarrhö	Verbreitung und Zeitfaktor ↓ für IS	Diarrhö	Zeitfaktor ↑ für Immunsystem (IS)	

Tab. 25 Zusammenfassung der Infektionsergebnisse für *S. Choleraesuis*

Beobachtete Ergebnisse		Porcine Zellen		Murine Zellen		Humane Zellen	
		IPEC-J2	3D4/31	MODE-K	RAW264.7	LoVo	THP-1a
S. Choleraesuis	Steigung <i>m</i> (KbE)	296,39±23,10 (gering)	4734,60±251,43 (gering)	16230,68±1554,62 (hoch)	7940,66±1271,85 (mäßig)	3448,86±184,83 (gering)	5721,91±111,01 (mäßig)
	Zelluntergang 24h <i>p. i.</i> (Mikroskop)	-	+	-	+	-	+
	Ausreißerwerte 24h <i>p. i.</i> Salmonellen/Zelle	+	+	+	-	-	+
	Anzahl rel. infizierter Zellen/Gesamtzellzahl zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	≈	↓	↓	≈	≈	≈
	Gesamtzellzahl/Sichtfeld zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	≈	≈	≈	≈	≈	≈
	Zunahme der Anzahl Salmonellen/Zelle zwischen 4h-24h <i>p. i.</i>	x15,93 (mäßig)	x15,97 (mäßig)	x5,81 (gering)	x12,04 (mäßig)	x6,87 (mäßig)	x18,36 (hoch)
Schlussfolgerung		Reinfektion ≈ Zelluntergang oder kein Zelluntergang	Reinfektion < Zelluntergang	Reinfektion < Zelluntergang	Reinfektion ≈ Zelluntergang	Reinfektion ≈ Zelluntergang oder kein Zelluntergang	Reinfektion ≈ Zelluntergang
		<i>m</i> geringer weil inf. /geschädigte Zellen abgelöst (Zelluntergang) und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen	<i>m</i> geringer weil inf. /geschädigte Zellen abgelöst (Zelluntergang) und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen	<i>m</i> höher weil inf./geschädigte Zellen abgelöst	<i>m</i> mäßig	<i>m</i> geringer weil inf. /geschädigte Zellen abgelöst (Zelluntergang) und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen	<i>m</i> geringer weil inf. /geschädigte Zellen abgelöst (Zelluntergang) und/oder ruhende/tote intraz. Salmonellen
Vergleich zur klinischen Symptomatik der Serovare		Persistenz, Zeitfaktor ↑ für IS	Verbreitung Zeitfaktor ↑ für IS	Diarrhö	Zeitfaktor ↑ für IS	Persistenz, Diarrhö	Verbreitung, Zeitfaktor ↑ für IS

5.5 Die Bedeutung der *Salmonella*-Wirtsspezifität

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die eigentlichen wirtsadaptierten Serovare in den zugehörigen Zellkultursystemen in geringer Anzahl wieder rekultivierbar waren. Hierbei war es die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis*, welche in signifikant verminderter Anzahl intrazellulär in porcinen Zellen nachweisbar war, sowie die mäusepathogene Serovar *S. Typhimurium*, welche ein ähnliches Bild in den murinen Zelllinien zeigte. Die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*, als Zoonosevertreter, waren jedoch in der Lage, sich intrazellulär besonders gut zu vermehren. Hierdurch konnte in dieser Arbeit experimentell bewiesen werden, dass die wirtsadaptierte Serovar ein verlangsamtes Wachstum und eine verminderte Invasivität in den entsprechenden Wirtssystemen aufwies. Dies bestätigt Ergebnisse der meisten *in vivo* und *in vitro* Invasionsstudien, welche eine verminderte Invasivität von den wirtsspezifischen und/oder wirtsadaptierten Serovaren gegenüber den nicht-wirtsadaptierten Erregern beschrieben (Uzzau *et al.*, 2000). Hierzu zeigten Bueno *et al.* (2008), dass in primären murinen und humanen dendritischen Zellen die intrazelluläre Überlebensrate von *Salmonellen* wirtsspezifisch ist, da in murinen dendritischen Zellen sich vermehrt *S. Typhimurium* Erreger und in humanen dendritischen Zellen vermehrt *S. Typhi* wieder fanden. Auch Vladioianu *et al.* (1990) zeigten, dass *S. Typhi* zwar in humanen, nicht jedoch in murinen Makrophagen überlebt und auf der anderen Seite *S. Typhimurium* zwar in murinen, nicht jedoch in humanen Makrophagen überleben kann. Die wirtsspezifische Serovar *S. Typhi* wies darüber hinaus jedoch eine vergleichbar geringe Invasionsrate und verminderte Epithelzellzerstörung in M-Zellen und Enterozyten auf, jedoch eine höhere Transmigrationsrate in humanen epithelialen Zellkulturen im Vergleich zu *S. Typhimurium* (Kops *et al.*, 1996). Darüber hinaus demonstrierten Pascopella *et al.* (1995) wiederum, dass *S. Typhimurium* in deutlich höherer Anzahl intrazellulär in RAW264.7-Zellen vorkam im Vergleich zu *S. Typhi*.

Zusammenfassend kann somit postuliert werden, dass die Invasion der intestinalen Mukosa zwar unerlässlich für wirtsadaptierte und/oder wirtsspezifische Serovare ist, um jedoch eine systemische Verbreitung zu erlangen, ist dieser invasive Charakter *per se* nicht ausschlaggebend für die *Salmonella*-Wirtsspezifität allein. Denn die Fähigkeit der Erreger, systemisch zu streuen, ist direkt verknüpft mit deren Fähigkeit, in Makrophagen eines bestimmten Wirtes zu überleben. So gesehen sind mononukleäre Phagozyten eines Wirtes eine essentielle Barriere und Bestandteil der Wirtsspezifität von den *Salmonella*-Serovaren. Dies wiederum unterstützt die These, dass das intrazelluläre Überleben der *Salmonellen* wirtsabhängig und nicht serovarabhängig ist.

Entgegen dieser These stehen Arbeiten, welche die *Salmonella*-Wirtsspezifität zumeist auf genetische Unterschiede zwischen den Serovaren hin untersucht haben (Boyd *et al.*, 1996; Kauffmann, 1966; Selander *et al.*, 1990; Stanley und Baquar, 1994; Wilson und Miles 1955). Trotz der zwischen 96-99 % hohen genetischen Sequenzhomologien innerhalb der Gruppe I der *S. enterica* ssp. *enterica* unterscheiden sich die Serovare dennoch deutlich im Schweregrad, der Ausprägung der Krankheitsformen und auch ihrer Wirtsspezifität (Porwollik und McClelland, 2003). Komplette Genomanalysen erbrachten, dass rund 25 % aller *Salmonella*-Gene erst nach der Divergenz von *Escherichia coli* vor über 100 Millionen Jahren über einen horizontalen Gentransfer entstanden sind (Baumler *et al.*, 1998). Neben dem Chromosom von 4,3-5,0 Mbp unterscheiden sich diese *Enterobacteriaceae*-Mitglieder vor

allem im extrachromosomalen genetischen Material wie den Virulenzplasmiden oder den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln, welchen vor allem über den lateralen Gentransfer eine evolutionäre Bedeutung zukommt (Baker und Dougan, 2007; Porwollik und McClelland, 2003). Derzeit wurden bereits 17 verschiedene *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI) beschrieben, welche sich in ihrem G/C-Gehalt vom übrigen Genom unterscheiden und zumeist eine bedeutende Rolle im Infektionsgeschehen spielen (Bueno *et al.*, 2004; Ehrbar *et al.*, 2002; Hensel, 2004; Nair *et al.*, 2004; Valdez *et al.*, 2009; Vernikos und Parkhill, 2006). Saroj *et al.* (2008) konnten jedoch zeigen, dass die Verteilung von SPI in verschiedensten Serovaren unterschiedlicher Herkunft nicht mit deren Wirtsspezifität korreliert. Dies wiederum unterstützt die oben genannte These des wirtsabhängigen intrazellulären Salmonellenüberlebens. Die Virulenzplasmiden hingegen zeigten meist nur eine geringe Homologie zwischen den Serovaren, wie beispielsweise 35 % für die Serovare *S. Dublin* und *S. Enteritidis* (Montenegro *et al.*, 1991). Zwar besitzen viele der Salmonellen das Virulenzplasmid in einer unterschiedlichen Größe und genetischen Zusammensetzung (Chu *et al.*, 1999), als Bestandteil des Virulenzplasmides ist ihnen jedoch allen gleich das 8 kbp große *spv*-Operon. Das *spv*-Operon kommt beispielsweise in *S. Abortusovis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, jedoch nicht in *S. Typhi* vor (Popoff *et al.*, 1984). Die Strukturgene des *spv*-Operon werden vor allem in der postexponentiellen Wachstumsphase unter Nährstoffmangel und Umweltstress exprimiert und besitzen einen Einfluss auf die intrazellulären Wachstumsraten (Gulig und Doyle, 1993; Valone *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass nur die *spvR*-Deletionsmutante von *S. Dublin* eine abgeschwächte enterische und systemische Wirkung besitzt, die *spvR*-Deletionsmutante von *S. Typhimurium* hingegen war nachweislich vollständig virulent (Libby *et al.*, 1997; Tsolis *et al.*, 1999). Hieraus kann geschlossen werden, dass auch das *spv*-Operon allein nicht für die Erklärung der Wirtsspezifität herangezogen werden kann. Darüber hinaus kodieren die Virulenzplasmide auch für Fimbrien, wobei jedes Serovar einen charakteristischen Satz an Fimbrien besitzt und damit zur differenzierten Adhäsion an Wirtszellen beiträgt (Wilson *et al.*, 2000). Es wurde bereits demonstriert, dass beispielsweise Typ 1-Fimbrien oder Flagellin zwar wichtig sind für die Adhäsion, jedoch keine Bedeutung besitzen bei der Invasion oder dem intrazellulären Überleben (Althouse *et al.*, 2003; Crhanova *et al.*, 2011; Duguid *et al.*, 1976). Auch die *fliC*-Gensequenz (Phase I Flagellar-Antigen), welche zwar für die serologische Diversität herangezogen wird, konnte ebenfalls nicht die unterschiedliche Wirtsspezifität von *S. Enteritidis* und *S. Dublin* begründen (Beltran *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1994; Montenegro *et al.*, 1991; Selander *et al.*, 1992). Hieraus kann geschlossen werden, dass auch Fimbrienunterschiede nicht eindeutig mit der Wirtsspezifität von den *Salmonella*-Serovaren korreliert werden können.

Der Einfluss einer genetischen Komponente auf die *Salmonella*-Wirtsspezifität kann jedoch nicht vollends ausgeschlossen werden. In neueren Studien wurden bei wirtsspezifischen Serovaren wie dem *S. Typhi* über 200 inaktivierte/zerstörte Gene nachgewiesen. Diese so genannten Pseudogene, welche ~5 % des Genomes entsprechen, kodieren auch für 7 der 12 Fimbriensysteme, *shdA* und *ratB*, welche bei *S. Typhimurium* wiederum für die Persistenz zuständig sind (Kingsley *et al.*, 2003). Der Verlust von Genen, verantwortlich für die intestinale Adhäsion und Persistenz, geht einher mit der systemischen Streuung und der vermehrten Ausscheidung über die Gallenblase dieser Stämme (Baker und Dougan, 2007). Eine weitere Studie zeigte, dass in der SPI3 von *S. Typhimurium* und *S. Typhi* zehn Gene beider Spezies hoch konserviert vorliegen. Drei von diesen sind jedoch Pseudogene in *S. Typhi* und könnten somit eine potentielle Erklärungen für deren Wirtsspezifität sein.

Hierbei translozierten Retamal *et al.* (2010) das *marT-fidL*-Operon der SPI3 von *S. Typhi* in *S. Typhimurium* und beobachteten eine deutlich verminderte Invasivität in Monozyten. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit und der meisten *in vivo* und *in vitro* Invasionsstudien, welche eine verminderte Invasivität von den wirtsspezifischen und/oder wirtsadaptierten Serovaren gegenüber den nicht-wirtsadaptierten Erregern aufweisen. Bereits von Selander *et al.* (1990) ist darüber hinaus bekannt, dass die wirtsspezifischen Serovare eine geringere genetische Variabilität besitzen, dafür fand sich meist eine große genetische Diversität bei den Wirtsspezialisten. Gezeigt wurde dies auch von Chiu *et al.* (2005) für den schweineadaptierten *S. Choleraesuis*, welcher die höchste Anzahl von Pseudogenen besitzt. Es wurde vermutet, dass der Erreger aufgrund dieser Pseudogene eine verminderte Invasivität und eine deutlich geringere intrazelluläre Vermehrungsrate besitzt und dafür in der Lage ist, aufgrund des verlangsamten Wachstums die immunologische Abwehr zeitweise zu umgehen. Der porcine wirtsspezifische *S. Typhisuis* ist jedoch genetisch nahezu identisch mit dem porcinen wirtsadaptierten *S. Choleraesuis* (Uzzau *et al.*, 1999). Dennoch führt *S. Choleraesuis* im Gegensatz zu *S. Typhisuis* sowohl zu enterischen als auch zu systemischen Symptomen und scheint in klinisch-inapparenten Tieren zu persistieren (Roof *et al.*, 1992).

Dennoch, der Verlust oder das Vorhandensein von *Salmonella*-Genen allein kann nicht erklären, warum ein *Salmonella*-Serovar 1 auf der einen Seite eine systemische Streuung in dem Wirt A verursacht und auf der anderen Seite dasselbe Serovar 1 zu einer geringeren Virulenz und nur zu enterischen Symptomen in dem Wirt B führt. Die Wirtsspezifität kann demzufolge nicht durch das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von Virulenzgenen, durch Mutationen oder lateralen Gentransfer allein geklärt werden. Dies bestätigt Thesen um Baumler *et al.* (1998), denn der Vergleich der genetischen Voraussetzungen der *Salmonella*-Serovare brachte bis dato keine eindeutige Erklärung für dessen Wirtsspezifität. Dies zeigt, dass die Virulenzmechanismen von Salmonellen bisher zwar gut definiert und untersucht worden sind, aber auf Grundlage der Genetik sich bis dato keine eindeutigen Mechanismen für die Wirtsspezifität von den unterschiedlichen Serovaren ergeben haben. Vielmehr ist die Translokation von pathogenen Keimen aus dem Darm in andere Organe von der Fähigkeit des Immunsystems abhängig, diese pathogenen Erreger zu kontrollieren.

Selten befassten sich Arbeiten mit diesem Zusammenhang zwischen Wirt und Erreger und der Bedeutung von wirtszellspezifischen Bestandteilen auf den Ausgang des Infektionsprozesses. Darüber hinaus wurden viele der *Salmonella*-Studien aufgrund der Erkenntnislage vor allem vergleichend zwischen den Serovaren *S. Typhimurium* und *S. Typhi* durchgeführt. In der Literatur finden sich häufig vergleichbare Aussagen zum Einsatz eines murinen Infektionsmodells als brauchbares Konzept zur allgemeinen Untersuchung der Salmonelleninfektion, da *S. Typhimurium* zwar eine Gastroenteritis im Menschen und auch bei Rindern, jedoch ein typhusähnliches Krankheitsbild in Mäusen verursacht. Dieses Modell ist allerdings begrenzt in seinem Aussagewert zu wirtsspezifischen Serovaren. Aufgrund neuerer Kenntnisse ist es nicht möglich, gewonnene Ergebnisse in einem Wirtssystem auf ein Zweites zu übertragen (Girardin *et al.*, 2003a; Magalhaes *et al.*, 2005). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Wirtsproteine, die NOD-Proteine, in unterschiedlicher Weise auf die gleichen Muropeptide reagierten, welches wiederum eine veränderte Immunantwort des Wirtes zur Folge hatte. Darüber hinaus zeigte sich, dass es dem Wirt nur durch eine Vielzahl von bakteriellen Faktoren (MAMPs, Wachstum, Invasivität, Zellskelettmodifikationen etc.) möglich ist, zwischen pathogen und

nicht-pathogenen Erregern zu unterscheiden (Vance *et al.*, 2009). Somit besitzt der Wirt einen essentiellen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion.

5.6 Die NF- κ B-Aktivierung durch eine *Salmonella*-Infektion

NF- κ B besitzt eine zentrale Bedeutung in intestinalen Epithelzellen bei einer Infektion mit enteroinvasiven Erregern, durch dessen Modulation auf die proinflammatorische Genexpression (Elewaut *et al.*, 1999). Hierzu verglichen Watson *et al.* (2000a) *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* in *in vivo* Infektionsstudien. Dabei waren keine serovarspezifischen Unterschiede in der Expression von IL-1, IL-6 und TNF- α sichtbar. Aufgrund der Literaturlage wurde die immunologische Antwort einer Salmonelleninfektion nicht auf Stufe der Zytokinexpression beobachtet, sondern in einem früheren immunologischen Stadium, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Um Divergenzen zwischen den Zelllinien und mögliche Signaltransduktionsregulationen unberücksichtigt zu lassen und dennoch eine vergleichende immunologische Betrachtung durchführen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B und nicht auf die durch Transkriptionsfaktoren induzierten proinflammatorischen Genprodukte gelegt.

Dabei wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *S. Dublin* und *S. Enteritidis* gefolgt von *S. Typhimurium* in den porcinen Zellen (IPEC-J2 und 3D4/31) die höchste NF- κ B-Aktivierung verursachten. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die wirtsadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen im Vergleich zu anderen Serovaren zu einer verminderten NF- κ B-Aktivierung führte. In murinen Zellen (MODE-K und RAW264.7) induzierten *S. Dublin* und *S. Enteritidis* die höchste NF- κ B-Aktivierung. Somit konnte gezeigt werden, dass die wirtsadaptierte Serovar *S. Typhimurium* in murinen Zellen im Vergleich zu anderen Serovaren zu einer verminderten NF- κ B-Aktivierung führte. In den humanen LoVo-Zellen führten *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* Infektionen nach 4h, sowie *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* Infektionen nach 24h *p. i.* zu den höchsten NF- κ B-Aktivierungswerten. Zusätzlich zu den Ergebnissen der Invasionsstudien, dass die wirtsspezifischen bzw. wirtsadaptierten Serovare gegenüber den nicht-wirtsadaptierten Erregern eine verminderte Invasivität aufweisen, konnte somit demonstriert werden, dass darüber hinaus die wirtsadaptierten Serovare *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen zu deutlich verminderten NF- κ B-Aktivierungen führten. Derzeit gibt es keine Hinweise in der Literatur zur verminderten NF- κ B-Aktivierung in porcinen Zellen durch *S. Choleraesuis* oder *S. Typhimurium* in murinen Zellen. Die beobachtete NF- κ B-Aktivierung dieser Arbeit bestätigt jedoch Studien um Hobert *et al.* (2002), diese zeigten in caninen MDCK-Zellen eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern durch die *S. Typhimurium* Infektion 2h *p. i.* bei einer MOI von 30. Auch die *S. Choleraesuis* Infektion führte nach 8, 24 und 48h *p. i.* in porcinen Mesenteriallymphknoten zur NF- κ B-Aktivierung (Wang *et al.*, 2008). Dem entgegen steht die Arbeit um Greil (2002), welche nach 24h *p. i.* kein p65-Protein mehr im Zellkern nach einer *S. Enteritidis* Infektion detektieren konnte. Hierbei wurden Synovialzellen infiziert, diese zeigten nur zwischen 1-6h *p. i.* eine NF- κ B-Aktivierung. Uthe *et al.* (2007) konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die Genexpressionsmuster des Wirtes zwischen *S. Choleraesuis*- und *S. Typhimurium*-infizierten Geweben unterschieden. Hierbei zeigten mit *S. Choleraesuis* infizierte Schweine vor allem in der frühen Phase der Infektion eine verminderte Expression von immunologischen Genen. Dies bestätigt die vorliegenden Daten zur verminderten NF- κ B-Aktivierung von *S. Choleraesuis* in infizierten porcinen Zellen. Nachweislich korreliert

eine geringe intestinale Entzündungsreaktion mit einer geringen immunologischen Antwort der Enterozyten (Kaiser *et al.*, 2000). Dies lässt vermuten, dass eine verminderte NF- κ B-Aktivierung in den epithelialen Zellen die Persistenz des Erregers in diesen Zellen und die Umgehung des Erregers der wirtseigenen immunologischen Abwehr fördern kann.

Lawrence *et al.* (2001) beschrieben hierzu eine antagonistische Wirkung von NF- κ B im späteren Inflammationsgeschehen. Liegt NF- κ B zu diesem Zeitpunkt im aktivierten Zustand vor, so geht dies zumeist mit der Induktion antiinflammatorischer Gene und der Induktion des Zelltodes einher. Im Gegenzug scheint die Inhibierung der NF- κ B-Aktivität im späteren Inflammationsgeschehen die immunologische Reaktion weiter hinauszuzögern, die Expression von p53 und Bax zu vermindern und eine Apoptose zu verzögern. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Abfall der NF- κ B-Luciferaseaktivität und auch die geringere Aktivierung die wirtseigene immunologische Reaktion hinauszögert. Dies würde in dieser Arbeit auf die verminderte NF- κ B-Aktivierung in porcinen Zellen durch *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* in murinen Zellen zutreffen.

Weiterhin bestätigt die Höhe der Relativen Luciferaseaktivitäten dieser Arbeit (2- bis 9-fachen Steigerung der Luciferaseaktivität) die aktuellen Literaturdaten. So konnte in 293-T-Zellen eine ~7-fache Steigerung der Luciferaseaktivität (NF- κ B) durch *Yersinia pseudotuberculosis* nach 4h *p. i.* induziert werden (Auerbuch *et al.*, 2009). Die HEK293 und CaCo-2-Zellen zeigten eine 2-3-fache Steigerung der Luciferaseaktivität (NF- κ B) durch Stimulation mit MDP (10 μ g/ml) nach 6h (Lipinski *et al.*, 2009). Es ist jedoch nicht unproblematisch die erhaltenen RLU dieser Arbeit mit denen anderer Arbeiten zu vergleichen, da zumeist unterschiedliche Plasmide, Protokolle oder Inkubationszeiten verwendet wurden und auch die Transfektionseffizienzen sich zwischen den Arbeitsgruppen stark unterscheiden. Beispielweise zeigten RAW264.7-Zellen 24h *p. i.* nach *Mycoplasma hyopneumoniae* Infektion eine 25-35-fache Steigerung der Luciferaseaktivität (NF- κ B) durch 3-30 μ g/ml Mycoplasmen (Hwang *et al.*, 2011).

Darüber hinaus ist bekannt, dass *S. Typhimurium* in intestinalen Epithelzellen neben einer NF- κ B-Aktivierung auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors aktivierendes Protein-1 (AP-1) führt, über die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 (Galdiero *et al.*, 2002; Hambleton *et al.*, 1996; Hobbie *et al.*, 1997). Das AP-1 bindet über CREB/ATF an cAMP-response elements. (Karin *et al.*, 1997). Maruyama *et al.* (2007) zeigten, dass c-Fos als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 essentiell bei der Zytokinproduktion und der Apoptose nach einer Salmonelleninfektion ist. Die c-Fos-defizienten Mäuse reagierten überempfindlich auf eine *S. Typhimurium* Infektion. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass wiederum die IL-8-Produktion in drei verschiedenen intestinalen Epithelzellen unabhängig vom Transkriptionsfaktor AP-1 ist. Hierzu zeigten Hobbie *et al.* (1997), dass in *Salmonella*-infizierten Henle-407-Zellen neben NF- κ B auch der Transkriptionsfaktor AP-1 für eine erfolgreiche IL-8-Produktion vorhanden sein muss. Da es nicht um die Unterscheidung der einzelnen Transkriptionsfaktoren, sondern lediglich um eine allgemeingültige Aussage zum Aktivierungszustand infizierter Zellen ging, wurde in der vorliegenden Arbeit allein das Augenmerk auf NF- κ B gelegt. Hierbei wird empfohlen, den Einfluss von NF- κ B auf die Infektion genauer zu untersuchen, indem der Inhibitor MG132 genutzt wird.

5.7 Die Unterdrückung der zellulären NF-κB-Aktivierung durch die *Salmonella*-Infektion

Die NF-κB-Aktivierungsversuche in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass Zellen nach Stimulation mit UV-inaktivierten Salmonellen für 2h, nicht jedoch mit LPS allein, deutlich mit einer Steigerung der Relativen Luciferaseaktivität (NF-κB) reagierten. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit UV-inaktivierten Salmonellen im Vergleich zur Infektion mit lebenden *S. Typhimurium* in allen fünf Zellkultursystemen zu einer signifikant höheren NF-κB-Antwort führte. Die Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen allein, wie dem *Salmonella*-Flagellin konnte durch Rolli *et al.* (2010) bei *in vivo* Maus-Versuchen gezeigt werden. Hierbei führte *Salmonella*-Flagellin (1µg/Maus) zur IκBα-Degradierung und NF-κB-DNA-Bindung in verschiedenen murinen Organen nach bereits 30-minütiger Inkubationszeit. Reed *et al.* (2002) wiesen hierzu nach, dass eine IκBα-Degradierung durch *S. Typhimurium* von einem intakten *Salmonella*-Flagellum und TLR5 abhängt. Im Gegenzug wurde gezeigt, dass *Salmonella*-Flagellin auch eine TLR5-unabhängige Aktivierung über CARD12 in Makrophagen indizieren konnte (Franchi *et al.*, 2006a; Mariathasan *et al.*, 2004). Diese bakteriellen Bestandteile, hier beispielsweise Flagellin, gelangten über die T3SS der SPI1 in das Wirtszellzytoplasma und führten zur Aktivierung und/oder zum Zelluntergang (Miao *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006).

Eine vom lebenden Bakterium abhängige Verminderung der NF-κB-Antwort wurde bereits für das NleE- und NleB-Protein von enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und für das Tcps-Protein von *E. coli* und *Brucella melitensis* beschrieben (Cirl *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009; Nadler *et al.*, 2010; Newton *et al.*, 2010). Auch für die Erreger *Shigella flexneri* (OspG), *Yersinia* spp. (YopJ), *Aeromonas salmonicida* (AopP), *Chlamydia trachomatis* (ChlaDub1) und weitere wurden bereits NF-κB-minimierende Effektorproteine beschrieben (Fehr *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Le Negrate *et al.*, 2008b; Mukherjee *et al.*, 2006; Ruckdeschel *et al.*, 1998). Bekanntermaßen kann die zelluläre Wirtsimmunantwort auch durch *Salmonella*-Effektorproteine unterdrückt werden. Hierzu gehören die Effektorproteine AvrA, SigD/SopB, SseL, SspH1 und TlpA. Das AvrA-Protein vermindert die zelluläre NF-κB-Antwort der Wirtszelle und stabilisiert die Integrität des epithelialen Layers (Collier-Hyams *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2008a; Liao *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2007). SseL, ein Effektorprotein der SPI2, fungiert hingegen als Deubiquitinase und vermindert die immunologische Wirtszellantwort (Le Negrate *et al.*, 2008a; Rytönen *et al.*, 2007). Ebenso kann das SspH1 über die Aktivierung der Proteinkinase N1 die wirtszelleigene NF-κB-Aktivierung vermindern (Haraga und Miller, 2003). Das TIR-ähnliche Protein A (TlpA) verhindert über die Hemmung von TIR-haltigen Proteinen, wie TLR4, IL-1-Rezeptor oder MyD88, die NF-κB-Aktivierung (Newman *et al.*, 2006). SigD/SopB kann die Proteinkinase B (PKB) der Wirtszelle aktivieren und somit die Apoptose der Wirtszelle verhindern (Knodler *et al.*, 2005). Neish *et al.* (2000) zeigten hierzu, dass auch PhoP^c in der Lage ist, den proinflammatorischen NF-κB-Signalweg zu minimieren. In diesem Zusammenhang führten Streckel *et al.* (2004) Expressionsprofile von *Salmonella enterica* Effektorproteinen durch. Hierbei zeigte sich, dass AvrA nur von 80 % der *S. enterica* Serovare gebildet wurde. Wohl aber konnte das Expressionsprofil durch Veränderung der Umweltbedingungen (pH, Temperatur) variiert werden, dies galt vor allem für *S. Agona*, *S. Bovismorbificans* und *S. Virchow*. AvrA wurde vor allem in Gastroenteritis-auslösenden Serovaren gefunden. Dennoch traten klinische *S. Enteritidis* Serovare auf, welche kein AvrA

und SopD1 exprimierten (Streckel *et al.*, 2004). Auch dies unterstützt die Entscheidung, in der vorliegenden Arbeit nur bereits klassifizierte und keine klinischen *Salmonella*-Isolate zu verwenden. Die wirtsspezifischen und -adaptierten *S. Typhi* und *S. Choleraesuis* exprimieren kein AvrA, jedoch das wirtsadaptierte *S. Dublin* besitzt wiederum AvrA (Amavisit *et al.*, 2003). Die SseL- und SopB-Proteine, werden hingegen von allen *Salmonella enterica* Serovaren mit intakter SPI2 exprimiert (Cooper *et al.*, 2010; Rahman, 2006), und damit auch von allen vier in dieser Arbeit verwendeten Serovaren.

Das Vorhandensein von AvrA in *S. Typhimurium* könnte somit die verminderte NF- κ B-Aktivierung durch lebende, invasive Erreger im Vergleich zu den UV-inaktivierten Salmonellen erklären. Damit nutzen die in dieser Arbeit verwendeten Erreger möglicherweise die oben beschriebenen Mechanismen über AvrA, SigD/SopB, SseL und/oder SspH1, um die zelleigene Immunantwort des Wirtes zu minimieren. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten zell- und wirtsspezifischen Unterschiede in der NF- κ B-Antwort (vermindertes NF- κ B bei *S. Choleraesuis* nur in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* nur in murinen Zellen) können jedoch das alleinige Vorhandensein von einzelnen *Salmonella*-Genen nicht erklären. Somit besitzen die Erreger sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mechanismen, welche in einem zell- und gewebespezifischen Gleichgewicht vorliegen.

5.8 Die geringe NF- κ B-Aktivierung durch bakterielles LPS

Um die Frage zu beantworten, ob bakterielle Bestandteile allein eine NF- κ B-Aktivierung auslösen könnten, wurden die Zellkulturen sowohl mit lebenden als auch mit UV-inaktivierten Salmonellen und *Salmonella*-LPS behandelt. Hierbei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine LPS-Stimulation (50ng für 2h) in den fünf verschiedenen Zelllinien nur eine geringe Steigerung der NF- κ B-Luciferaseaktivität bewirkte (~2,5-facher Anstieg). Dafür zeigten die Zellen jedoch deutliche NF- κ B-Aktivitäten durch Stimulation mit UV-inaktivierten *S. Typhimurium* (2h) und lebenden *Salmonella*-Serovaren (1,5-2h).

Lipopolysaccharid besteht aus drei Untereinheiten: einer äußeren variablen Polysaccharidschicht, dem Kernbestandteil aus Oligosacchariden und dem inneren Lipid A. Nachgewiesenermaßen ist das Lipid A für die proinflammatorischen Immunantworten nach LPS-Stimuli verantwortlich. Es besteht aus hexaacetylierten bis-1,4'-phosphoryliertem Glukosamindisaccharid (Caroff *et al.*, 2002; Luderitz *et al.*, 1973). LPS wird *in vivo* und auch *in vitro* zur Imitierung eines Infektionsmodells eingesetzt. LPS ahmt hierbei die inflammatorischen Effekte der Zytokine TNF- α , IL-1 β oder IL-6 nach und hat einige bedeutende Vorteile gegenüber dem Einsatz von Zytokinen: es ist kostengünstiger, es ist nicht auf Speziesunterschiede limitiert und es führt generell zu einer stabilen und allgemeinen Immunantwort im Gegensatz zu einzelnen Zytokinen (Mitchell *et al.*, 2007). Es sei darauf hingewiesen, dass die Heterogenität kommerziell erhältlichen LPS von Martinon *et al.* (2004) gezeigt wurde und zumeist geringe Mengen an Peptidoglykanen (PGN) und auch Muramyl-dipeptide (MDP) enthält. Aufgrund dessen konnte eine derartige Heterogenität auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen LPS nicht ausgeschlossen werden. Dennoch wurde bereits erfolgreich gezeigt, dass eine TLR-induzierte immunologische Antwort durch extrazytoplasmatisches PGN nicht möglich ist, da hierzu intrazytoplasmatische NOD-Proteine benötigt werden (Inohara *et al.*, 2003; Travassos *et al.*, 2004). Somit konnte diese Heterogenität von kommerziell erhältlichen LPS in dieser Arbeit vernachlässigt werden.

Auch für den LPS-Stimulus können aufgrund von unterschiedlichen Plasmiden, Protokollen und Transfektionseffizienzen die erhaltenen Daten dieser Arbeit nur bedingt mit denen anderer Arbeiten verglichen werden. Beispielweise konnte in RAW264.7-Zellen, welche durch LPS (1 µg/ml) stimuliert wurden, eine bis zu 30-fache Steigerung der Luciferaseaktivität (NF-κB) nachgewiesen werden (Hwang *et al.*, 2011). Demgegenüber stehen Arbeiten um Lindgren *et al.* (1996), die wiederum zeigten, dass weder bakterieller Überstand noch UV-inaktivierte oder hitzeinaktivierte Salmonellen in murinen J774A.1-Makrophagen zu einer immunologischen Zellreaktion führten. LPS zeigte darüber hinaus ebenfalls keine stimulatorischen Effekte in epithelialen HT-29- oder CaCo-2-Zellen bei eingesetzter Konzentration von bis zu 1 µg/ml im NF-κB-Luciferaseassay oder mittels IL-8 ELISA (Bambou *et al.*, 2004).

Möglicherweise erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität 4h nach Stimulusgabe für die Detektierung von NF-κB in dieser Arbeit zeitlich gesehen zu spät. Einen möglichen Hinweis hierfür gab Wu *et al.* (2008), welche zeigten, dass eine NF-κB-Aktivierung zwischen 30-120min nach der LPS-Stimulation stattfand. Dies bestätigt die IκB-α-Degradierung durch bakterielles LPS (50 ng/ml) nach bereits 5min für bis zu 30min in Knochenmarksmakrophagen durch Kenny *et al.* (2009) und Brown *et al.* (2010). Beispielsweise induzierte 10 ng/ml LPS für 2h in m-IC_{cl2}-Zellen einen 20-fachen Anstieg der Luciferaseaktivität (NF-κB) (Hornet *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang verglichen Palazzo *et al.* (2008) den Einfluss von verschiedenen MAMPs auf die unterschiedliche Proteinexpression zwischen intestinalen Epithelzellen und Makrophagen *in vitro*. TLR4 wird durch Stimulierung mit 1µg/ml LPS, 100ng/ml Flagellin oder 10µg/ml PGN in HT29-Zellen deutlich herabreguliert, jedoch hochreguliert in RAW264.7-Zellen. Chen *et al.* (2007) zeigten hingegen in intestinalen IEC-6-Zellen, dass TLR2 hoch- und TLR4 herunterreguliert wird durch den Einfluss von 5µg/ml LPS. Moue *et al.* (2008) wiederum demonstrierten, dass LPS in porcinen intestinalen Epithelzellen zur vermehrten Expression von Rezeptoren, Zytokinen und Chemokinen führt. LPS zeigt somit einen zelltypspezifischen Einfluss auf die immunologische Reaktivität der Wirtszellen.

Weiterhin entstehen durch die Stimulation mit LPS die klassisch-aktivierten M1-Makrophagen. Nachweislich resultiert diese Typ I-Aktivierung wiederum in der Expression von T_H1-Zytokinen (z. B. IFN-γ, TNF-α) (Benoit *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2008). Daraufhin darf angenommen, dass somit auch Folgeprodukte der NF-κB-Aktivierung durch LPS eine wesentliche Rolle spielen könnten. Somit würde das von aktivierten Zellen gebildete TNF-α wiederum erneut als Stimulus für diese Zellen dienen. Dies könnte die steigende NF-κB-Luciferaseaktivität in den Makrophagen zwischen 4h und 24h *p. i.* in dieser Arbeit erklären.

Darüber hinaus finden sich in Säugern verschiedene NF-κB-Varianten, welche als Dimere im Organismus vorliegen (Hayden und Ghosh, 2004). Fünf verschiedene NF-κB/Rel-Proteine bringen mehr als 12 verschiedene Dimere hervor, welche wiederum 9 bis 11 unterschiedliche κB-Bindungsstellen im Genom erkennen (Saccani *et al.*, 2003). Die Konsensus-Sequenz der κB-Bindungsstellen lautet gggRnnYYcc (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase, n = Nicht definiert). Das in dieser Arbeit verwendete Plasmid mit der κB-Bindungsstelle besaß folgende Sequenz (TGGGGACTTTCCGC)₅. Derzeit ist nicht bekannt, welche κB-Bindungsstellen in den in dieser Arbeit verwendeten Zellkultursystemen vorkommen. Es kann vermutet werden, dass sowohl unterschiedliche NF-κB/Rel-

Heterodimere als auch unterschiedliche κ B-Bindungsstellen in den Zellkultursystemen vorhanden sind. Dies hätte somit einen entscheidenden Einfluss auf die Messung der NF- κ B-Aktivierung. Diese These wird durch Arbeiten um Frankenberger und Ziegler-Heitbrock (1997) bestätigt, denn es konnte nachgewiesen werden, dass kleinste Differenzen in der Sequenz der κ B-Bindungsstellen zu verminderten immunologischen Zellreaktionen führten. Diese Feinregulation der Zellantwort ist somit wirtsspezifisch.

Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NF- κ B in den fünf Zellkultursystemen aktiviert wurde. Jedoch resultierte die Stimulation mit UV-inaktivierten Salmonellen in einer deutlich höheren NF- κ B Antwort als das *Salmonella*-LPS. Daraus konnte folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Die höhere NF- κ B-Induktion bei UV-inaktivierten Salmonellen spricht für die bakterielle Zellwand als stärkerer pathogener Faktor im Vergleich zum LPS allein. Auch wenn die LPS-Stimulation in dieser Arbeit zu keiner statistisch signifikanten NF- κ B-Aktivität geführt hat, so war es dennoch essentiell, reines LPS als Kontrollwert beim Versuchsablauf zu verwenden. Aufgrund der unterschiedlichen Invasivität und Reproduktion (intra- und extrazellulär) von den verschiedenen Serovaren kann davon ausgegangen werden, dass die Menge an vorliegendem Gesamt-LPS in der infizierten Zellkultur von Serovar zu Serovar unterschiedlich war. Somit wäre ein LPS-Konzentrationsunterschied bedeutsam. Hierzu wurde im Vorfeld der Arbeit ein NF- κ B-Aktivierungsversuch mit einer LPS-Konzentrationsreihe (10, 50, 100, 500 ng) durchgeführt. Auch geringere Konzentrationen von 10 ng ergaben jedoch keine deutliche Steigung der Luciferaseaktivität. Hingegen führten deutlich höhere LPS-Gaben von bis zu 500 ng zum Ablösen des Zellmonolayers (Daten nicht gezeigt). Somit sollten in weiterführenden Studien UV-inaktivierte Erreger immer in Kombination mit einzelnen Zellwandbestandteilen bei *in vitro* Stimulationsversuchen vergleichend untersucht werden.

5.9 Die Modifizierung von MAMPs um die NF- κ B-Aktivierung zu umgehen

Es konnte gezeigt werden, dass eine LPS-Stimulation (50ng für 2h) in den fünf verschiedenen Zelllinien nur eine geringe Steigerung der NF- κ B-Luciferaseaktivität bewirkte (~2,5-facher Anstieg). Dafür besaßen die Zellen jedoch deutliche NF- κ B-Aktivitäten durch Stimulation mit UV-inaktivierten *S. Typhimurium* und lebenden *Salmonella*-Serovaren. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche der NF- κ B-Luciferaseaktivität dieser Arbeit könnte die unterschiedliche LPS-Zusammensetzung zwischen den lebenden, den UV-inaktivierten Salmonellen und dem *Salmonella*-LPS sein.

Hierzu gibt es zahlreiche Hinweise, welche zeigten, dass LPS-Mutanten eine deutlich verminderte Invasivität in Zellkulturen aufwiesen (Kihlstrom, 1977; Mroczenski-Willey *et al.*, 1989). Bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure stehen im Zusammenhang mit der Auslösung des septischen Schockgeschehens (Van Amersfoort *et al.*, 2003). Die LPS-Ansprechbarkeit der Wirtszellen stellt einen wichtigen Faktor in der angeborenen antibakteriellen Abwehr dar (Freudenberg *et al.*, 2001). Nachweislich werden O-Antigene in *S. Typhimurium* phasenvariabel unterschiedlich exprimiert, so dass sich daraufhin die Adhäsivität der Erreger verbessert (Kwan und Isaacson, 1998). Darüber hinaus wurde auch zwischen Serovaren eine Mikroheterogenität der O-Antigenregion nachgewiesen (Parker *et al.*, 2001). Die Modifizierung der Lipid A-Region von LPS ist ein Selektionsvorteil der Mikroben und ermöglicht ihnen das intrazelluläre Überleben (Ernst *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 2005;

Miller *et al.*, 2005). Diese Modifizierungen beinhalten Fettsäureanlagerungen, Fettsäure-Hydroxylierungen von, Anlagerung von Phosphat- oder Galakturonsäuregruppen, Addition von Phosphoethanolamin oder 4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose an Lipid A und Acetylierungen der Polysaccharidkette (Firdich und Whitfield, 2005; Gunn, 2001). Tsolis *et al.* (1999) konnten bereits nachweisen, dass eine *S. Typhimurium rfaJ*-Deletionsmutante, welche eine gestörte Lipopolysaccharid-Biosynthese besitzt, nachweislich eine verminderte Virulenz aufwies. Vladoianu *et al.* (1990) beschrieben wiederum, dass die Zusammensetzung des LPS ein bedeutender Faktor bei der Virulenz eines Erregers und bei dessen Resistenz gegenüber dem intrazellulären Abbau ist. Salmonellen mit glattem LPS waren resistenter gegenüber dem lysosomalen Abbau und zeigten deutliche Invasionsunterschiede gegenüber *S. Typhimurium* mit rauem LPS (Kihlstrom, 1977; Modrzakowski und Spitznagel, 1979; Tagesson und Stendahl, 1973). Bereits 1989 konnte bestätigt werden, dass PhoP essentiell für die Virulenz von *S. Typhimurium* im murinen Modell sowie für das Überleben in Makrophagen ist und somit eine PhoP-Deletionsmutante avirulent sein musste (Fields *et al.*, 1989; Galan und Curtiss, 1989). In diesem Zusammenhang zeigten Guo *et al.* (1997), dass PhoP-PhoQ die strukturelle Modifizierung von Lipid A regulierte. Entsprechend zeigten die PhoP^c und PhoP⁻-Mutanten eine verminderte TNF- α Antwort. Auch die Deacylierung von Lipid A in der LPS-Salmonellenmutante führt nachweislich zu einer verminderten TNF- α , IL-1 und NO-Produktion *in vitro* als auch *in vivo* (Khan *et al.*, 1998). Andere gramnegative Erreger wie *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Francisella* und *Yersinia* sind ebenfalls in der Lage, ihre Lipid A-Region bzw. LPS-Struktur als Antwort auf Umwelteinflüsse zu modifizieren (Augustin *et al.*, 2007; Cowley *et al.*, 1996; Oyston *et al.*, 2000; Ernst *et al.*, 1999, van Putten und Robertson, 1995). Darüber hinaus können auch die *long polar fimbriae* (Lpf) modifiziert werden, um somit einen Einfluss auf die Virulenz der Serovare zu nehmen (Norris *et al.*, 1999). Diese Modifikationen spiegeln sich in den festgelegten *Salmonella*-Klassifizierungsschemata wider. Die biologische Begründung liegt jedoch darin, dass Wirtszellenzyme die Strukturbestandteile der Erreger (hier bakterielle Zellwandbestandteile) nicht oder nur schlecht verwerten können und dass somit nur geringe Mengen an Erkennungsstrukturen vom Wirtsimmunsystem signalisiert werden können. Dies wiederum führt zu einer verminderten immunologischen Reaktion des Wirtes auf zellulärer Ebene und stellt somit einen evolutionären Vorteil der Erreger dar.

Darüber hinaus zeigten Arbeiten, dass *Salmonella*-LPS nicht nur in der *Salmonella*-containing-vacuole, sondern auch im Wirtszytosol vorkommt (Garcia-del Portillo *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass Salmonellen zu einer Freisetzung bioaktiver mikrobieller Substanzen wie beispielsweise LPS in der Lage sind. Darüber hinaus zeigten die Arbeiten von Hersh *et al.* (1999), Mariathasan *et al.* (2004) und Miao *et al.* (2006), dass bei der Salmonelleninfektion rein zytoplasmatische Proteine der Immunantwort aktiviert werden. In diesem Zusammenhang kann mit hoher Wahrscheinlichkeit vermutet werden, dass Salmonellen nicht nur LPS, sondern auch bakterielles PGN und weitere bakterielle Bestandteile in das Wirtszellzytoplasma schleusen. PGN von gramnegativen und grampositiven Erregern wiederum ist ein Polymer aus β 1 \rightarrow 4 N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure, verbunden über kurze Peptidbrücken. Diese Peptidbrücken bestehen aus vier bis fünf D- und L-Aminosäuren und unterscheiden sich in ihrem Aufbau zwischen verschiedenen Bakterienspezies. (Schleifer und Kandler, 1972). PGN-Monomere sind nachweislich Stimulatoren der angeborenen Immunantwort, darüber hinaus spielen sie ebenso eine Rolle bei der mikrobiellen Interaktion und der Pathogenese in Tieren und Pflanzen (Cloud-Hansen

et al., 2006). Swaminathan *et al.* (2006) zeigten, dass die Bindung von PGN durch PRR eine hohe Selektivität und geringe Affinität besitzen. Bereits geringe Strukturunterschiede haben somit einen Einfluss auf die Detektion auf zellulärer Ebene. Auf der anderen Seite sind PRR in der Lage über Amplifizierungen oder über Homo- und auch Oligodimerisierung eine gesteigerte Spezifität zu erreichen. Durch Mutationen der kodierenden Sequenz im Bereich der Aminosäuren 236 und 237 können PRR beide PGN-Muster anhand der Strukturunterschiede in der 3. Peptidposition erkennen (Swaminathan *et al.*, 2006). Porcines PRR führt über die vermehrte Produktion von β -Defensin1 zu einer Inhibierung bakteriellen Wachstums im Darm. Die pPRR-L2 (auch pPGRP-L2) -Expression wird hierbei durch eine Salmonelleninfektion angeregt (Sang *et al.*, 2005). Pathogene jedoch variieren beispielsweise die α -Carboxylsäure der Iso-Glutaminsäure von PGN und können somit die Erkennung über PRR durch das Wirtsimmunsystem umgehen (Ellouz *et al.*, 1974). Ein wichtiger Bestandteil dieses Prozesses ist NOD1 (Wolfert *et al.*, 2007). Die Modifizierung von MAMPs, hier des PGN, scheint eine bakterielle Strategie zu sein, um die angeborenen Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen. Hierzu zeigten Boneca *et al.* (2007), dass die PgdA, eine Deacetylase von *Listeria monocytogenes*, durch die spezifische Anlagerung von N-Acetylglukosamin die PGN-Struktur des Erregers variieren kann. Die PgdA-Deletionsmutante zeigte eine verminderte Virulenz *in vivo* sowie eine gesteigerte NOD1-abhängige IFN- β Antwort. In ähnlicher Weise arbeitet auch die PGN-Hydrolase AmiA von *Helicobacter pylori*, welche es dem Erreger ermöglicht, die Detektion durch NOD1 zu minimieren (Chaput *et al.*, 2006). Auch *Shigella*-Spezies modulieren ihre PGN-Zusammensetzung *in vivo* und beeinflussen somit nachweislich die immunologische Wirtsreaktion (Nigro *et al.*, 2008). Die strukturelle Änderung von MAMPs ist eine bakterielle Evolutionsstrategie und dient der Umgehung der wirtseigenen angeborenen Abwehr, um somit das Überleben des Erregers zu sichern. Es kann somit vermutet werden, dass die unterschiedlichen Serovare dieser Arbeit Mechanismen zur Modifizierung ihrer Zellwandmoleküle nutzen.

5.10 Die Korrelation der Daten aus den Infektionsversuchen mit den NF- κ B-Aktivierungsversuchen und die Rolle des Faktors Zeit

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein positiver linearer Zusammenhang in den epithelialen Zellen zwischen der Invasion mit *S. Dublin* und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung, sowie ein negativer linearer Zusammenhang in den epithelialen Zellen zwischen der Invasion mit *S. Enteritidis* und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung über den Zeitraum 4h bis 24h *p. i.* gezeigt. Darüber hinaus konnte dargestellt werden, dass nach 24h *p. i.* *S. Enteritidis* einen positiven linearen Zusammenhang für die Infektion von Makrophagen im porcinen und murinen System (3D4/31 und RAW264.7) und der darauf folgenden NF- κ B-Aktivierung besitzt. Humane LoVo-Zellen zeigten einen positiven linearen Zusammenhang 4h *p. i.*, jedoch nach 24h *p. i.* einen negativen linearen Zusammenhang für die Infektion mit *S. Typhimurium* und die NF- κ B-Aktivierung. Dies ist die erste beschriebene Korrelation für die Erreger *S. Typhimurium*, *S. Choleraeuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis* in den fünf verwendeten Zellkultursystemen. Die erhobenen Daten bestätigen die These, dass der Wirtsorganismus, besser dessen Immunantwort, eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung eines klinischen Bildes besitzt. Dies wird durch Untersuchungen um Okamura *et al.* (2005) bestätigt. Diese beobachteten die gebildeten Stickstoffmonoxid-Mengen und das unterschiedliche Apoptoseverhalten von Hühnermakrophagen durch den Infektionseinfluss

von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Es wurde gezeigt, dass *S. Enteritidis* durch eine geringere Immunantwort eine Zerstörung durch das Immunsystem verzögern könnte. Dies entspricht den in dieser Arbeit gefundenen negativen Korrelationsdaten. *S. Typhimurium* hingegen erzeugte, gemessen an der NO-Menge, eine höhere Immunantwort und wurde deshalb vom Immunsystem schneller eliminiert. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Persistenz von *S. Typhimurium* in einer Vielzahl von Makrophagen unterschiedlicher tierischer Herkunft mit deren Fähigkeit einer breiten Wirtsspezifität korreliert (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995; Ishibashi und Arai, 1996). So gesehen sind mononukleäre Phagozyten eines Wirtes eine essentielle Barriere und Bestandteil der Wirtsspezifität der *Salmonella*-Serovare (Bueno *et al.*, 2008; Watson *et al.*, 2000b).

Daraus kann geschlossen werden, dass Erreger die in dem infizierten Wirt zu einer schnellen und hohen Immunantwort führen, daraufhin auch schneller vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Andererseits können Erreger, welche nur eine geringere Wirtsimmunantwort hervorrufen, damit ihre eigene Eliminierung verzögern und haben somit die Möglichkeit zur effektiveren Verbreitung oder Streuung im Organismus. Dieser Faktor wird in dieser Arbeit schlicht als 'Zeit' deklariert. Diese Hypothese bestätigt Ansätze von Okamura *et al.* (2005). Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit dieser Zusammenhang graphisch dargestellt werden. Mit Hilfe von zwei y-Achsen für zum einen die intrazelluläre Vermehrung (KbE) und auf der anderen Seite die NF- κ B-Aktivierung konnte über die Zeit (*p. i.*) dargestellt werden, dass die nicht-wirtsadaptierten *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* für das Schwein und den Menschen in porcinen Zellen und den humanen Zellen einen deutlichen Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zur NF- κ B-Antwort erzeugten. Im Gegenzug zeigten die wirtsadaptierten *S. Choleraesuis* (Schwein) und *S. Dublin* (Rind) in den porcinen Zellen und auch in den humanen LoVo einen deutlich geringeren Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert. Übergreifend scheinen somit porcine Zellen den humanen Zellen in ihrer Reaktion auf eine Salmonelleninfektion mehr zu gleichen, als es humane und murine Zellen tun (Abb. 35). Dies entspricht den klinischen Befunden, dass die wirtsadaptierten Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* bei humanen Erkrankungsfällen eine größere Neigung zur Bakteriämie mit geringen oder keinen intestinalen pathologischen Anzeichen aufweisen (Bhutta, 2007; Chiu *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2009). Darüber hinaus bestätigten diese Daten die Arbeiten von Foley *et al.* (2008) und Moxley und Duhamel (1999), dass *S. Choleraesuis* in porcinen Blutphagozyten persistieren und somit systemisch streuen kann. Die mäusepathogene *S. Typhimurium* Serovar hingegen und *S. Enteritidis*, welche ebenfalls zu Bakteriämien in Mäusen führt, zeigten in murinen Makrophagen und zumindest teils auch in murinen Epithelzellen einen geringeren Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert. Dies wiederum bestätigt die Beobachtungen zum typhoiden Krankheitsbild in der Maus ausgelöst durch *S. Typhimurium* Infektionen, welche hingegen in Rindern und beim Menschen meist zu einer Enteritis führen (Jenkin und Rowley, 1963; Santos *et al.*, 2001). Dies gilt auch für den nicht-wirtsadaptierten Erreger *S. Enteritidis*, dieser führt zwar beim Menschen zu einer selbstlimitierenden Gastroenteritis, jedoch bei Ratten und Mäusen zu einer Bakteriämie und zu systemischen Infektionen. Bei diesem Vergleich der schematischen Darstellung der Ergebnisse mit den bekannten klinischen Bildern in den Wirtssystemen wird deutlich, dass der Faktor 'Zeit' eine entscheidende Rolle auf den Ausgang und den Verlauf der klinischen Salmonelleninfektion besitzt. Die adaptierten Serovare zeigten ein deutlich vermindertes intrazelluläres Wachstum im

Vergleich zur Höhe der NF- κ B-Antwort und die nicht-adaptierte Serovare eine deutliche Zunahme der intrazellulären Salmonellen im Vergleich zur Höhe der NF- κ B-Antwort. Die wirtsadaptierten Erreger haben somit die Möglichkeit, die immunologische Abwehr des Wirtes zu umgehen, um dann systemisch im Wirt zu streuen. Dies bestätigt die Lehrauffassung, dass die wirtsadaptierten Erreger auch zumeist Auslöser von Bakteriämien sind. Die nicht-wirtsadaptierten Erreger hingegen vermehren sich zwar schneller, induzieren aber auch eine schnellere immunologische Abwehr und werden somit effektiver und zügiger vom Immunsystem erkannt und eliminiert, die Infektion bleibt somit lokal begrenzt im Organismus. Dies wiederum bestätigt die Lehrauffassung, dass die nicht-wirtsadaptierten Erreger zumeist Auslöser von Gastroenteritiden sind.

Zusammen mit den erhobenen Daten der Infektions- und Chemolumineszenzversuche dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die eigentlichen wirtsadaptierten Serovare in den zugehörigen Zellkultursystemen (1) eine geringe Invasivität aufwiesen, (2) eine geringere intrazelluläre Vermehrungsrate aufwiesen und (3) eine geringere NF- κ B-Luciferaseaktivität induzierten. Dies konnte nachgewiesen werden für die schweineadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen, sowie die mäusepathogene Serovar *S. Typhimurium* in den murinen Zelllinien. Daraus folgt, dass die in dieser Arbeit verwendeten Serovare eine verminderte Immunantwort (NF- κ B-Aktivierung) und ein vermindertes intrazelluläres Wachstum (KbE) nur dann zeigten, wenn es sich um wirtsadaptierte Serovare in dem dazugehörigen Wirtssystem handelte.

5.11 Die NOD-Expression

In dieser Arbeit erfolgte erstmals der Nachweis der NOD-Genexpression für die beiden porcinen Zellkulturen 3D4/31 und IPEC-J2, das porcine Darmgewebe sowie für die epithelialen LoVo- und MODE-K-Zellen. Die Genexpression von NOD1 und NOD2 in THP-1- und RAW264.7-Zellen dieser Arbeit bestätigt die Versuche um Takahashi *et al.* (2006) und Uehara *et al.* (2005). NOD1 wurde in allen sechs verwendeten Zellkulturen auf mRNA-Ebene detektiert. Dies bestätigt die Erkenntnisse, dass NOD1 ubiquitär im adulten Organismus exprimiert wird, hier vor allem in antigenpräsentierenden Zellen, Lymphozyten und auch Epithelzellen (Gutierrez *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2001a). NOD2 wurde ebenfalls in allen sechs verwendeten Zellkulturen auf mRNA-Ebene detektiert. Dies bestätigt die Nachweise von NOD2 in Makrophagen, Keratinozyten, intestinale Epithelzellen, Lungenzellen, Nierenzellen und Osteoblasten (Hisamatsu *et al.*, 2003a und 2003b; Marriott *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2001b; Shigeoka *et al.*, 2010; Uehara *et al.*, 2007; Voss *et al.*, 2006). Dem entgegen stehen Arbeiten, welche beschrieben, dass NOD2 vermehrt in Zellen der myeloiden Reihe exprimiert wird, und in intestinalen Epithelzellen induziert werden kann. In primären epithelialen Zellkulturen scheint jedoch diese NOD2-Expression auf die Panethzellen beschränkt zu sein (Ogura *et al.*, 2003a). In dieser Arbeit wurde der NOD-Nachweis allein durch die Expression auf mRNA-Ebene untersucht, es können keine Aussagen zur Proteinebene und auch zur Menge der vorliegenden mRNA gemacht werden. Hierzu wird empfohlen, die NOD-Proteine mittels Western Blot und Immunfluoreszenzen oder die mRNA-Menge mit Hilfe der quantitativen *Real-time*-PCR zu überprüfen, um darüber hinaus auch einen Einfluss der Stimulation mit *Salmonella* auf die Expressionsmenge von NOD zu untersuchen.

5.12 Die Bedeutung des Sequenzvergleiches und Rolle des porcinen NOD

In der vorliegenden Arbeit wurde porcines NOD1 und NOD2 sequenziert und mit bestehenden Sequenzen verglichen. Hierbei wiesen die porcinen Aminosäuresequenzdaten von NOD1 und NOD2 eine 90,1 % bzw. 88,3 % Homologie mit humanem sowie eine 90 % bzw. 86,2 % Homologie mit murinem NOD auf. Die Daten zeigten, dass porcines NOD höhere Homologien mit dem humanen NOD als humanes NOD mit dem murinen NOD besitzen. Dies bestätigt Versuche für porcines MyD88 im GALT von juvenilen und adulten Schweinen, welche ebenfalls höhere Homologien zwischen dem humanen und dem porcinen System beschrieben (Tohno *et al.*, 2007). Iwanaga *et al.* (2003) verglichen in ihrer Studie murines und humanes NOD2 miteinander und zeigten eine 78 %ige Homologie auf Aminosäureebene. Dies bestätigt wiederum die höheren Homologien zwischen dem humanen und dem porcinen System. Somit scheint das porcine Immunsystem ein weitaus besseres Modell zu sein, um möglicherweise humane Immunreaktionen zu studieren.

Die NLRP-Proteine der Mammalia sind, wie auch die Vorgänger aus *Drosophila*, sowohl für die angeborene Immunität als auch für die Entwicklungsbiologie zuständig (Tian *et al.*, 2009). Stein *et al.* (2007) und Unajak *et al.* (2011) fanden die NLR-Säugersequenzen auch in Zebra-, Kugelfischen und der japanischen Flunder, diese wiesen orthologe Beziehungen zueinander auf. Auf der Grundlage von Sequenzvergleichen sind die angeborenen immunologischen Signalwege zwar sehr ähnlich, die einzelnen rezeptornachgeschalteten Komponenten in Mammalia und Knochenfischen wiederum sind hoch konserviert (Laing *et al.*, 2008; Lange *et al.*, 2011; Sha *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2007). Die gemeinsame Vorstufe der angeborenen Immunität entwickelte sich im Verlaufe der Jahre in den Pflanzen und Tieren und schützt die Lebewesen bereits seit einer Milliarde Jahre vor zahlreichen Noxen. Anhand der pflanzlichen R-Proteine wurde die Wächterhypothese formuliert (*guard hypothesis*), welche für die Überwachung des Zellstatus notwendig ist und folglich zur Immunabwehrreaktion führt (Marathe *et al.*, 2003; Nimchuk *et al.*, 2003). Dies erklärt auch die hohen Homologien zwischen den R-Proteinen der Pflanzen mit einer TIR/NBD/LRR-Struktur und den NOD-Proteinen mit einer CARD/NBD/LRR-Struktur (Hoffmann *et al.*, 1999; Ting *et al.*, 2006). Diese gehören dementsprechend phylogenetisch zu der Proteinfamilie der CATERPILLER, welche die R-Proteine der Pflanzenabwehr, *major histocompatibility complex* (MHC) II Transaktivatorgene (CIITA), Naip- und Nalp-Proteine der Mammalia umfasst (Athman und Philpott, 2004; Chamaillard *et al.*, 2003a; Girardin *et al.*, 2003a; Murray, 2005). Sequenzanalysen ergaben ~85 verschiedene wirbeltierspezifische CATERPILLER orthologe Proteine, welche sich evolutionär durch die Pyrin-Domäne im Bereich der Knochenfischentwicklung abgegrenzt haben (Liang *et al.*, 2008; Ting und Davis, 2005). Die Anzahl der in Mammalia gefundenen NBD/LRR-Sequenzen ist bedeutend geringer als in Pflanzen. Möglicherweise besitzen höher entwickelte Eukaryoten aufgrund der Etablierung eines komplexen, adaptiven Immunsystems ein hochentwickeltes proteinspezifisches Immunsystem mit einer begrenzten Anzahl an entsprechenden Genen. Harton *et al.* (2002) fanden im humanen Genom 22 verschiedene NBD/LRR-Gene und Pseudogene auf acht Chromosomen, die zu der Familie der CATERPILLER gehören. Dabei zeigten sich folgende Homologien in der genomischen Struktur der CATERPILLER: (1) ein größeres einzelnes NBD-Exon mit ~1500 bp für die zentrale NACHT-Domäne, (2) mehrere LRR-Exons mit je 76 bp oder 174 bp sowie (3) eine oder mehrere CARD- oder Pyrin-Domänen mit einer Länge

von ~300 bp. Diese genomische Struktur auch für die porcinen NOD-Proteine konnte in dieser Arbeit durch die SMART-Software bestätigt werden. Die C- und N-terminalen Exons könnten hierbei durch Auswechseln und Vervielfältigung zu einer genetischen Diversität beitragen. Durch die N-terminalen Variationen werden die CATERPILLER in Subgruppen eingeteilt: Proteine mit einer CARD-Domäne, Pyrin-Domäne oder *trans-activation*-Domäne. Phylogenetische Untersuchungen zeigten deutlich die Gruppierung der CATERPILLER in Pyrin-haltige Domänen (NALP) und CARD-haltige Domänen (NOD, Apaf1).

Die Struktur der LRR zeigt, dass LRRs an der Hormonrezeptorinteraktion, Enzyminhibition, Zelladhäsion und der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind (Kobe und Deisenhofer, 1995). Der genomische Aufbau der LRR-Sequenzen lässt hingegen darauf schließen, dass dessen Exons durchmischt werden könnten. Dies würde für die Zellen somit ein Selektionswerkzeug darstellen. LRRs sind 20-29 lange Aminosäureketten mit einer spezifischen Konsensussequenz (Kajava, 1998; Kobe und Kajava, 2001). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass porcines NOD1-LRR und NOD2-LRR zu den RI-ähnlichen LRR-Domänenstrukturen zählen.

Da die LRR-Domäne die eigentliche Erkennungsstruktur des NOD-Proteins darstellen, lassen sich aufgrund des Aufbaus, der Anzahl und der Struktur der LRR Wirtsunterschiede bei der Erkennung von PGN vermuten. Die LRR-Domänen zeigten zwischen porcinen NOD dieser Arbeit und den NOD der Primaten und des Menschen eine hohe Ähnlichkeit. Nachweislich ist gerade die LRR-Domäne der NOD-Proteine für die Detektion hochkonservierter molekularer Strukturen von möglichen Erregern zuständig (Inohara *et al.*, 2001). Für humanes NOD1 wurden beispielsweise die Aminosäuren an Position 816-844 (LRR 5, 6 und 8) als essentielle Struktur für die Detektion von DAP-Tetrapeptiden beschrieben (Girardin *et al.*, 2005). Die porcine NOD1-Sequenz dieser Arbeit zeigt an den Positionen 824.aa und 844.aa Unterschiede zur humanen NOD1-Sequenz, dies entspricht dem 4. und 5. LRR. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass auch porcines und humanes NOD1 unterschiedliche DAP-Bestandteile erkennen könnten.

Laut Murray (2005) werden NOD1 und NOD2 über konservierte *single-copy*-Gene exprimiert. Zwar proklamierten Ogura *et al.* (2003b) eine hohe Rate genetischer Variationen von NOD1 und NOD2 in Mäusestämmen, dennoch zeigten die Daten keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz der LRR-Domäne. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Sequenzunterschiede könnten die Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sein. Hierzu untersuchten Kojima-Shibata *et al.* (2009) porcines DDX58, IFIH1 und NOD2 auf SNP. SNP sind Basenpaarvariationen in einem DNA-Strang und stellen genetische Veränderungen dar, die sich in gewissem Ausmaße im Genpool einer Population durchgesetzt haben. Im porcinen NOD2 fanden sich SNP in den kodierenden Abschnitten, vor allem in der Domäne für die Ligandenerkennung der LRR (Kojima-Shibata *et al.*, 2009). Zumindest für TLR wurde bereits 2009 vermutet, dass die SNPs in den porcinen TLR-Gensequenzen die Variabilität der PRPR erhöhen könnten (Uenishi und Shinkai, 2009). Polymorphismen bei intrazellulären PRR würden somit die wirtseigene Immunantwort beeinflussen. Hinweise gibt es hierzu durch die Arbeiten von Jeru *et al.* (2008), Ogura *et al.* (2001a), Smyth *et al.* (2006), Sutherland *et al.* (2007) und Verma *et al.* (2009). Jozaki *et al.* (2009) und Kojima-Shibata *et al.* (2009) zeigten, dass ein Polymorphismus in der LRR-Region von pNOD2 die Ligandendetektion und damit die Signaltransduktion durch pNOD2 beeinflusst. Für die Spezies Schwein wurde im Gegensatz

zu humanen Sequenzen bereits gezeigt, dass die porcinen PRR eine größere Anzahl an SNPs aufwiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine verstärkte Variabilität der PRR in der Schweinepopulation vorherrscht (Uenishi und Shinkai, 2009).

Dies wurde durch Sequenzvergleiche in dieser Arbeit bestätigt. Im Jahre 2008 wurde porcines NOD2 und NOD1 von Tohno *et al.* (2008b) und Tohno *et al.* (2008a) analysiert. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen zwischen pNOD1 und pNOD2 (diese Arbeit) und porcinem NOD aus der Datenbank NCBI zeigte für pNOD1 insgesamt acht veränderte Basenpaarungen. Hierbei könnte es sich um SNPs handeln, wobei insgesamt zwei veränderte Aminosäuren in der essentiellen LRR-Domäne entdeckt wurden. Diese Differenz in der LRR-Domäne zwischen dieser Arbeit und Tohno *et al.* (2008a) beruhten höchstwahrscheinlich auf der Verwendung unterschiedlicher Schweinerassen, welche nachweislich eine höhere PRR-Variabilität aufweisen. Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Schweinerassen könnten darüber hinaus für die Resistenzentwicklung oder die Empfindlichkeit bestimmter Rassen auf Krankheiten stehen. Möglich wäre auch, dass es sich hierbei um Splicevarianten handelt, welche zur gewebespezifischen Expression beitragen (Rosenstiel *et al.*, 2007). Im Jahre 2010 wurde darüber hinaus in humanen Zellen die Splicevariante NOD2-C2 entdeckt, welche MDP unabhängig NF- κ B aktiviert und ein potentieller NOD2-Signalwegregulator ist (Kramer *et al.*, 2010). Im Gegensatz zum humanen System gibt es für das Schwein jedoch weniger experimentelle Untersuchungen. Für weitergehende Untersuchungen wäre es deshalb erforderlich, funktionelle Studien mit porcinen NLR-Proteinen, hier NOD1 und NOD2, durchzuführen.

5.13 Salmonelleninfektion und CATERPILLER - ein wissenschaftlicher Ausblick

Salmonelleninfektionen manifestieren sich serovar- und wirtsabhängig in unterschiedlichen klinischen Ausprägungsformen. Die Serovare *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* machen zusammen ~80 % aller nachgewiesenen klinischen Serovare im Jahr 2008 in Europa aus. *S. enterica* spp. *enterica* Serovare werden in wirtsspezifisch, wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert unterschieden (Uzzau *et al.*, 2000). Aufgrund der enormen Bedeutung der Salmonellen sollten die Grundlage der unterschiedlichen Wirtsspezifitäten und deren Persistenzen dieser Serovare genauer untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die Wachstumsraten der Salmonellen im Zellkulturmedium und im LB-Medium unterscheiden, darüber hinaus ist das Wachstum intrazellulär geringer als extrazellulär im Zellkulturmedium. Die Invasivität von in Zellkulturmedium-kultivierten Salmonellen wurde bisher nicht beschrieben, sollte jedoch mit Hinblick auf die Literaturdatenlage (Abe *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2008) genauer betrachtet werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit beschrieben, dass die Aktivierung von Makrophagen einen Einfluss auf die Invasivität und die intrazelluläre Vermehrungsrate der untersuchten Serovare besitzt. Die Einflussfaktoren, die diesem Phänomen zugrunde liegen wurden bisher nur an anderen Erregern untersucht (Jelinek *et al.*, 2007; Shaughnessy und Swanson, 2007) und sollten auch für die Salmonellen definiert werden. Aufgrund der Datenlage kann vermutet werden, dass die vermehrte Anzahl an Lysosomen in THP-1a im Vergleich zu THP-1s zum unterschiedlichen Verhalten der intrazellulären Salmonellen führt, so dass Salmonellen, welche die Lysosom-Endosom-Fusion effektiver umgehen können, dies in THP-1a vermehrt nutzen. Darüber hinaus scheinen PMA-aktivierte Makrophagen eine veränderte

Oberflächenprotein-zusammensetzung oder Oberflächenproteinaktivierung zu besitzen, so dass aktivierte Makrophagen erleichtert Salmonellen aufnehmen und diese intrazellulären Salmonellen sich besser in der SCV vermehren können (Daigneault *et al.*, 2010). Weiterhin wurde ein Epithel-Makrophagen-Unterschied detektiert. Um diesen genauer zu spezifizieren, wird empfohlen, bei Epithel- und Makrophageninfektionen zusätzlich Versuche mit Phagozytose-Inhibitoren (z. B. Cytochalasin D, Swinholid A) durchzuführen.

Durch die hier vorgestellten Untersuchungen wurde weiterhin gezeigt, dass die wirtsadaptierten Serovare ein verlangsamtes Wachstum und eine verminderte Invasivität in den entsprechenden Wirtssystemen aufwiesen, wie *S. Choleraeuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen. Daraus konnte geschlossen werden, dass nicht-wirtsadaptierte Serovare über eine schnellere intrazelluläre Vermehrung zu einer beispielsweise vermehrten Genexpression führten und somit die eigene Zerstörung durch das Wirtsimmunsytem gefördert wurde. Im Gegensatz zu wirtsadaptierten Serovaren, welche die Immunabwehrmechanismen zu umgehen scheinen und eine geringere Vermehrungsrate aufwiesen, dafür jedoch können diese Serovare nachweislich systemisch streuen. Die Serovare zeigten in dieser Arbeit weiterhin eine unterschiedliche intrazelluläre Morphologie, welche möglicherweise mit den Sifs, oder weiteren Tubuli-Strukturen zusammenhängen könnten (Bakowski *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2010). Zwar sind die Sifs abhängig von der Wirtszelldichte (Konfluenz), den Wachstumsbedingungen der Wirtszellen (10 % FKS) und der MOI (Birmingham *et al.*, 2005), dennoch konnte der Einfluss dieser Faktoren für die Beurteilung der unterschiedlichen intrazellulären Morphologie hier nicht weiter geklärt werden. Um die Rolle der Sifs bei der unterschiedlichen Morphologie und Verteilung von intrazellulären Salmonellen näher zu beschreiben, wird empfohlen, mittels entsprechender Deletionsmutanten (z. B. SopD2, SseF, SseG, PipB2, SifA) und mit Hilfe von Zellkulturinhibitoren (z. B. Brefeldin A oder YM201636) weitere Untersuchungen hierzu durchzuführen. Zwar sind Untersuchungen an Sifs nur an *S. Typhimurium* durchgeführt worden und wurden bisher bei anderen Serovaren nicht beschrieben, dennoch kann derzeit nicht gezeigt oder ausgeschlossen werden, dass die Tubuli-Strukturen auch durch andere Serovare induziert werden. Weiterhin konnte ein infektionsbedingter Zellverlust in dieser Arbeit nach 24h *p. i.* nur durch *S. Typhimurium* Infektion, nicht jedoch bei einer Infektion mit *S. Choleraeuis* beobachtet werden. Somit war der Zelluntergang serovarspezifisch. Dies wiederum bestätigt die Arbeiten um Watson *et al.* (2000a) und Guilloteau *et al.* (1996).

Bei dem Vergleich beider Auswertungsmethoden des Infektionsversuches über die Ermittlung der KbE und die mikroskopische Auswertung von GFP-Salmonellen wurde deutlich, dass beide Techniken für eine exakte Aussage für weitere Studien kombiniert werden sollten. Vergleicht man folglich die ermittelten Daten dieser Arbeit aus den Infektionsversuchen, dann zeigte sich, dass *S. Typhimurium* in RAW264.7-Zellen sehr geringe Werte für intrazelluläre Salmonellen pro Einzelzelle besitzt, aber zu einer Zunahme infizierter Zellen pro Gesamtzellzahl nach 24h *p. i.* führte. Dies erklärt sich aus dem raschen Absterben von murinen Makrophagen infiziert mit wenigen Salmonellen und der schnellen Reinfektion von Nachbarzellen *in vitro*. In RAW264.7-Zellen konnten sich *S. Typhimurium* Erreger jedoch nur langsam oder schlecht vermehren, was durch die geringe Anzahl GFP-Salmonellen pro Einzellzellen, aber auch durch die geringe Steigung *m* gezeigt wurde. Darüber hinaus wurde durch den Vergleich der KbE- und GFP-Ergebnisse gezeigt, dass sich in den THP-1a-Zellen degradierte *S. Typhimurium* (GFP) befunden haben mussten im Gegensatz zu den RAW264.7-Zellen. Somit scheint die intrazelluläre Überlebensrate von

Salmonellen wirtsspezifisch zu sein. Dies bestätigt die Hypothesen, dass Salmonellen, welche nicht in Makrophagen überleben können, auch einhergehen mit einer verminderten Virulenz *in vivo* (Fields *et al.*, 1986; Libby *et al.*, 1994; Hensel *et al.*, 1998). Aus den erhobenen Daten kann geschlussfolgert werden, dass *S. Typhimurium* zumeist über einen Zelluntergang die Reinfektion von Nachbarzellen bewerkstelligt. Darüber hinaus zeigte sich in murinen Makrophagen das Bildnis ruhender oder sich nur schlecht vermehrender intrazellulärer Erreger. Dies trägt demzufolge zur systemischen Verbreitung des mäusepathogenen *S. Typhimurium* bei. *S. Choleraesuis* hingegen wies ruhende oder sich nur schlecht vermehrende intrazelluläre Erreger nur in porcinen Zellen und in allen verwendeten Makrophagen auf und deutet somit auf einen, im Vergleich zu *S. Typhimurium*, anders gearteten Infektionsmechanismus hin. Zusammenfassend ist somit die Invasion der intestinalen Mukosa unerlässlich für wirtsadaptierte und/oder wirtsspezifische Serovare. Für die systemische Verbreitung ist dieser invasive Charakter *per se* nicht ausschlaggebend, denn die Fähigkeit, der Erreger systemisch zu streuen, ist direkt verknüpft mit deren Fähigkeit in Makrophagen eines bestimmten Wirtes zu überleben. So gesehen sind mononukleäre Phagozyten eines Wirtes eine essentielle Barriere und Bestandteil der Wirtsspezifität der *Salmonella*-Serovare. Dies wiederum unterstützt die These, dass das intrazelluläre Überleben der Salmonellen wirtsabhängig und nicht serovarabhängig ist. Die vorliegende Arbeit gibt somit Hinweise auf unterschiedliche Invasionsraten, intrazelluläre Wachstumsraten und intrazellulärer Morphologie von *Salmonella*-Serovaren in Makrophagen und Epithelien. Daraus wird deutlich, dass das bestehende allgemeine Modell zur Untersuchung von wirtsspezifischen oder wirtsadaptierten Serovaren mit Hilfe des murinen *S. Typhimurium* Infektionsversuches allerdings begrenzt ist in seinem Aussagewert. Möglicherweise sind wirtsspezifische Proteine oder Strukturen der immunologischen Abwehr Grundlage für das Überleben eines Erregers in einem bestimmten Wirt A oder dem Absterben in Wirt B. Selten befassten sich Arbeiten mit diesem Wirt-Erreger-Zusammenhang und vernachlässigten dabei die Bedeutung von wirtszellspezifischen Bestandteilen auf den Ausgang des Infektionprozesses.

Hierzu wurden in der Arbeit zunächst die NF- κ B-Aktivierungsversuche durchgeführt. Hierbei wurde nachgewiesen, dass wirtsspezifische bzw. wirtsadaptierte Serovare gegenüber den nicht-wirtsadaptierten Erregern eine verminderte NF- κ B-Aktivierung aufwiesen (*S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die bakterielle Zellwand im Vergleich zum LPS allein ein stärkerer NF- κ B-induzierender Faktor ist und dass lebende *S. Typhimurium* die zelleigene Immunantwort des Wirtes minimieren konnten. Die jedoch zuvor beschriebenen zell- und wirtsspezifischen Unterschiede in der NF- κ B-Antwort können das Vorhandensein von einzelnen *Salmonella*-Genen (beispielsweise AvrA, SigD/SopB, SseL und/oder SspH1) nicht erklären. Somit besitzen die Mikroben sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mechanismen, welche in einem zell- und gewebespezifischen Gleichgewicht vorliegen. Dies lässt vermuten, dass eine verminderte NF- κ B-Aktivierung in den epithelialen Zellen die Persistenz des Erregers in diesen Zellen auf der einen Seite und die Umgehung des Erregers der wirtseigenen immunologischen Abwehr auf der anderen Seite fördern konnte und bestätigt somit die positive Korrelation von der geringen intestinalen Entzündungsreaktion und der geringen immunologischen Antwort der Enterozyten (Kaiser *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass Erreger, die in dem infizierten Wirt zu einer schnellen und hohen Immunantwort führten, daraufhin auch schneller vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Andererseits

könnten Erreger, welche nur eine geringere Wirtsimmunantwort hervorrufen, damit ihre eigene Eliminierung verzögern und erlangen somit die Möglichkeit zur effektiveren Verbreitung oder Streuung im Organismus. Dies wurde als Faktor Zeit deklariert und zeigte sich durch den deutlichen Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zur NF- κ B-Antwort (nicht-wirtsadaptierte *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* für die porcinen und humanen Zellen) oder durch den geringeren Anstieg der Anzahl intrazellulärer Salmonellen im Vergleich zum NF- κ B-Aktivierungswert (wirtsadaptiertes *S. Choleraesuis* in den porcinen Zellen). Um die Zusammensetzung der allgemeinen NF- κ B-Antwort genauer analysieren zu können und zwischen den Serovaren zu vergleichen, sollten Deletionsmutanten für Flagellin, PGN- und LPS-Enzyme sowie für die Effektorproteine (AvrA, SseL, SspH1) hergestellt und systematisch untersucht werden. Hierzu könnte auch die Zusammensetzung der PGN aus unterschiedlichen Infektionsphasen analysiert und miteinander verglichen werden. Denn die strukturelle Änderung von MAMPs ist eine bakterielle Evolutionsstrategie und dient der Umgehung der wirtseigenen angeborenen Abwehr und somit dem Überleben des Erregers. Mehr und mehr gelangt somit das Immunsystem des jeweiligen Wirtes in den näheren Fokus.

Beispielsweise wurde gezeigt, dass *Salmonella*-Flagellin über CARD12 zur Aktivierung der Zellen führte (Franchi *et al.*, 2006a; Mariathasan *et al.*, 2004). Diese bakteriellen Bestandteile, hier Flagellin, gelangen entweder über die T3SS der SPI1 oder über die Freisetzung aus der SCV in das Wirtszellzytoplasma und führen dort zur Aktivierung und/oder zum Zelluntergang (Miao *et al.*, 2006; Perrin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2006). Widersprüchlich sind hierzu die Ergebnisse, dass Caspase-1-defiziente Mäuse, nicht jedoch ASC-, NALP3- oder CARD12-defiziente Tiere empfindlich gegenüber einer *S. Typhimurium* Infektion sind (Lara-Tejero *et al.*, 2006). Dem entgegen stehen frühere Untersuchungen, welche zeigten, dass SipB von *S. Typhimurium* zu einer NAIP5-, CARD12- und Caspase-1-Aktivierung führt (Mariathasan *et al.*, 2004; Geddes *et al.*, 2001; Hersh *et al.*, 1999; Miao *et al.*, 2006). Der von Hersh *et al.* (1999) beobachtete Zelltod, ausgelöst durch die Mikroinjektionen von gereinigtem SipB-Protein in das Wirtszellzytoplasma, könnte im Zusammenhang mit der Beobachtung von Miao *et al.* (2006) stehen, bei der eine Hyperstimulation von CARD12 in einem Caspase-1-abhängigen Zelltod resultierte.

Neben den genannten Wirtsproteinen wiesen Hisamatsu *et al.* (2003b) nach, dass auch NOD2, jedoch nicht die mutierte NOD2-Form 3020insC, intestinale Epithelzellen vor einer *S. Typhimurium* Infektion schützt. Darüber hinaus demonstrierten Le Bourhis *et al.* (2009), dass NOD1-Defekte zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber *S. Typhimurium* Infektionen führten. In den NOD-defizienten Tieren fanden sich vermehrt Salmonellen, vor allem in den dendritischen Zellen der *Lamina propria*. Rosenstiel *et al.* (2007) zeigten, dass wiederum ein Zielgen der NOD2-vermittelten Immunantwort, *deleted in malignant brain tumors 1* (DMBT1), die Invasion durch *Salmonella enterica* und die LPS-, MDP-vermittelte NF- κ B-Antwort reduzieren kann.

Darüber hinaus gab es neue Erkenntnisse, welche beschrieben dass die gewonnene Ergebnisse in einem Wirtssystem nicht auf ein zweites übertragen werden können (Girardin *et al.*, 2003a; Magalhaes *et al.*, 2005). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Wirtsproteine, die NOD-Proteine, in unterschiedlicher Weise auf die gleichen Muropeptide reagierten, welches wiederum eine veränderte Immunantwort des Wirtes zur Folge hatte. Humanes NOD1 wurde hierbei durch DAP-Tripeptide aktiviert, murines NOD1 hingegen reagierte nicht auf DAP-Tripeptide, sondern wurde durch DAP-Tetrapeptide aktiviert. Kawasaki *et al.* (2008)

zeigten, dass für die Aktivierung von humanem NOD1 die freie Carboxylgruppe an der zweiten Position von DAP-Molekülen essentiell ist. Marr *et al.* (2010) konnten diese speziesspezifischen Unterschiede zwischen murinen und humanen Proteinen auch für die TLR und dessen Reaktivität gegenüber Lipid A von *Bordetella pertussis* beschreiben. Nalubamba *et al.* (2007) demonstrierten darüber hinaus eine speziesspezifische PRR-Zusammensetzung, welche einhergeht mit einer speziesspezifischen Immunantwort. Somit ist es nicht möglich, die gewonnenen experimentellen Ergebnisse aus einem Wirtssystem auf ein zweites Wirtssystem zu übertragen. Damit beeinflussen verschiedenartige genetische Hintergründe die Immunantwort ausgelöst durch eine Salmonelleninfektion, dies wurde bereits von van Hemert *et al.* (2007) vermutet. Darüber hinaus zeigten neuere Studien, dass es dem Wirt nur durch eine Vielzahl von bakteriellen Faktoren (MAMPs, Wachstum, Invasivität, Zellskelettmodifikationen etc.) möglich ist, zwischen pathogen und nicht-pathogen Erregern zu unterscheiden (Vance *et al.*, 2009). Somit besitzt der Wirt einen essentiellen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die porcinen NOD1- und NOD2-Sequenzen untersucht, um damit eine Grundlage für weitere wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Salmonellenwirtsspezifität zu schaffen.

Die erhobenen Daten zeigten, dass porcines NOD höhere Homologien mit dem humanen NOD als humanes NOD mit dem murinen NOD besitzen und bestätigen somit Sequenzvergleiche anderer Gene und Proteine (Tohno *et al.*, 2007). Die LRR-Domäne stellt die eigentliche Erkennungsstruktur des NOD-Proteins dar (Girardin *et al.*, 2005; Inohara *et al.*, 2001) und zeigte in der vorliegenden Arbeit Unterschiede zwischen der porcinen NOD1-Sequenz und der humanen NOD1-Sequenz an den Positionen 824.aa und 844.aa, dies entspricht dem 4. und 5. LRR. Aufgrund des Aufbaus, der Anzahl und der Struktur der LRR lassen sich wirtsspezifische Unterschiede bei der Erkennung von PGN vermuten. Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch porcines und humanes NOD1 unterschiedliche DAP-Bestandteile erkennen könnten, vergleichbaren mit hNOD1 und mNOD1.

Einen ersten Hinweis, dass NLR-Proteine wirtsspezifisch das intrazelluläre Wachstum von Bakterien in Makrophagen kontrollieren, wurde durch Brooks *et al.* (2011) und Vinzing *et al.* (2008) gezeigt. An dieser Stelle sollten weitergehende funktionelle Studien an porcinen und humanen NOD-Proteinen erfolgen. Hierbei wäre es ebenfalls sinnvoll, *knock down* Zellen oder siRNA für CATERPILLER-Proteine zu etablieren oder NOD-überexprimierende Zellkulturen zu entwickeln. Es wird empfohlen, die Rolle der NOD oder anderer CATERPILLER bei der Wirtsspezifität von bakteriellen Erregern näher zu beleuchten. Hierzu könnten wirtsfremde NOD-Proteine in Zellen exprimiert, die wirtseigenen NOD-Proteine unterdrückt und die Ergebnisse auf Wirtszellbasis untersucht werden. Möglicherweise führt die Serovarspezifität zur ungleichen Erkennung durch das Wirtszellimmunsystem. Die Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes wiederum, fördert die Modifizierungen von bakteriellen Zellwandbestandteilen, was daraufhin in einer schlechteren Erkennung und einer verminderten Immunantwort, wenn nicht sogar in eine Persistenz mündet. Wenn CATERPILLER wirtsspezifisch auf PGN-Modifikationen reagieren, könnte dies ein Hinweis auf wirtsspezifische Persistenzen sein.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit Differenzen in der LRR-Domäne zwischen der NOD-Sequenz dieser Arbeit und der veröffentlichten NCBI-Sequenz gefunden, welche vermutlich auf der Verwendung unterschiedlicher Schweinerassen beruhen. Hierbei könnte es sich um

SNPs handeln, wobei insgesamt zwei veränderte Aminosäuren in der essentiellen LRR-Domäne entdeckt wurden. Für die Spezies Schwein wurde im Gegensatz zu humanen Sequenzen bereits gezeigt, dass die porcinen TLR eine größere Anzahl an SNPs aufwiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine verstärkte Variabilität der PRR in der Schweinepopulation vorherrscht (Uenishi und Shinkai, 2009). Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Schweinerassen könnten ein bedeutenden Faktor bei der Resistenzentwicklung oder der Empfindlichkeit bestimmter Rassen auf Krankheiten sein.

Einen ersten Hinweis gibt es hierzu durch die chronische Stimulation mit bakteriellen Stimuli (MDP) über NOD2 und TLR4, dadurch wurde das Molekül IRAK-1 herabreguliert durch das inhibitorische Molekül IRAK-M (Hedl *et al.*, 2007). Dies lässt vermuten, dass eine Toleranz gegenüber bakteriellen Bestandteilen durch eine chronische Exposition ausgelöst werden könnte. Diese Hypothese geht wiederum einher mit dem oben erwähnten Faktor Zeit, welcher nachweislich für wirtsadaptierte und nicht-wirtsadaptierte Serovare gezeigt werden konnte. Der intrazelluläre NLR-Signalweg ist jedoch sehr komplex und dessen Regulation noch nicht weitgehend verstanden. Um gezielt die Funktion entsprechender NLR-Mitglieder zu untersuchen, sollten folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: (1) Kontrolle der NOD1- und NOD2-Wirkung durch die extra- und intrazelluläre Verabreichung von Agonisten, (2) Einsatz von Modulatoren (beispielsweise Erbin), (3) Vergleichende Betrachtung von Überexpressionsstudien sowie *gene silencing* Studien und (4) PGN scheinen mehr als nur ein CATERPILLER-Molekül eine Signalkaskade auszulösen, in diesem Zusammenhang erscheinen Proteomische Analysen oder auch Immunfluoreszenzen mit phosphospezifischen Antikörpern sinnvoll. Hierbei bleibt jedoch eine weitere interessante Frage offen, und zwar, ob CATERPILLER-Signalwege zwischen pathogenen und kommensalen Mikroorganismen unterscheiden könnten. Möglicherweise gibt es noch zahlreiche, bislang nicht bekannte und untersuchte Moleküle dieser Familie. Derzeit gibt es nur wenige Arbeiten, welche kostimulatorische Moleküle für NOD beschrieben haben. Das Verständnis vom Zusammenspiel der CATERPILLER wird Erkenntnisse nicht nur hinsichtlich der bakteriellen und Wirtszellantwort geben, sondern auch Möglichkeiten für pharmakologische Modulierungen bieten.

6. Zusammenfassung

Nicole Walk

Experimentelle Untersuchung zur Rolle der angeborenen Immunantwort und der Wirtsspezifität von *Salmonella enterica* Serovaren

Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Eingereicht im August 2011

154 Seiten, 53 Abbildungen, 25 Tabellen, 705 Literaturstellen

Schlüsselwörter: *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*, Infektion, NF- κ B, NOD1, NOD2

Salmonellen sind bedeutende Zoonoseerreger und führen zu schweren Infektionskrankheiten sowohl beim Menschen als auch beim Tier. In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende *Salmonella*-Invasionstudien mit jeweils zwei bereits etablierten Zellarten (Epithel und Makrophagen) aus je drei verschiedenen Wirtssystemen (Schwein, Maus, Mensch) durchgeführt. Hierzu wurden sowohl wirtsadaptierte als auch nicht-wirtsadaptierte *S. enterica* spp. *enterica* Serovare (*S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*) genutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Infektionsversuchen gezeigt, dass die wirtsadaptierten Serovare ein verlangsamtes Wachstum und eine verminderte Invasivität in dem entsprechenden Wirtssystem aufwiesen, wie *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen. Darüber hinaus zeigte die PMA-Aktivierung von Makrophagen einen deutlichen Einfluss auf die Invasivität und die intrazelluläre Vermehrungsrate der vier *Salmonella*-Serovare. Ein infektionsbedingter Zellverlust konnte in dieser Arbeit nach 24h *p. i.* nur durch *S. Typhimurium* Infektion, nicht jedoch bei einer Infektion mit *S. Choleraesuis* beobachtet werden. Somit war der Zelluntergang serovarspezifisch. *S. Typhimurium* zeigte darüber hinaus in murinen Makrophagen und *S. Choleraesuis* in porcinen Zellen das Bildnis ruhender oder sich nur schlecht vermehrender intrazellulärer Erreger, dies wiederum trägt zur systemischen Verbreitung des Erregers im Wirt bei. Somit war die intrazelluläre Überlebensrate der Salmonellen hingegen wirtsspezifisch und nicht serovarabhängig, dies zeigte sich durch den Vergleich zweier Untersuchungsmethoden (KbE und GFP). Um diesen Wirt-Erreger-Zusammenhang näher zu beleuchten, wurden NF- κ B-Aktivierungsversuche durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die wirtsspezifischen bzw. wirtsadaptierten Serovare gegenüber den nicht-wirtsadaptierten Erregern eine verminderte Luciferaseaktivität aufwiesen (*S. Choleraesuis* in porcinen Zellen und *S. Typhimurium* in murinen Zellen). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die bakterielle Zellwand im Vergleich zum LPS ein stärkerer NF- κ B-induzierender Faktor ist und dass *S. Typhimurium* die zelleigene Immunantwort des

Wirtes minimieren konnte. Diese ermittelten Ergebnisse zeigten, dass Gastroenteritis-auslösende Salmonellen wie die nicht-wirtsadaptierte Serovare *S. Enteritidis* oder *S. Typhimurium* (Mensch, Schwein) über eine schnellere intrazelluläre Vermehrungsrate und über eine hohe NF- κ B-Antwort ihre eigene Eliminierung durch das Wirtsimmunsystem fördern. Die wiederum Septikämie-auslösenden Erreger wie *S. Choleraesuis* (Schwein) und *S. Typhimurium* (Maus) führten in den Zellen zu einer geringeren immunologischen Zellantwort und zu einem geringen intrazellulären Wachstum. Dies ermöglicht den Erregern, die Immunabwehrmechanismen des Wirtes zeitweise zu umgehen und fördert eine effektivere Verbreitung der Erreger im Wirtsorganismus. Die Fähigkeit der Erreger, systemisch zu streuen, ist somit auch direkt verknüpft mit deren Fähigkeit, in Makrophagen eines bestimmten Wirtes zu überleben. So gesehen sind mononukleäre Phagozyten eines Wirtes eine essentielle Barriere und Bestandteil der Wirtsspezifität der *Salmonella*-Serovare.

Da der Wirt einen essentiellen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion besitzt, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die porcinen NOD-Proteine der angeborenen Immunantwort untersucht, um damit eine Grundlage für weitere wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Salmonellenwirtsspezifität zu schaffen. Die erhobenen Daten zeigten, dass porcines NOD höhere Homologien mit dem humanen NOD als humanes NOD mit dem murinen NOD besitzen. Darüber hinaus zeigte die LRR-Domäne Unterschiede zwischen der porcinen NOD1-Sequenz und der humanen NOD1-Sequenz, dies lässt eine Wirtsspezifität auf der Ebene der PGN-Detektion vermuten. Darüber hinaus zeigte die LRR-Domäne von NOD zwischen zweier Schweinerassen SNPs auf, was auf eine verstärkte Variabilität der PRR in der Schweinepopulation hinweist. Diese Sequenzunterschiede könnten ein bedeutender Faktor sein, bei der Resistenzentwicklung oder der Empfindlichkeit bestimmter Rassen auf Krankheiten. Weiterführende Arbeiten zum Zusammenspiel der NOD-Proteine wird Erkenntnisse nicht nur hinsichtlich der bakteriellen Wirtszellantwort geben, sondern auch Möglichkeiten des pharmakologischen Modulierens bieten.

7. Summary

Nicole Walk

The role of innate Immunity and host specificity in Salmonella infection *in vitro*

Institute of Microbiology and Epizootics, Department of Veterinary Medicine, Free University Berlin

Submitted in August 2011

154 pages, 53 figures, 25 tables, 705 references

Keywords: *Salmonella*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*, infection, NF- κ B, NOD1, NOD2

Salmonella serovars are important zoonotic pathogens, and can cause severe infections in both humans and animals. In the study presented here, comparative *in vitro* infection studies were performed in two, established cell types (epithelia and macrophage) derived from three different host species origins (porcine, murine and human). Both host-adapted and broad host-range *S. enterica* spp. *enterica* serovars (*S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis*) were used for the infection studies.

In this study, it was shown that the host-adapted serovars showed reduced growth and invasion of the pertinent host cells, e.g. *S. Choleraesuis* in porcine host cells and *S. Typhimurium* in murine host cells. In addition, it was shown that phorbol myristic acid (PMA) activation of macrophage results in large effects on the invasion and intracellular growth of the four *Salmonella* serovars. A *Salmonella* infection-dependent host cell loss was found to occur 24 hours post-infection only for *S. Typhimurium*-infected cells but not for *S. Choleraesuis*, indicating that the induction of host cell death was serovar-specific. Furthermore, the observation that *S. Typhimurium* and *S. Choleraesuis* showed static or poor intracellular growth in murine and porcine host cells, respectively, coupled with the known systemic proliferation of these serovars in their respective host species suggests a correlation of this growth characteristic contributing to systemic infections. That the intracellular survival of the *Salmonella* serovars is host-specific and not serovar-dependent was shown by comparison of two different methodologies (CFU and GFP). In order to clarify this host-pathogen interaction more closely, studies on the activation of host cell NF- κ B in response to infections were carried out. In this work it was found that host-restricted or host-adapted serovars showed reduced luciferase activation of their respective host cells compared to the broad host-range serovars. In addition, it was shown that the bacterial cell wall was a much more potent activator of NF- κ B as compared to LPS, and that *S. Typhimurium* was capable of minimizing the host cell's immune response. These results indicate that gastroenteritis-causing *Salmonella* such as the non-host-adapted or broad host-range serovars *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* which have a more rapid intracellular growth rate and a higher NF- κ B response in human and porcine hosts, contribute to their own

elimination through the host immune system. Serovars causing septicemia such as *S. Choleraesuis* or *S. Typhimurium* in porcine and murine hosts, respectively, showed low intracellular growth and reduced host cell immune responses. It is suggested that this latter observation permits the pathogens to evade (at least for a short time) the host immune response, allowing a more effective dissemination of the pathogen in the host. However, the ability for the pathogen to spread systemically is also directly related to its ability to survive within the macrophage of a particular host. The mononuclear phagocytes (macrophage) of the host therefore play an essential role as both barrier and component of the host-specificity of *Salmonella* serovars.

Since the host also plays an essential role on the outcome of an infection, in the second half of this work, the porcine NOD proteins involved in the innate immune response were also investigated in order to provide a basis for future research on *Salmonella* host specificity. The data show that the porcine NOD proteins show a much higher homology with the human NOD proteins than the human NOD proteins show to murine NOD proteins. In addition, the LRR domains of the porcine NOD1 protein showed differences compared to the human NOD1, suggesting the recognition of PGN might play a role in host-specificity. Furthermore, the LRR domains among two different crosses of swine also showed single nucleotide polymorphisms (SNPs), possibly indicating variability among the swine populations. These sequence differences might represent an important factor involved in resistance or sensitivity to infections. Future work concerning the interplay between the NOD proteins could provide additional information not only with regard to the host cell response to bacteria, but also provide possibilities for pharmacological modulation of this response.

Anhang

Berechnete Steigung m anhand der intrazellulären Salmonellenvermehrung zwischen den Zeitpunkten 2h *p. i.* und 24h *p. i.* (THP-1s, Suspension)

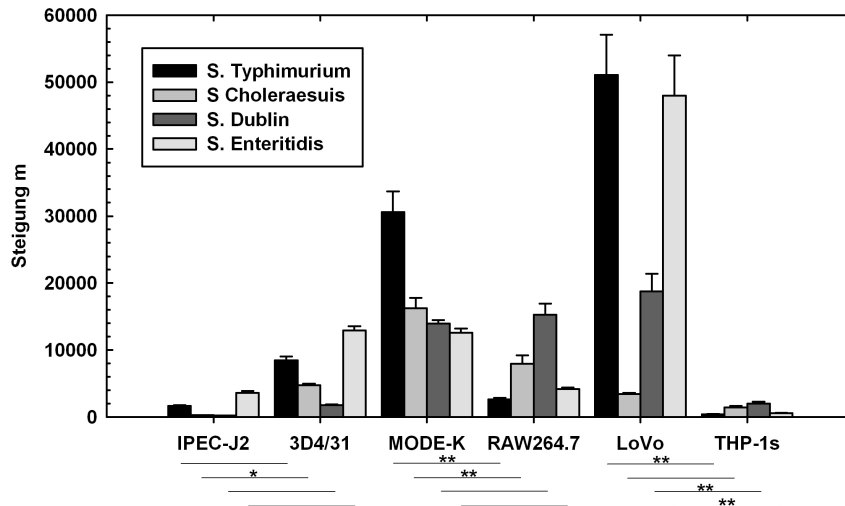


Abb. 45 Darstellung der Steigung m als Messwert für die intrazelluläre Vermehrungsrate

Gezeigt ist die Steigung m berechnet anhand der intrazellulären Vermehrungszahlen in KbE zwischen den Zeitpunkten 2h und 24h *p. i.* als $\bar{x} + \sigma_n$. Zwischen den zwei Zellarten (Epithel und Makrophagen) eines Wirtmodells wurden die Serovare mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé). Die Ergebnisse hierzu wurden für die vier Serovare (vier Balken) unter der Abbildung für die drei Wirtsmodelle (Schwein, Maus und Mensch) und mit $\alpha \leq 0,01(**)$ und $\alpha \leq 0,05(*)$ gezeigt.

THP-1s zeigte folgende m -Werte: $410,88 \pm 69,22$ *S. Typhimurium*, $1438,58 \pm 235,72$ *S. Choleraesuis*, $1999,34 \pm 292,83$ *S. Dublin* und $564,08 \pm 104,03$ *S. Enteritidis*. *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Enteritidis* zeigten im humanen System (LoVo und THP-1s) einen statistisch signifikanten Epithel-Makrophagen-Unterschied (Abb. 45). Die Berechnung der intrazellulären Vermehrungsraten für alle vier verwendeten *Salmonella* Serovare mit den Werten von THP-1s (unstimuliert, Suspension) im Vergleich zu THP-1a (aktiviert mit PMA, Adhärenz) ergab keine Änderung der bereits in Abb. 18 dargestellten statistischen Signifikanz.

Berechnete Steigung m anhand der intrazellulären Salmonellenvermehrung zwischen den Zeitpunkten 4h *p. i.* und 24h *p. i.* (THP-1a und THP-1s)

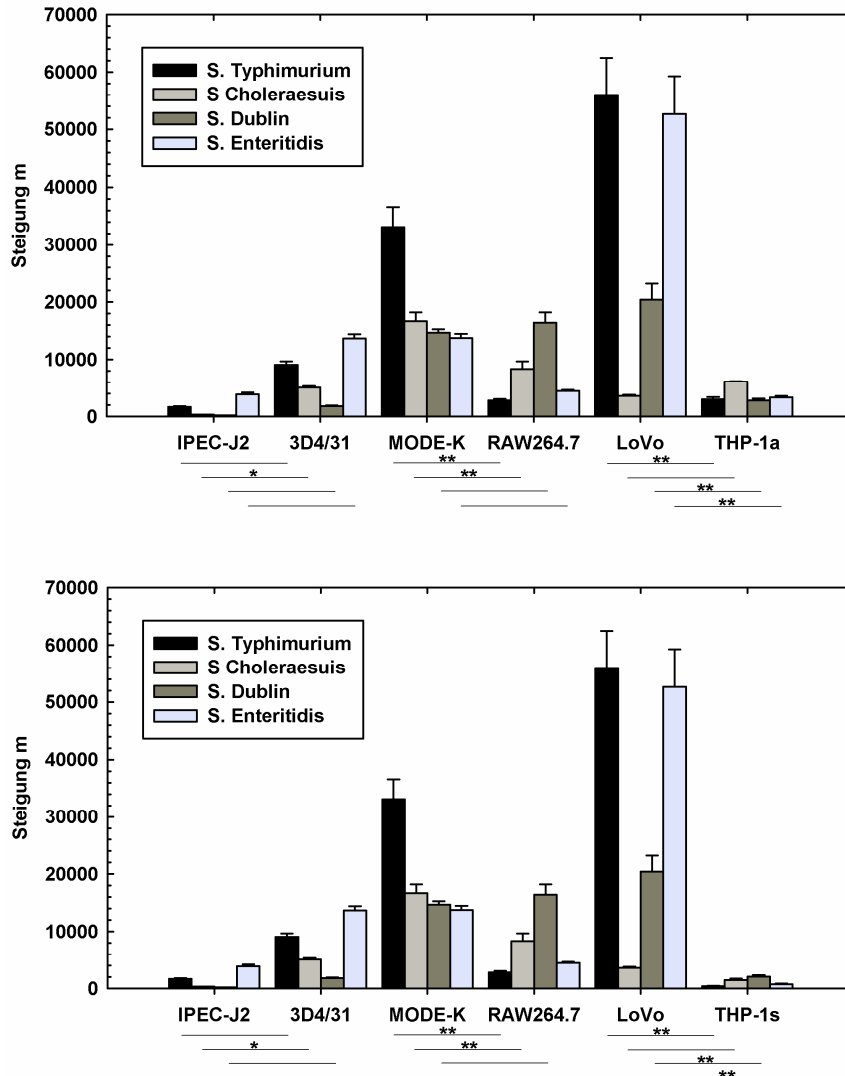


Abb. 46 Darstellung der Steigung m als Messwert für die intrazelluläre Vermehrungsrate (THP-1a (oben) und THP-1s (unten))

Gezeigt ist die Steigung m berechnet anhand der intrazellulären Vermehrungszahlen in KbE zwischen den Zeitpunkten 4h und 24h *p. i.* als $\bar{x} + \sigma_n$. Zwischen den zwei Zellarten (Epithel und Makrophagen) eines Wirtmodells wurden die Serovare mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé). Die Ergebnisse hierzu wurden für die vier Serovare (vier Balken) unter der Abbildung für die drei Wirtsmodelle (Schwein, Maus und Mensch) und mit $\alpha \leq 0,01(**)$ und $\alpha \leq 0,05(*)$ gezeigt.

Darstellung der initialen Invasionsraten 2h *p. i.* (THP-1s, Suspension)

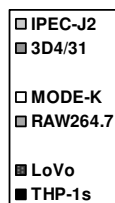
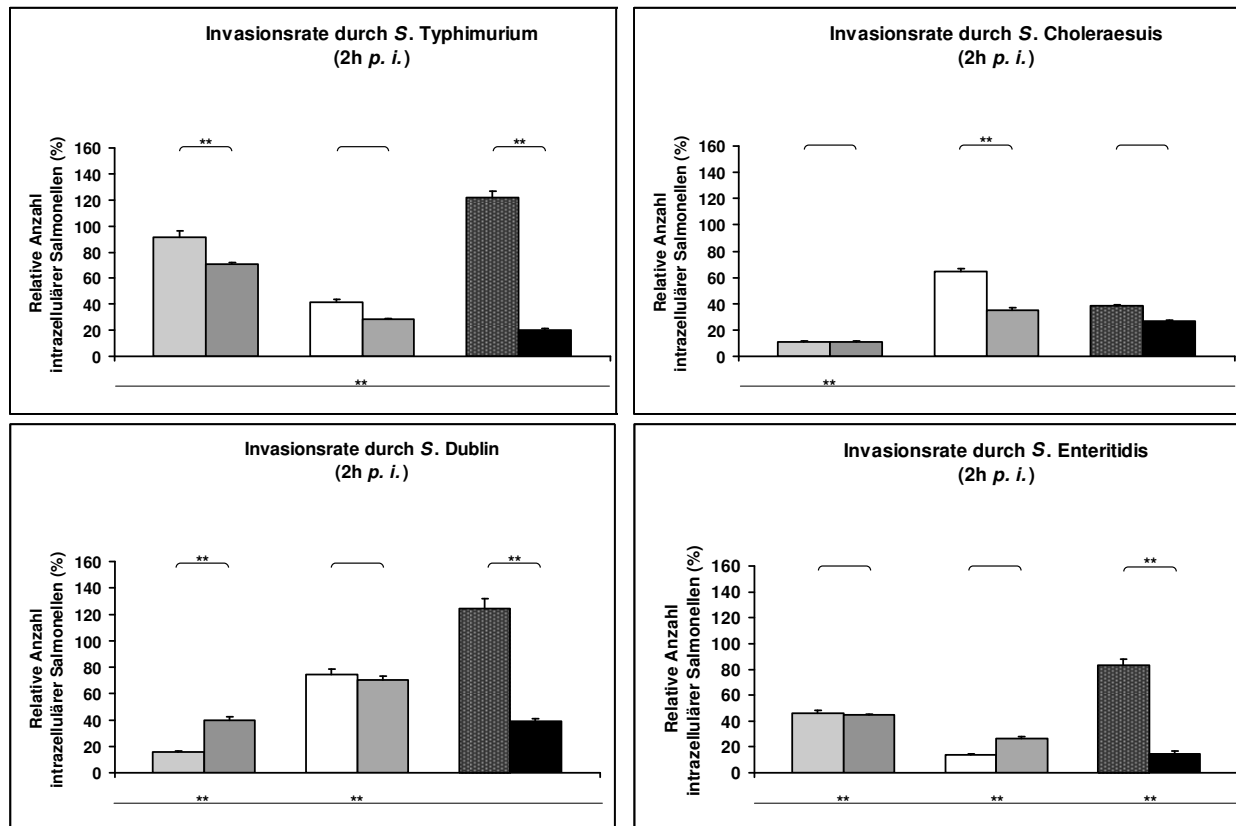


Abb. 47 Darstellung der initialen Invasionsraten 2h *p. i.*

Gezeigt sind die relativen intrazellulären Salmonellenanzahlen pro betrachtetes Serovar (wirtsadaptiert und nicht-wirtsadaptiert) als $\bar{x} + \sigma_n$. Innerhalb eines Wirtmodells (Schwein, Maus und Mensch) wurde die *Salmonella*-Invasivität zwischen Epithel und Makrophagen mit Hilfe der MANOVA auf statistische Signifikanz geprüft (Post Hoc Scheffé; $\alpha \leq 0,01$ (**) und $\alpha \leq 0,05$ (*) über der x-Achse).

Darüber hinaus wurden die drei Wirtsmodele untereinander mittels T-Test auf ungepaarte Stichproben verglichen ($\alpha \leq 0,01$ (**) unter der X-Achse).

Die Salmonellen zeigten in THP-1s folgende initialen Invasionsraten: $20,10 \pm 1,42$ % *S. Typhimurium*, $26,72 \pm 1,03$ % *S. Choleraesuis*, $39,16 \pm 1,59$ % *S. Dublin* und $14,72 \pm 1,96$ % *S. Enteritidis*. Humane THP-1-Zellen zeigten somit deutliche Unterschiede bei den initialen Invasionswerten in Bezug auf ihre Vorbehandlung. So sind PMA-aktivierte, adhärente THP-1-Zellen sensitiver für eine Salmonelleninfektion. Es sind die Serovare *S. Choleraesuis* und *S. Dublin*, welche deutlich weniger invasiv sind in den unstimulierten THP-1s im Vergleich zu den stimulierten THP-1a (Abb. 47).

Darstellung der relativen Anzahl intrazellulärer Salmonellen 4h p. i. und 24h p. i. (THP-1s, Suspension)

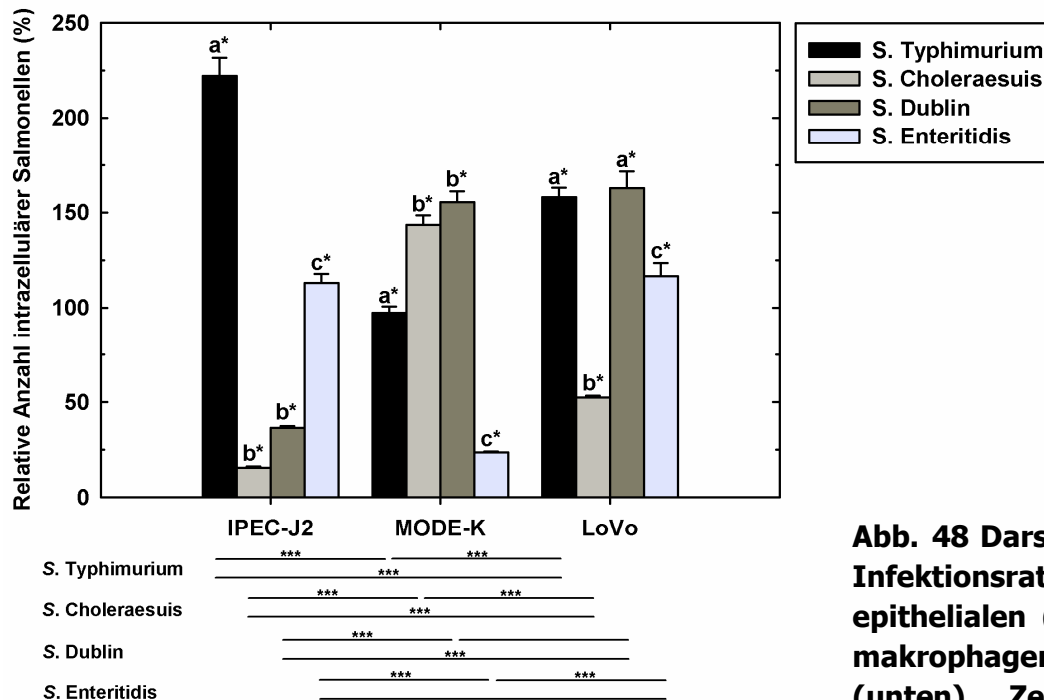
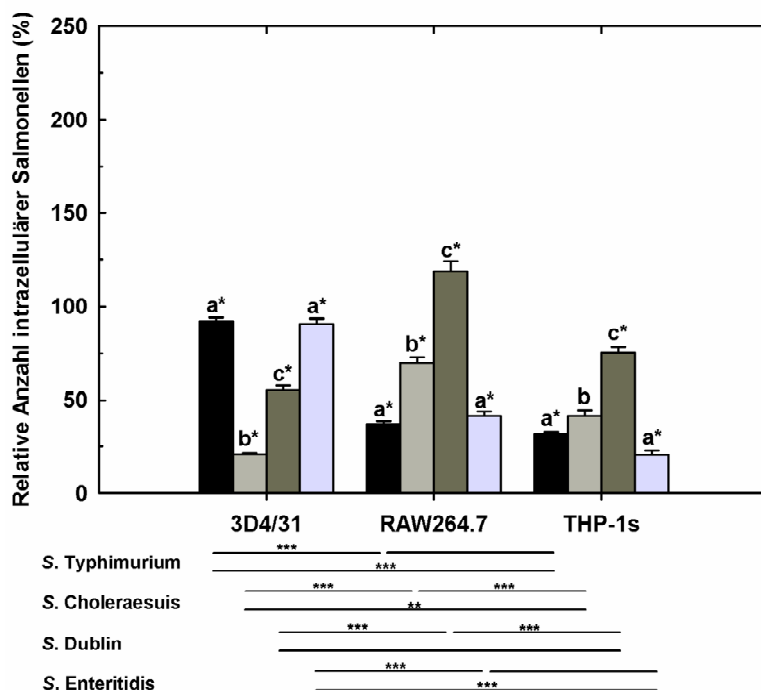


Abb. 48 Darstellung der Infektionsraten in epithelialen (oben) und makrophagenähnlichen (unten) Zellen nach 4h p. i.



Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 3 makrophagenähnliche Zellen) wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare, dargestellt als $\bar{x} + \sigma_n$, mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-c*)) Hierbei bedeuten gleiche Buchstaben (a-c) keine Signifikanz. Unterhalb der Abbildung wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare zwischen den drei Wirtsmoellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (**), $\alpha \leq 0,001$ (***)).

THP-1s zeigten folgende relativen Infektionsraten nach 4h *p. i.*: 31,54±1,25 % *S. Typhimurium*, 41,33±3,00 % *S. Choleraesuis*, 75,37±3,11 % *S. Dublin* und 20,84±2,25 % *S. Enteritidis*. THP-1s zeigten folgende relativen Infektionsraten nach 24h *p. i.*: 96,84±6,88 % *S. Typhimurium*, 347,68±21,30 % *S. Choleraesuis*, 660,80±38,41 % *S. Dublin* und 162,58±8,21 % *S. Enteritidis*. Somit besaßen die THP-1s geringere relative Infektionsraten nach 4h *p. i.* und 24h *p. i.* im Vergleich zu THP-1a (Abb. 48 und 49).

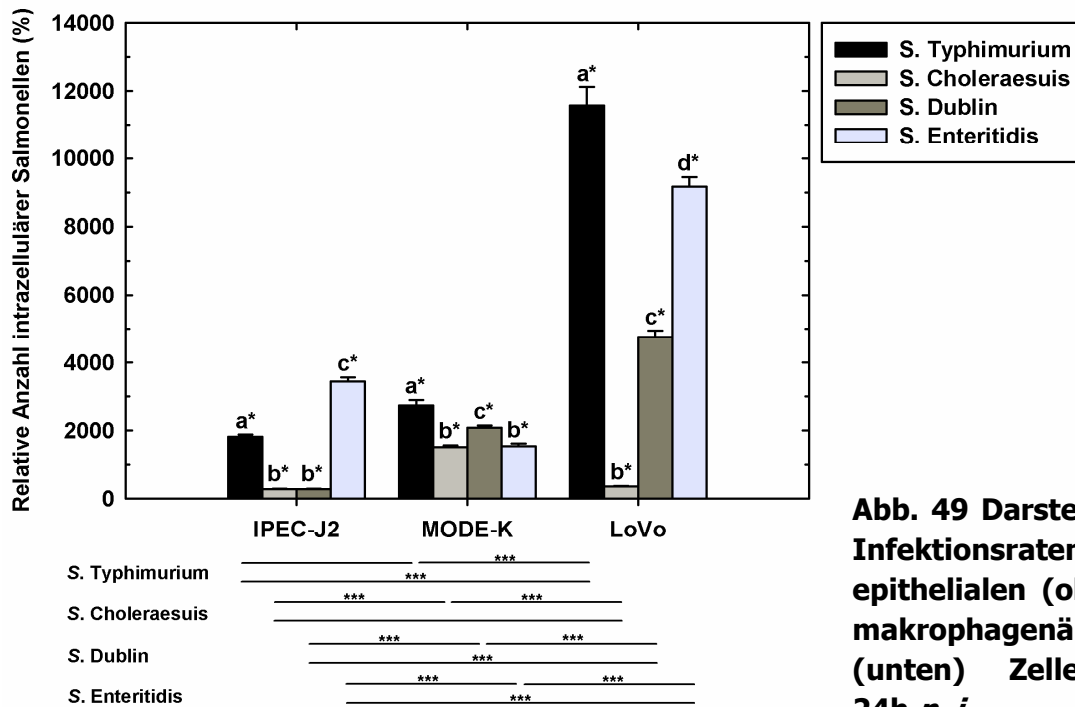
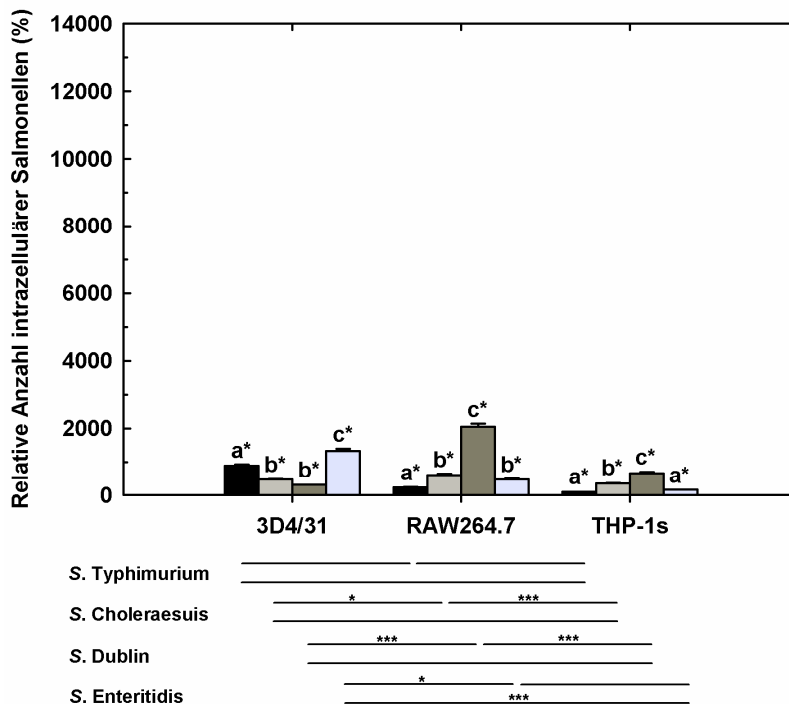


Abb. 49 Darstellung der Infektionsraten in epithelialen (oben) und makrophagenähnlichen (unten) Zellen nach 24h *p. i.*



Innerhalb einer Zellart (3 Epithel- und 3 makrophagenähnliche Zellen) wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare, dargestellt als $\bar{x} + \sigma_n$, mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,01$ (Buchstaben a-d*)). Hierbei bedeuten gleiche Buchstaben (a-d) keine Signifikanz. Unterhalb der Abbildung wurde die *Salmonella*-Infektion der vier Serovare zwischen den drei Wirtsmodellen (Schwein, Maus und Mensch) mit Hilfe der MANOVA (Post Hoc Scheffé) auf statistische Signifikanz geprüft ($\alpha \leq 0,05$ (*), $\alpha \leq 0,001$ (***)).


```

Porcine (1) 1811 AAACAGAACTCCTGCGGCACCTGGTGGCCGGCCACCCTGGCCGGAAGCGCAAGGCC 1870
|
|
|
Porcine (2) 2135 AAACAGAACTCCTGCGGCACCTGGTGGCCGGCCACCCTGGCCGGAAGCGCAAGGCC 2194
|
|
|
Porcine (1) 1871 CTGTGGGCTCACCTGTTTCCAGCCTGGCTCCACCTGAAGAACCTGCCCGAGTTTCAG 1930
|
|
|
Porcine (2) 2195 CTGTGGGCTCACCTGTTTCCAGCCTGGCTCCACCTGAAGAACCTGCCCGAGTTTCAG 2254
|
|
|
Porcine (1) 1931 TCGGGGGGCTTCAGCCAGGTGCAGGCCATGCCACCTTCATCTGGATGCTGGCTGCATC 1990
|
|
|
Porcine (2) 2255 TCGGGGGGCTTCAGCCAGGTGCAGGCCATGCCACCTTCATCTGGATGCTGGCTGCATC 2314
|
|
|
Porcine (1) 1991 TACGAGACGCAGAGCCGAGAAGGTGGGCGCTGGCTGCCAGGGGCATCTGTGCCAACTAC 2050
|
|
|
Porcine (2) 2315 TACGAGACGCAGAGCCGAGAAGGTGGGCGCTGGCTGCCAGGGGCATCTGTGCCAACTAC 2374
|
|
|
Porcine (1) 2051 CTCAGCTGACCTTCTGCAACGCCCTGCTCGGCCGACTGCTGGCCCTCTCCTTCGTCCTG 2110
|
|
|
Porcine (2) 2375 CTCAGCTGACCTTCTGCAACGCCCTGCTCGGCCGACTGCTGGCCCTCTCCTTCGTCCTG 2434
|
|
|
Porcine (1) 2111 CACCACCTTCCGCAAGCAGCTGGCCCTCGACCTGGACAACAAACAATCTCAATGACTACGGC 2170
|
|
|
Porcine (2) 2435 CACCACCTTCCGCAAGCAGCTGGCCCTCGACCTGGACAACAAACAATCTCAATGACTACGGG 2494
|
|
|
Porcine (1) 2171 GTCCGGAACTGCAGCCCTGCTTCAGCCGCTCACGGTCACTCAGACTCAGTGTAAACCAG 2230
|
|
|
Porcine (2) 2495 GTCCGGAACTGCAGCCCTGCTTCAGCCGCTCACGGTCACTCAGACTCAGTGTAAACCAG 2554
|
|
|
Porcine (1) 2231 ATCACTGACAGTGGGGTGAAGGTGCTATATGAAGAGCTGACCAAAATCAAAATCGTGACA 2290
|
|
|
Porcine (2) 2555 ATCACTGACAGTGGGGTGAAGGTGCTATATGAAGAGCTGACCAAAATCAAAATCGTGACA 2614
|
|
|
Porcine (1) 2291 TTTTATAGGCTTATACAACAACCAGATCACTGATGTCCGGAGCCAGGTACGTGCCAGAAATC 2350
|
|
|
Porcine (2) 2615 TTTTATAGGCTTATACAACAACCAGATCACTGATGTCCGGAGCCAGGTACGTGCCAGAAATC 2674
|
|
|
Porcine (1) 2351 CTGGATGAGTGCAAAAGGCTCAAGTGCTGAAACTGGGAAAAAACAATAACAGAGCGAA 2410
|
|
|
Porcine (2) 2675 CTGGATGAGTGCAAAAGGCTCAAGTGCTGAAACTGGGAAAAAACAATAACAGAGCGAA 2734
|
|
|
Porcine (1) 2411 GGAGGAAAAGTGCCCTGGCCGGGCTGTGAAGAACAGCAGATCCATCTTTGAAGTTGGGATG 2470
|
|
|
Porcine (2) 2735 GGAGGAAAAGTGCCCTGGCCGGGCTGTGAAGAACAGCAGATCCATCTTTGAAGTTGGGATG 2794
|
|
|
Porcine (1) 2471 TGGGGCAACCAAAATCGGGCAGCAAGGGGCGAAGGCCCTTCGACAGAGGCTCTGAGGAACCAC 2530
|
|
|
Porcine (2) 2795 TGGGGCAACCAAAATCGGGCAGCAAGGGGCGAAGGCCCTTCGACAGAGGCTCTGAGGAACCAC 2854
|
|
|
Porcine (1) 2531 CCCAGCCTGACCAACCTGAGTCTTGCATTCAACGGCATCTCTACAGAAGGAGGAAAAGAGC 2590
|
|
|
Porcine (2) 2855 CCCAGCCTGACCAACCTGAGTCTTGCATTCAACGGCATCTCTACAGAAGGAGGAAAAGAGC 2914
|
|
|
Porcine (1) 2591 CTCGCACAGGCCCTGCAGCAGAAATGCGTCTCTGAGAAATTTCTGGCTCACCCAAAATGAG 2650
|
|
|
Porcine (2) 2915 CTCGCACAGGCCCTGCAGCAGAAATGCGTCTCTGAGAAATTTCTGGCTCACCCAAAATGAG 2974
|
|
|
Porcine (1) 2651 CTCGATGACGAAAGTGGCAGAGAGCTTAGCAGAGATGCTGAAAGTCAACCAGACGTTGAAA 2710
|
|
|
Porcine (2) 2975 CTCGATGACGAAAGTGGCAGAGAGCTTAGCAGAGATGCTGAAAGTCAACCAGACGTTGAAA 3034

```

```

Porcine (1) 2711 CACTTATGGCTTATCCAGAACCAGATCACAGCCAGGGGGACTGCCCGGCTGGCGGATGCC 2770
|
|
|
Porcine (2) 3035 CACTTATGGCTTATCCAGAACCAGATCACAGCCAGGGGGACTGCCCGGCTGGCGGATGCC 3094
|
|
|
Porcine (1) 2771 ATACAGAACAACACTGGCATAATGGAGATTGCTTAAATGGAAACCTGATAAAGCCAGAG 2830
|
|
|
Porcine (2) 3095 TTACAGAACAACACTGGCATAATGGAGATTGCTTAAATGGAAACCTGATAAAGCCAGAG 3154
|
|
|
Porcine (1) 2831 GAGGCCAAAAGTCTTTGAAGACGAGAAGCGGATTGTCTGTTTCTGAGCCGTTGTCTGACT 2889
|
|
|
Porcine (2) 3155 GAGGCCAAAAGTCTTTGAAGACGAGAAGCGGATTGTCTGTTTCTGAGCCGTTGTCTGACT 3213

```

Abb. 50 Darstellung des Nukleotidsequenzvergleiches zwischen pNOD1 (diese Arbeit, (1)) und porcinem NOD1 (AB187219.1, (2))

Unterschiede in den kodierenden Sequenzen wurden farblich hervorgehoben. Zum besseren Verständnis wurde das Leseraster in diesem Bereich durch einen Unterstrich markiert. Die Kongruenz beträgt 99,69 % (2870bp/2879bp). Es wurden keine Lücken gefunden (0bp/2879bp). Der bit-score beträgt 5151 und der E-Wert ist 0,0.

Darstellung des Nukleotidsequenzvergleiches zwischen pNOD2 (diese Arbeit, (1)) und pNOD2 (AB195466.1 (2))

Porcine (1)	15	ATGTGTGCCCAGGGGGCTTTCCAGGCACAGAGAAGCCAGCTGGTGGAGCTCCTGGTCTCG 	74	Porcine (1)	915	GTCTTCCCATTACAGTGCCTGCCAGCTGCAGTGCCTGGCAAAATCTCTGTCCCTGCAGACG 	974
Porcine (2)	739	ATGTGTGCCCAGGGGGCTTTCCAGGCACAGAGAAGCCAGCTGGTGGAGCTCCTGGTCTCG 	798	Porcine (2)	1639	GTCTTCCCATTACAGTGCCTGCCAGCTGCAGTGCCTGGCAAAATCTCTGTCCCTGCAGACG 	1698
Porcine (1)	75	GGGTCCCTCGAGGGCTTCGAGAGCATTCTGGACTGGCTGCTGTCTGGGACGTCTCTCC 	134	Porcine (1)	975	CTGCTCTTTGAACACTGTTGTTGGCCTGACCGTGGCCAGCAGGACGTCTTTCAGGTCCCTC 	1034
Porcine (2)	799	GGGTCCCTCGAGGGCTTCGAGAGCATTCTGGACTGGCTGCTGTCTGGGACGTCTCTCC 	858	Porcine (2)	1699	CTGCTCTTTGAACACTGTTGTTGGCCTGACCGTGGCCAGCAGGACGTCTTTCAGGTCCCTC 	1758
Porcine (1)	135	TGGGAAGACTACGAGGGCCTCAGCCTCCTGGGCCAGCCCTCTCCCACTTGGCCAGGCGC 	194	Porcine (1)	1035	CTTGACCACCCCGAGCGCATCTCTTAACTTTCGATGGTTTTGACGAGTTCAGGTTCCAGG 	1094
Porcine (2)	859	TGGGAAGACTACGAGGGCCTCAGCCTCCTGGGCCAGCCCTCTCCCACTTGGCCAGGCGC 	918	Porcine (2)	1759	CTTGACCACCCCGAGCGCATCTCTTAACTTTCGATGGTTTTGACGAGTTCAGGTTCCAGG 	1818
Porcine (1)	195	CTTCTGGACACTGTCTGGAGTAAGGGTACGTGGGGCTGTGAGCAGCTCGTGGCGGCTGTG 	254	Porcine (1)	1095	TTCACGGATCACGAGCGTCACTGTGTCCGACGGCCCCACATCTGTTTCAGAGTCTCCTC 	1154
Porcine (2)	919	CTTCTGGACACTGTCTGGAGTAAGGGTACGTGGGGCTGTGAGCAGCTCGTGGCGGCTGTG 	978	Porcine (2)	1819	TTCACGGATCACGAGCGTCACTGTGTCCGACGGCCCCACATCTGTTTCAGAGTCTCCTC 	1878
Porcine (1)	255	CGGGAGGCCAGGCCGACAGCCAGCCCTCCGAACCTTCCTGGCTGTGGAACCCCATTC 	314	Porcine (1)	1155	TTCACCTCCTGCAGGGCAACCTGTCTAAGAATGCCCGCAAGGTGCTGACAGCCGACCG 	1214
Porcine (2)	979	CGGGAGGCCAGGCCGACAGCCAGCCCTCCGAACCTTCCTGGCTGTGGAACCCCATTC 	1038	Porcine (2)	1879	TTCACCTCCTGCAGGGCAACCTGTCTAAGAATGCCCGCAAGGTGCTGACAGCCGACCG 	1938
Porcine (1)	315	CCCCACCCAGCCCGTACCTGCAGAGTCAACGGCCAGCCGTTGTGAGAAAGACTCTACAGT 	374	Porcine (1)	1215	GACGGGTGTCTGGGACCTCCCGAAGCACGTGGCCTCAGAAGTCAAGGCTCAAGGGTTTC 	1274
Porcine (2)	1039	CCCCACCCAGCCCGTACCTGCAGAGTCAACGGCCAGCCGTTGTGAGAAAGACTCTACAGT 	1098	Porcine (2)	1939	GACGGGTGTCTGGGACCTCCCGAAGCACGTGGCCTCAGAAGTCAAGGCTCAAGGGTTTC 	1998
Porcine (1)	375	CACGTGGACGGCGTGTGGAGCGGACCGAGGACAGGGTTTCATCAGCCGGTACGAATGT 	434	Porcine (1)	1275	TCAGAAGAGGGCATTGAACCTGTACCTGCGGAAGTGCATCGCGAGCCTGGCGTGGCCGAC 	1334
Porcine (2)	1099	CACGTGGACGGCGTGTGGAGCGGACCGAGGACAGGGTTTCATCAGCCGGTACGAATGT 	1158	Porcine (2)	1999	TCAGAAGAGGGCATTGAACCTGTACCTGCGGAAGTGCATCGCGAGCCTGGCGTGGCCGAC 	2058
Porcine (1)	435	GATGAAATCAGCGCACCCATCTTACGCTATGCCAGCGGGCAAGAAGGCTCCTCGATCTT 	494	Porcine (1)	1335	CGCCTCATCTGCCTGCTCAGAGCCACCTCGGCCCTGCACGGTCTGTGCCACCTGCCTGTC 	1394
Porcine (2)	1159	GATGAAATCAGCGCACCCATCTTACGCTATGCCAGCGGGCAAGAAGGCTCCTCGATCTT 	1218	Porcine (2)	2059	CGCCTCATCTGCCTGCTCAGAGCCACCTCGGCCCTGCACGGTCTGTGCCACCTGCCTGTC 	2118
Porcine (1)	495	GCTGCTGTGAAGGCGAATGGGTTGGCTGCCTTCTTCTACAGTGTGTTTCAGGAATTACCC 	554	Porcine (1)	1395	TTCTCGTGGATGGTGTCCAAATGCCACCAGGAAGTGTGCTGCAGGGCAGGGGGTCCCCG 	1454
Porcine (2)	1219	GCTGCTGTGAAGGCGAATGGGTTGGCTGCCTTCTTCTACAGTGTGTTTCAGGAATTACCC 	1278	Porcine (2)	2119	TTCTCGTGGATGGTGTCCAAATGCCACCAGGAAGTGTGCTGCAGGGCAGGGGGTCCCCG 	2178
Porcine (1)	555	ATCCCAGTGGCCCTGCCTTTTGAAGATGCTGCCTGTAAAGATACATGTCCAAGCTGAGG 	614	Porcine (1)	1455	AAGACCACCCACGGACATGTACCTGTGATCCTGCAGCATTTTCTGCTGCGTGCCTCCCT 	1514
Porcine (2)	1279	ATCCCAGTGGCCCTGCCTTTTGAAGATGCTGCCTGTAAAGATACATGTCCAAGCTGAGG 	1338	Porcine (2)	2179	AAGACCACCCACGGACATGTACCTGTGATCCTGCAGCATTTTCTGCTGCGTGCCTCCCT 	2238
Porcine (1)	615	ACCACAGTTTCAGCTCAGTCTCGTTTCTGAGCACCTACGATGGGGCAGAGAATCTTTGC 	674	Porcine (1)	1515	CTAGACTCAGCCGCCAGCATCTGGGACCTGACCTGCTTCGGGGGAGCCTCCCAACCTG 	1574
Porcine (2)	1339	ACCACAGTTTCAGCTCAGTCTCGTTTCTGAGCACCTACGATGGGGCAGAGAATCTTTGC 	1398	Porcine (2)	2239	CTAGACTCAGCCGCCAGCATCTGGGACCTGACCTGCTTCGGGGGAGCCTCCCAACCTG 	2298
Porcine (1)	675	CTAGAAGAAAATATATACAGAGAATGTTCTGGAGTCCGGACAGAGGGGGGCATGACTGGA 	734	Porcine (1)	1575	CTGCATCTCGGTACCTGGCTCTCTGGGGCCTGGGCACGTGTGCTACGTGTTCTCAGCC 	1634
Porcine (2)	1399	CTAGAAGAAAATATATACAGAGAATGTTCTGGAGTCCGGACAGAGGGGGGCATGACTGGA 	1458	Porcine (2)	2299	CTGCATCTCGGTACCTGGCTCTCTGGGGCCTGGGCACGTGTGCTACGTGTTCTCAGCC 	2358
Porcine (1)	735	CCTCCGACAGCAGCCCTGCCACCCTGAGCCTAGGGGAGCTCTTCAGCCCTCAAGGCCAC 	794	Porcine (1)	1635	GAGCAGTGCAGGCAGCACACGTGCAGAGTGGCTGTTTCTCTGGGCTTCTGGTTCTCGT 	1694
Porcine (2)	1459	CCTCCGACAGCAGCCCTGCCACCCTGAGCCTAGGGGAGCTCTTCAGCCCTCAAGGCCAC 	1518	Porcine (2)	2359	GAGCAGTGCAGGCAGCACACGTGCAGAGTGGCTGTTTCTCTGGGCTTCTGGTTCTCGT 	2418
Porcine (1)	795	CTCAACAAGGATGCGGACACCGTGTGGTGGTGGGTGAGGCAGGCAGTGGCAAGAGCACC 	854	Porcine (1)	1695	GCCAAAGACGGTGTGCCCCGGAGGTACCCCCCACTGGAATTCCTGCACGTACATTCCAG 	1754
Porcine (2)	1519	CTCAACAAGGATGCGGACACCGTGTGGTGGTGGGTGAGGCAGGCAGTGGCAAGAGCACC 	1578	Porcine (2)	2419	GCCAAAGACGGTGTGCCCCGGAGGTACCCCCCACTGGAATTCCTGCACGTACATTCCAG 	2478
Porcine (1)	855	CTCCTGCAGCAGGTGCATCTGCTGTGGGCTTCAGGGCAGGCCTCCAGGAATTTCTCTTC 	914	Porcine (1)	1755	TGCTTTTTTGCCGCACTTCTACCTCGCCCTCAGTGTGACGTGCCACCGTCACTCCCTCAG 	1814
Porcine (2)	1579	CTCCTGCAGCAGGTGCATCTGCTGTGGGCTTCAGGGCAGGCCTCCAGGAATTTCTCTTC 	1638	Porcine (2)	2479	TGCTTTTTTGCCGCACTTCTACCTCGCCCTCAGTGTGACGTGCCACCGTCACTCCCTCAG 	2538

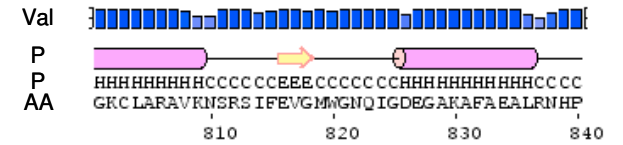
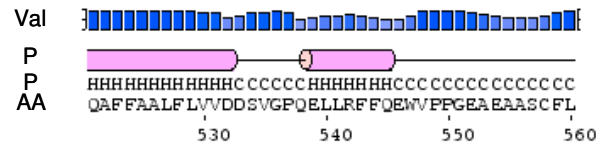
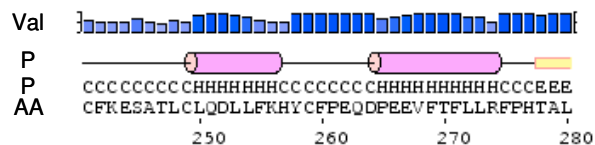
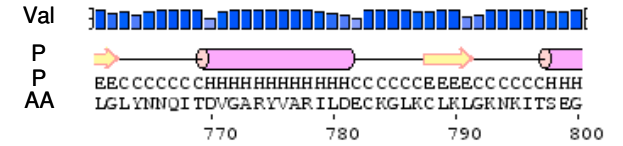
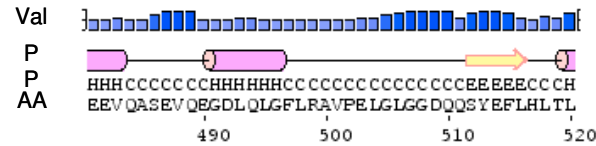
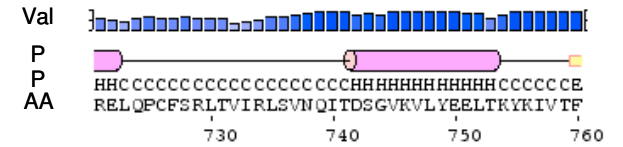
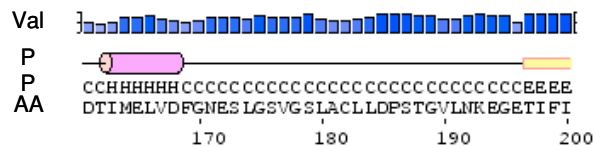
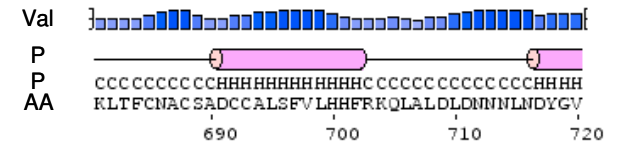
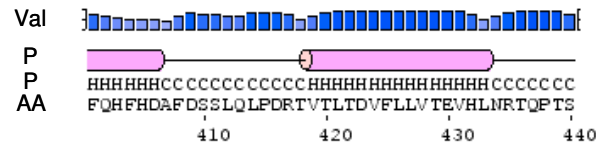
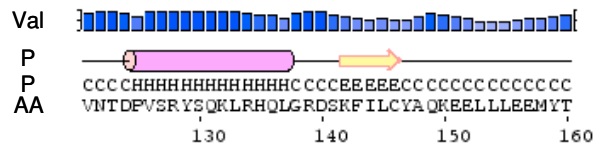
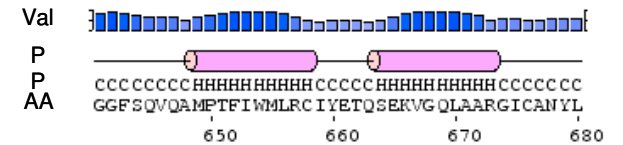
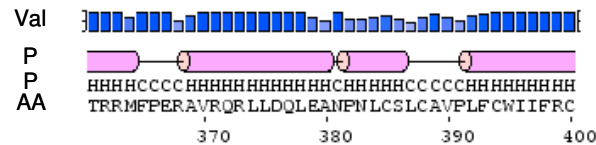
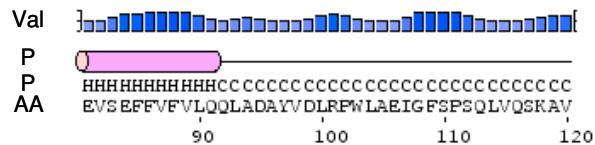
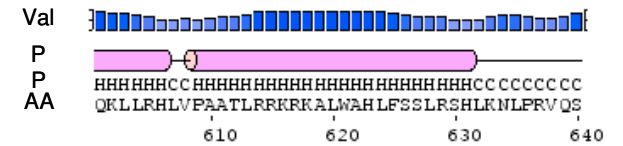
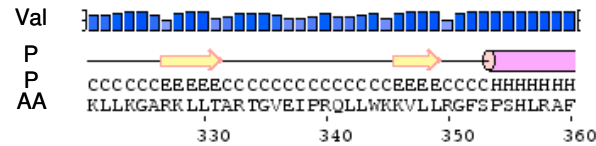
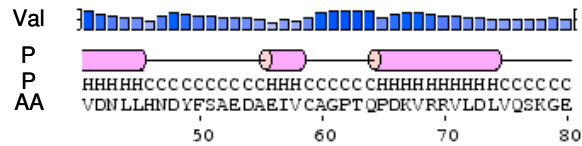
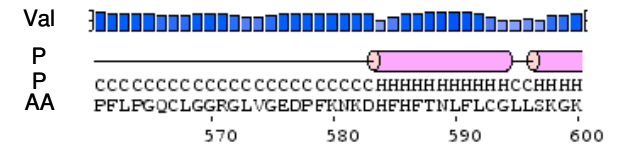
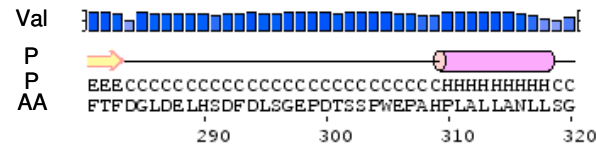
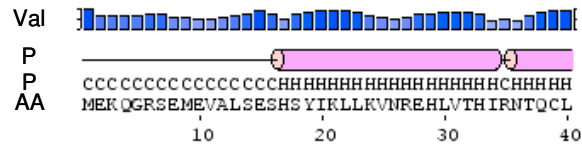
Porcine (1)	1815	CACCTCTTCCATGGTCACCGACCCGGCAGCTCGCCACTGGCCAAGGTGCTGCCCAAACCTG	1874	Porcine (1)	2715	AGCTTGAAGTGGCTCAGCCTGGTGGGGAACAACATTGGCAGTGTGGGTGCTCAAGCCTTA	2774
Porcine (2)	2539	CACCTCTTCCATGGTCACCGACCCGGCAGCTCGCCACTGGCCAAGGTGCTGCCCAAACCTG	2598	Porcine (2)	3439	AGCTTGAAGTGGCTCAGCCTGGTGGGGAACAACATTGGCAGTGTGGGTGCTCAAGCCTTA	3498
Porcine (1)	1875	TGTGTGCGGGGCTCAGGCTGCAAGAAAAGCAGCGTGGCCCATTTGCTACAGGAGGCCGAG	1934	Porcine (1)	2775	GCATTGATGTTGGAAAAGAATGGCCCTGGAAGAACTCTGCCTGGAGGAGAACCATGTC	2834
Porcine (2)	2599	TGTGTGCGGGGCTCAGGCTGCAAGAAAAGCAGCGTGGCCCATTTGCTACAGGAGGCCGAG	2658	Porcine (2)	3499	GCATTGATGTTGGAAAAGAATGGCCCTGGAAGAACTCTGCCTGGAGGAGAACCATGTC	3558
Porcine (1)	1935	CCGCACAACCTCCAGATCACGGCGGCCCTCCCTGGCAGGGCTGTTGTGCCAGGAGCACCGG	1994	Porcine (1)	2835	CAAGATGAAGTGTGTGCTCTCTCGCCAGAGGACTTGAGAGAAAATTCAGCTTGAAGATC	2894
Porcine (2)	2659	CCGCACAACCTCCAGATCACGGCGGCCCTCCCTGGCAGGGCTGTTGTGCCAGGAGCACCGG	2718	Porcine (2)	3559	CAAGATGAAGTGTGTGCTCTCTCGCCAGAGGACTTGAGAGAAAATTCAGCTTGAAGATC	3618
Porcine (1)	1995	GGTCTGCTAGCCGAGTGGCCAGGTGTCTGAGAAGGCTCTGCTCCAGCGCCAGGCCGTGTC	2054	Porcine (1)	2895	CTGAAGCTGTCCAAACACCGTCACCTCCCGTGGGGCCGAAAGCCCTCTGCAGGCCCTT	2954
Porcine (2)	2719	GGTCTGCTAGCCGAGTGGCCAGGTGTCTGAGAAGGCTCTGCTCCAGCGCCAGGCCGTGTC	2778	Porcine (2)	3619	CTGAAGCTGTCCAAACACCGTCACCTCCCGTGGGGCCGAAAGCCCTCTGCAGGCCCTT	3678
Porcine (1)	2055	CGGTGGTGTCTGGCCCGCAGCCTCCATAAGCACTTCCGCTCCATCCACCAGCCGTCCCA	2114	Porcine (1)	2955	GAACAGAATGACACCATCCTGGAAGTCTGGCTCCGAGGAAAACAATTTCTCCAGAGGAG	3014
Porcine (2)	2779	CGGTGGTGTCTGGCCCGCAGCCTCCATAAGCACTTCCGCTCCATCCACCAGCCGTCCCA	2838	Porcine (2)	3679	GAACAGAATGACACCATCCTGGAAGTCTGGCTCCGAGGAAAACAATTTCTCCAGAGGAG	3738
Porcine (1)	2115	GGTGAAGTCAAGAGCATGCATGCCATGCCTGGCTTCATCTGGCTCATCCGACGCCTGTAC	2174	Porcine (1)	3015	ACTGAGCAGCTCAGCCAGAGGGACACGAGACTCCTGCTTTGATGTTCTGGGGCCAG	3071
Porcine (2)	2839	GGTGAAGTCAAGAGCATGCATGCCATGCCTGGCTTCATCTGGCTCATCCGACGCCTGTAC	2898	Porcine (2)	3739	ACTGAGCAGCTCAGCCAGAGGGACACGAGACTCCTGCTTTGATGTTCTGGGGCCAG	3795
Porcine (1)	2175	GAGATGCAGGAGGAGCGACTGGCCCGGGACGCTGTGCGTAGGCTGAACGTCGGGCACCTC	2234				
Porcine (2)	2899	GAGATGCAGGAGGAGCGACTGGCCCGGGACGCTGTGCGTAGGCTGAACGTCGGGCACCTC	2958				
Porcine (1)	2235	AAGTGACTTTCTGCAAGCGTGGGCCCTGCTGAGTGCCTGCGCTGGCCCTTCGTGCTGCGG	2294				
Porcine (2)	2959	AAGTGACTTTCTGCAAGCGTGGGCCCTGCTGAGTGCCTGCGCTGGCCCTTCGTGCTGCGG	3018				
Porcine (1)	2295	CACCTCCAGTGGCCCGTGGCCCTGCAGCTGGACCCAACTCTGTGGGGCAGATTGGCGTG	2354				
Porcine (2)	3019	CACCTCCAGTGGCCCGTGGCCCTGCAGCTGGACCCAACTCTGTGGGGCAGATTGGCGTG	3078				
Porcine (1)	2355	GAGCAGCTGCTGCCTTGTCTCAACGCTGCAAGGCTCTTTACTTGAGAGATAACAATATC	2414				
Porcine (2)	3079	GAGCAGCTGCTGCCTTGTCTCAACGCTGCAAGGCTCTTTACTTGAGAGATAACAATATC	3138				
Porcine (1)	2415	TCAGACCGAGGCTTCTGCAAGCTCGTGGAAACATGCTCTTTGCTGTGAGCAGCTGCAGAAG	2474				
Porcine (2)	3139	TCAGACCGAGGCTTCTGCAAGCTCGTGGAAACATGCTCTTTGCTGTGAGCAGCTGCAGAAG	3198				
Porcine (1)	2475	TTAGCTCTTTTCAACAACAATAATTGACCGACGGCTGTGCTCACTCCATGGCCAGGCTCCTT	2534				
Porcine (2)	3199	TTAGCTCTTTTCAACAACAATAATTGACCGACGGCTGTGCTCACTCCATGGCCAGGCTCCTT	3258				
Porcine (1)	2535	GCATGCAAGAGGAACCTTCTTGGCATTGAGGCTGGGAAAACAACCACTTCACTGCCGTGGGA	2594				
Porcine (2)	3259	GCATGCAAGAGGAACCTTCTTGGCATTGAGGCTGGGAAAACAACCACTTCACTGCCGTGGGA	3318				
Porcine (1)	2595	GCCCAGGTGCTGGCCAGGGACTCAGAGCCAACACCCCCCTGCAGTTCCCTGGGGTTCTGG	2654				
Porcine (2)	3319	GCCCAGGTGCTGGCCAGGGACTCAGAGCCAACACCCCCCTGCAGTTCCCTGGGGTTCTGG	3378				
Porcine (1)	2655	GGCAACCAGTGGGTGACAAGGGGGCCAGGCTTTGGCTGAAGCCTTGAGGGACAATCAG	2714				
Porcine (2)	3379	GGCAACCAGTGGGTGACAAGGGGGCCAGGCTTTGGCTGAAGCCTTGAGGGACAATCAG	3438				

Abb. 51 Darstellung des Nukleotidsequenzvergleiches zwischen pNOD2 (diese Arbeit, (1)) und porcinem NOD2 (AB195466.1 (2))

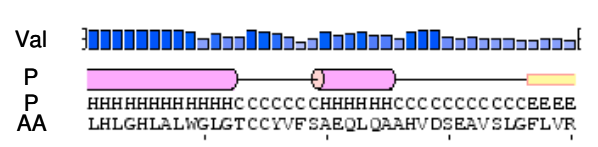
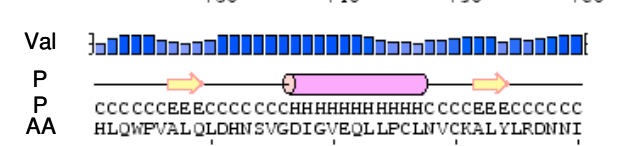
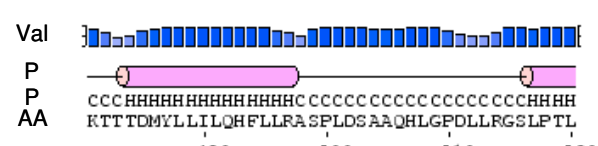
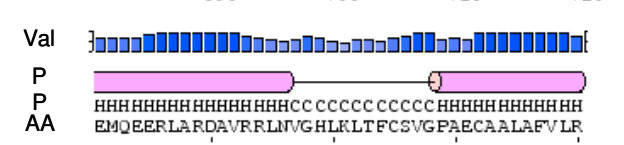
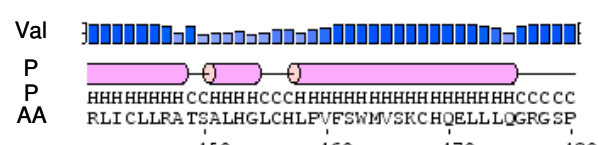
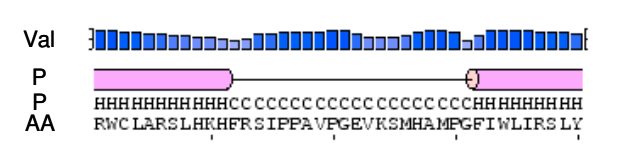
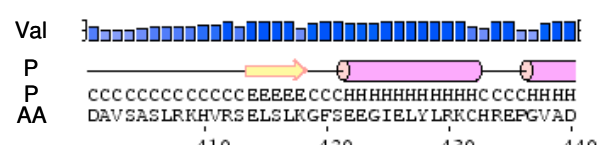
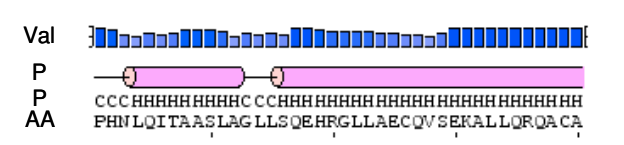
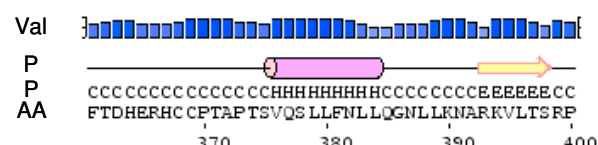
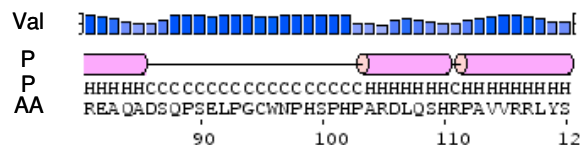
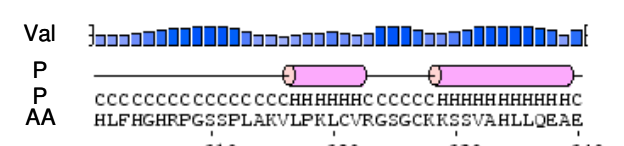
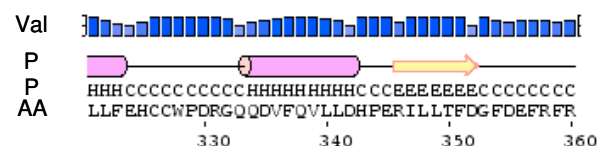
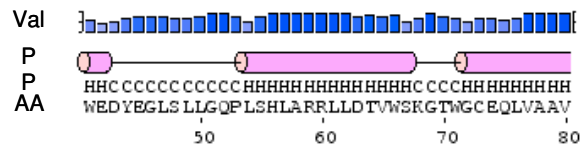
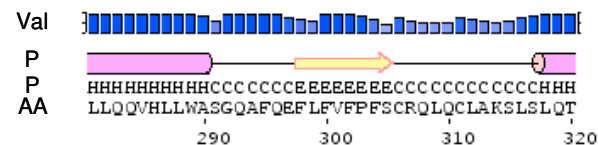
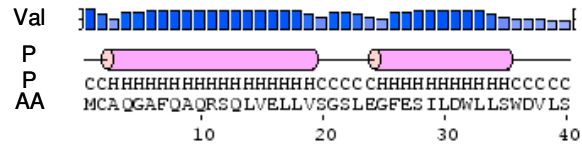
Es wurden keine Unterschiede in den kodierenden Sequenzen gefunden. Die Kongruenz beträgt 100,00 % (3057bp/3057bp). Es wurden keine Lücken gefunden (0bp/3057bp). Der bit-score beträgt 5646 und der E-Wert ist 0,0.

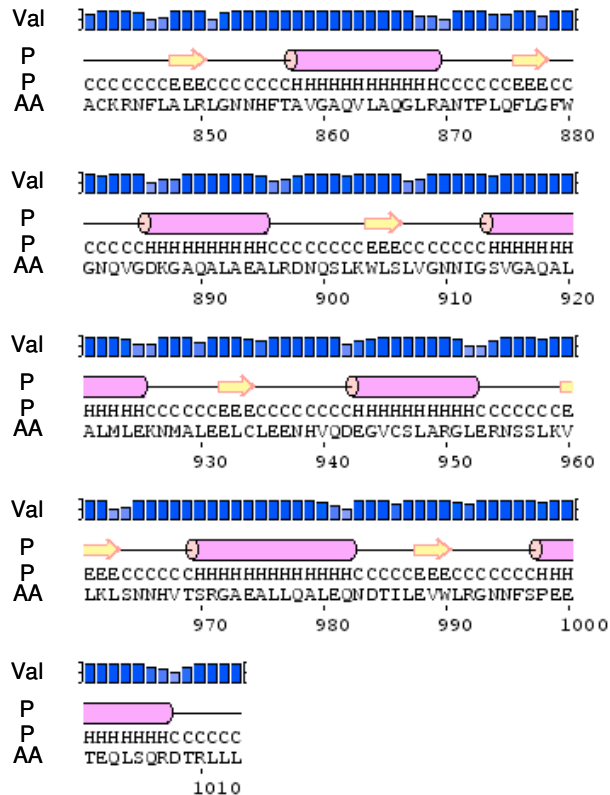
Darstellung der Sekundärstruktur des porcinen NOD1

IXX



Darstellung der Sekundärstruktur des porcinen NOD2





Legende:

} ||||| { Validität der Prognose (Val)
- +

○ Helix (H)
➡ Falblatt (E)
— Schleife (C)

P Prognose der Sekundärstruktur
AA Aminosäuresequenz poNOD

Abb. 53 Darstellung der Sekundärstruktur des porcinen NOD2
Gezeigt ist die vorausgesagte Sekundärstruktur des NOD2-Proteins durch die Software PsiPred (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000).

Literatur

- Abdul-Sater, A. A., N. Said-Sadier, V. M. Lam, B. Singh, M. A. Pettengill, F. Soares, I. Tattoli, S. Lipinski, S. E. Girardin, P. Rosenstiel, und D. M. Ojcius.** (2010). Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial Nod-like family member NLRX1. *J. Biol. Chem.* **285**:41637-41645.
- Abe, H., I. Tatsuno, T. Tobe, A. Okutani, und C. Sasakawa.** (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **70**:3500-3509.
- Abshire, K. Z. und F. C. Neidhardt.** (1993). Growth rate paradox of *Salmonella typhimurium* within host macrophages. *J. Bacteriol.* **175**:3744-3748.
- Adkins, J. N., H. M. Mottaz, A. D. Norbeck, J. K. Gustin, J. Rue, T. R. Clauss, S. O. Purvine, K. D. Rodland, F. Heffron, und R. D. Smith.** (2006). Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. *Mol. Cell Proteomics.* **5**:1450-1461.
- Ahuja, S., M. L. Mago, L. N. Rao Bhau, und S. N. Saxena.** (1984). Gentamicin resistance among salmonellae. A ten-year study, 1973-1982. *Antonie Van Leeuwenhoek* **50**:161-165.
- Akira, S. und K. Takeda.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:499-511.
- Akira, S., S. Uematsu, und O. Takeuchi.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* **124**:783-801.
- Akira, S.** (2006). TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**:1-16.:1-16.
- Aliprantis, A. O., R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, und A. Zychlinsky.** (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* **285**:736-739.
- Allan, D. und W. P. Duffus.** (1971). The immunopathology in fowls (*Gallus domesticus*) of acute and subacute *Salmonella gallinarum* infection. *Res. Vet. Sci.* **12**:140-151.
- Alpuche-Aranda, C. M., E. P. Berthiaume, B. Mock, J. A. Swanson, und S. I. Miller.** (1995). Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. *Infect. Immun.* **63**:4456-4462.
- Altekruse, S. F., M. L. Cohen, und D. L. Swerdlow.** (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.* **3**:285-293.
- Althouse, C., S. Patterson, P. Fedorka-Cray, und R. E. Isaacson.** (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect. Immun.* **71**:6446-6452.
- Altmeyer, R. M., J. K. McNern, J. C. Bossio, I. Rosenshine, B. B. Finlay, und J. E. Galan.** (1993). Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **7**:89-98.
- Alwis, M. C. und J. R. Thomlinson.** (1973). The incidence and distribution of colicinogenic and colicin-sensitive *Escherichia coli* in the gastro-intestinal tract of the pig. *J. Gen. Microbiol.* **74** :45-52.
- Alwis, M. C. und J. R. Thomlinson.** (1975). Some factors influencing colicin activity between pathogenic and commensal *Escherichia coli* from the pig. *Res. Vet. Sci.* **19**:63-70.
- Amavisit, P., D. Lightfoot, G. F. Browning, und P. F. Markham.** (2003). Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* **185**:3624-3635.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan, und A. Aderem.** (2005). Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:9247-9252.
- Anderson, K. V.** (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:13-19.

- Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, und R. E. Randall.** (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:17264-17269.
- Anonymus.** (2000). Infektionsschutzgesetz (IfSG) §§6,7, *In IfSG*, zuletzt geändert durch Art. 2aG vom 17.Juli 2009 BGBl. I 2091, 2094.
- Arce, C., M. Ramirez-Boo, C. Lucena, und J. J. Garrido.** (2010). Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **33**:161-174.
- Arnoult, D., F. Soares, I. Tattoli, C. Castanier, D. J. Philpott, und S. E. Girardin.** (2009). An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J. Cell Sci.* **122**:3161-3168.
- Athman, R. und D. Philpott.** (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:25-32.
- Auerbuch, V., D. T. Golenbock, und R. R. Isberg.** (2009). Innate immune recognition of *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion. *PLoS. Pathog.* **5**(12):e1000686.
- Augustin, D. K., Y. Song, M. S. Baek, Y. Sawa, G. Singh, B. Taylor, A. Rubio-Mills, J. L. Flanagan, J. P. Wiener-Kronish, und S. V. Lynch.** (2007). Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**:2203-2209.
- Backhed, F., L. Meijer, S. Normark, und A. Richter-Dahlfors.** (2002). TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cell Microbiol.* **4**:493-501.
- Baird-Parker, A. C.** (1990). Foodborne salmonellosis. *Lancet* **336**:1231-1235.
- Baker, S. und G. Dougan.** (2007). The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin. Infect. Dis.* **45 Suppl 1**:S29-S33.
- Bakowski, M. A., V. Braun, und J. H. Brummell.** (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic.* **9**:2022-2031.
- Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-Bensussan, und V. Gaboriau-Routhiau.** (2004). In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *J. Biol. Chem.* **279**:42984-42992.
- Barnich, N., T. Hisamatsu, J. E. Aguirre, R. Xavier, H. C. Reinecker, und D. K. Podolsky.** (2005). GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**:19021-19026.
- Barrow, P. A., J. M. Simpson, M. A. Lovell, und M. M. Binns.** (1987). Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect. Immun.* **55**:388-392.
- Barrow, P. A., M. B. Huggins, und M. A. Lovell.** (1994). Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect. Immun.* **62**:4602-4610.
- Basset, C., J. Holton, R. O'Mahony, und I. Roitt.** (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine.* **21 Suppl 2**:S12-S23.
- Baumgart, J., U. Eigener, J. Firnhaber, und G. Hildebrandt.** (2005). Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 3. Auflage (1997) Behrs Verlag, Hamburg. ISBN 978-3860221143.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, und F. Heffron.** (1996). (a) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**:1862-1865.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, F. A. Bove, J. G. Kusters, S. Hoffmann, und F. Heffron.** (1996). (b) The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect. Immun.* **64**:61-68.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, und F. Heffron.** (1996). (c) The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:279-283.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, T. A. Ficht, und L. G. Adams.** (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66**:4579-4587.

- Beinke, S., M. J. Robinson, M. Hugunin, und S. C. Ley.** (2004). Lipopolysaccharide activation of the TPL-2/MEK/extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade is regulated by IkappaB kinase-induced proteolysis of NF-kappaB1 p105. *Mol. Cell Biol.* **24**:9658-9667.
- Beltran, P., J. M. Musser, R. Helmuth, J. J. Farmer, III, W. M. Frerichs, I. K. Wachsmuth, K. Ferris, A. C. McWhorter, J. G. Wells, und A. Cravioto.** (1988). Toward a population genetic analysis of Salmonella: genetic diversity and relationships among strains of serotypes S. choleraesuis, S. derby, S. dublin, S. enteritidis, S. heidelberg, S. infantis, S. newport, and S. typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:7753-7757.
- Belvin, M. P. und K. V. Anderson.** (1996). A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:393-416.:393-416.
- Benoit, M., B. Desnues, und J. L. Mege.** (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **181**:3733-3739.
- Berends, B. R., H. A. Urlings, J. M. Snijders, und K. F. Van.** (1996). Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs. *Int. J. Food Microbiol.* **30**:37-53.
- Bertin, J., W. J. Nir, C. M. Fischer, O. V. Tayber, P. R. Errada, J. R. Grant, J. J. Keilty, M. L. Gosselin, K. E. Robison, G. H. Wong, M. A. Glucksmann, und P. S. DiStefano.** (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**:12955-12958.
- Bertrand, M. J., K. Doiron, K. Labbe, R. G. Korneluk, P. A. Barker, und M. Saleh.** (2009). Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity.* **30**:789-801.
- Bhutta, Z. A.** (2007). Salmonella, p. 1182-1191. *In* R. M. Kliegmann, R. E. Behrman, H. B. Jenson, and B. F. Stanton (ed.), *Textbook of Pediatrics*. 18. Auflage. Saunders. ISBN 978-1416024507.
- Birmingham, C. L., X. Jiang, M. B. Ohlson, S. I. Miller, und J. H. Brumell.** (2005). Salmonella-induced filament formation is a dynamic phenotype induced by rapidly replicating Salmonella enterica serovar typhimurium in epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**:1204-1208.
- Blaha, T.** (1993). The diffusion dynamics of salmonellae in animal herds. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **100**:278-280.
- Bodar, E., M. G. Netea, D. J. de Jong, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, und J. W. van der Meer.** (2008). NOD2 engagement induces proinflammatory cytokine production, but not apoptosis, in leukocytes isolated from patients with Crohn's disease. *Eur. Cytokine Netw.* **19**:185-189.
- Bohm, R.** (1993). Behavior of selected salmonellae in the environment. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **100**:275-278.
- Bolton, A. J., M. P. Osborne, T. S. Wallis, und J. Stephen.** (1999). Interaction of Salmonella choleraesuis, Salmonella dublin and Salmonella typhimurium with porcine and bovine terminal ileum in vivo. *Microbiology* **145**(Pt 9):2431-2441.
- Bolton, A. J., M. P. Osborne, und J. Stephen.** (2000). Comparative study of the invasiveness of Salmonella serotypes Typhimurium, Choleraesuis and Dublin for Caco-2 cells, HEp-2 cells and rabbit ileal epithelia. *J. Med. Microbiol.* **49**:503-511.
- Boneca, I. G., O. Dussurget, D. Cabanes, M. A. Nahori, S. Sousa, M. Lecuit, E. Psylinakis, V. Bouriotis, J. P. Hugot, M. Giovannini, A. Coyle, J. Bertin, A. Namane, J. C. Rousselle, N. Cayet, M. C. Prevost, V. Balloy, M. Chignard, D. J. Philpott, P. Cossart, und S. E. Girardin.** (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in Listeria evasion from the host innate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:997-1002.
- Bonizzi, G. und M. Karin.** (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**:280-288.
- Boyd, E. F., F. S. Wang, T. S. Whittam, und R. K. Selander.** (1996). Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:804-808.

- Boyen, F., F. Pasmans, E. Donne, F. Van Immerseel, C. Adriaensen, J. P. Hernalsteens, R. Ducatelle, und F. Haesebrouck.** (2006). Role of SPI-1 in the interactions of *Salmonella* Typhimurium with porcine macrophages. *Vet. Microbiol.* **113**:35-44.
- Braun, V., A. Wong, M. Landekic, W. J. Hong, S. Grinstein, und J. H. Brumell.** (2010). Sorting nexin 3 (SNX3) is a component of a tubular endosomal network induced by *Salmonella* and involved in maturation of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* **12**:1352-1367.
- Brawn, L. C., R. D. Hayward, und V. Koronakis.** (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host. Microbe* **1**:63-75.
- Brenner, D., N. Krieg, G. Garrity, und J. Staley.** (2005). The Proteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Ausgabe, New York Springer. ISBN 0387241450.
- Brogden, K. A., M. Ackermann, P. B. McCray, Jr., und B. F. Tack.** (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:465-478.
- Brooks, M. N., M. V. Rajaram, A. K. Azad, A. O. Amer, M. A. Valdivia-Arenas, J. H. Park, G. Nunez, und L. S. Schlesinger.** (2011). NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. *Cell Microbiol.* **13**:402-418.
- Brown, D. J., J. E. Olsen, und M. Bisgaard.** (1992). *Salmonella enterica*: infection, cross infection and persistence within the environment of a broiler parent stock unit in Denmark. *Zentralbl. Bakteriol.* **277**:129-138.
- Brown, D. R. und L. D. Price.** (2007). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC-J2) from porcine small intestine. *Vet. Microbiol.* **120**:328-333.
- Brown, K. L., R. Falsafi, W. Kum, P. Hamill, J. L. Gardy, D. J. Davidson, S. Turvey, B. B. Finlay, D. P. Speert, und R. E. Hancock.** (2010). Robust TLR4-induced gene expression patterns are not an accurate indicator of human immunity. *J. Transl. Med.* **8**:6.
- Browne, S. H., M. L. Lesnick, und D. G. Guiney.** (2002). Genetic requirements for salmonella-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* **70**:7126-7135.
- Bruey, J. M., N. Bruey-Sedano, R. Newman, S. Chandler, C. Stehlik, und J. C. Reed.** (2004). PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**:51897-51907.
- Bruey, J. M., N. Bruey-Sedano, F. Luciano, D. Zhai, R. Balpai, C. Xu, C. L. Kress, B. Bailly-Maitre, X. Li, A. Osterman, S. Matsuzawa, A. V. Terskikh, B. Faustin, und J. C. Reed.** (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* **129**:45-56.
- Brumell, J. H., P. Tang, M. L. Zaharik, und B. B. Finlay.** (2002). Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infect. Immun.* **70**:3264-3270.
- Brumell, J. H. und S. Grinstein.** (2004). *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:78-84.
- Buchmeier, N. A. und F. Heffron.** (1989). Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infect. Immun.* **57**:1-7.
- Buchmeier, N. A. und F. Heffron.** (1990). Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* **248**:730-732.
- Buchwald, D. S. und M. J. Blaser.** (1984). A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi *Salmonella*. *Rev. Infect. Dis.* **6**:345-356.
- Budiarti, S., Y. Hirai, J. Minami, S. Katayama, T. Shimizu, und A. Okabe.** (1991). Adherence to HEp-2 cells and replication in macrophages of *Salmonella* derby of human origin. *Microbiol. Immunol.* **35**:111-123.
- Bueno, S. M., C. A. Santiviago, A. A. Murillo, J. A. Fuentes, A. N. Trombert, P. I. Rodas, P. Youderian, und G. C. Mora.** (2004). Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* **186**:3202-3213.

- Bueno, S. M., P. A. Gonzalez, L. J. Carreno, J. A. Tobar, G. C. Mora, C. J. Pereda, F. Salazar-Onfray, und A. M. Kalergis.** (2008). The capacity of Salmonella to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology* **124**:522-533.
- Bulet, P., R. Stocklin, und L. Menin.** (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**:169-84.:169-184.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).** (2006). Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Gallus-gallus-Broilerbetrieben. Endbericht gemäß 2005/636/EG, *In* M. Hartung (ed.). Zoonoseberichterstattung BfR, [Online]http://www.bfr.bund.de/de/zoonosenberichterstattung_durch_das_bfr-300.html.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).** (2008). Grundlagenstudie zur Erhebung von Salmonellen in Truthühnerbeständen. Endbericht gemäß 2006/662/EG, *In* M. Hartung (ed.). Zoonoseberichterstattung BfR, [Online]http://www.bfr.bund.de/de/zoonosenberichterstattung_durch_das_bfr-300.html.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).** (2008). Grundlagenstudie zur Erhebung der Prävalenz von Salmonellen in Mastschweinen. Endbericht gemäß 2006/668/EG, *In* M. Hartung (ed.). Zoonoseberichterstattung BfR, [Online]http://www.bfr.bund.de/de/zoonosenberichterstattung_durch_das_bfr-300.html.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).** (2009). Grundlagenstudie zum Vorkommen von Salmonella spp. in Zuchtschweinebeständen. Stellungnahme Nr. 049/2009, *In* M. Hartung (ed.). Zoonoseberichterstattung BfR, [Online]http://www.bfr.bund.de/de/zoonosenberichterstattung_durch_das_bfr-300.html.
- Buning, J., G. Hundorfean, M. Schmitz, K. P. Zimmer, S. Strobel, A. Gebert, und D. Ludwig.** (2006). Antigen targeting to MHC class II-enriched late endosomes in colonic epithelial cells: trafficking of luminal antigens studied in vivo in Crohn's colitis patients. *FASEB J.* **20** :359-361.
- Burkey, T. E., K. A. Skjolaas, S. S. Dritz, und J. E. Minton.** (2009). Expression of porcine Toll-like receptor 2, 4 and 9 gene transcripts in the presence of lipopolysaccharide and Salmonella enterica serovars Typhimurium and Choleraesuis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **130** :96-101.
- Burns, K., J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, B. Maschera, A. Lewis, K. Ray, J. Tschopp, und F. Volpe.** (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* **2**:346-351.
- Camacho Villarreal, N. G., J. Ventura-Juarez, F. J. Castaneda-Ibarra, L. Ruiz-Maya, E. Garcia-Latorre, und R. Campos-Rodriguez.** (1995). Induction of humoral immune response to Salmonella typhimurium in mouse Peyer's patches. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **37**:153-160.
- Cario, E., I. M. Rosenberg, S. L. Brandwein, P. L. Beck, H. C. Reinecker, und D. K. Podolsky.** (2000). Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.* **164**:966-972.
- Cario, E. und D. K. Podolsky.** (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **68**:7010-7017.
- Carlson, S. A., M. Browning, K. E. Ferris, und B. D. Jones.** (2000). Identification of diminished tissue culture invasiveness among multiple antibiotic resistant Salmonella typhimurium DT104. *Microb. Pathog.* **28**:37-44.
- Caroff, M., D. Karibian, J. M. Cavillon, und N. Haeffner-Cavillon.** (2002). Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes. Infect.* **4**:915-926.
- Carter, P. B. und F. M. Collins.** (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* **139**:1189-1203.
- Castellucci, M. und R. Montesano.** (1988). Phorbol ester stimulates macrophage invasion of fibrin matrices. *Anat. Rec.* **220**:1-10.
- Cavillon, J. M.** (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed. Pharmacother.* **48**:445-453.
- Chamaillard, M., S. E. Girardin, J. Viala, und D. J. Philpott.** (2003). (a) Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* **5**:581-592.
- Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, und N. Inohara.**

- (2003). (b) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* **4**:702-707.
- Chamaillard, M., D. Philpott, S. E. Girardin, H. Zouali, S. Lesage, F. Chareyre, T. H. Bui, M. Giovannini, U. Zaehring, V. Penard-Lacronique, P. J. Sansonetti, J. P. Hugot, and G. Thomas.** (2003). (c) Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:3455-3460.
- Chaput, C., C. Ecobichon, N. Cayet, S. E. Girardin, C. Werts, S. Guadagnini, M. C. Prevost, D. Mengin-Lecreulx, A. Labigne, and I. G. Boneca.** (2006). Role of AmiA in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape. *PLoS. Pathog.* **2**(9):e97.
- Chauhan, V. S., D. G. Sterka, Jr., S. R. Furr, A. B. Young, and I. Marriott.** (2009). NOD2 plays an important role in the inflammatory responses of microglia and astrocytes to bacterial CNS pathogens. *Glia.* **57**:414-423.
- Cheminay, C., A. Mohlenbrink, and M. Hensel.** (2005). Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J. Immunol.* **174**:2892-2899.
- Chen, C. M., Y. Gong, M. Zhang, and J. J. Chen.** (2004). Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **279**:25876-25882.
- Chen, J., J. N. Rao, T. Zou, L. Liu, B. S. Marasa, L. Xiao, X. Zeng, D. J. Turner, and J. Y. Wang.** (2007). Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**:G568-G576.
- Chen, L. M., K. Kaniga, and J. E. Galan.** (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.* **21**:1101-1115.
- Chin, A. I., P. W. Dempsey, K. Bruhn, J. F. Miller, Y. Xu, and G. Cheng.** (2002). Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature.* **416**:190-194.
- Chiu, C. H., L. H. Su, and C. Chu.** (2004). *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:311-322.
- Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y. Chou, H. S. Wang, and Y. S. Lee.** (2005). The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res.* **33**:1690-1698.
- Choe, K. M., T. Werner, S. Stoven, D. Hultmark, and K. V. Anderson.** (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science.* **296**:359-362.
- Chu, C., S. F. Hong, C. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu, and J. T. Ou.** (1999). Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars typhimurium, enteritidis, choleraesuis, and dublin. *Infect. Immun.* **67**:2611-2614.
- Cirl, C., A. Wieser, M. Yadav, S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg, and T. Miethke.** (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.* **14**:399-406.
- Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons, and B. H. Hirst.** (1994). Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* **145**:543-552.
- Clemens, M. J. und A. Elia.** (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res.* **17**:503-524.
- Cloud-Hansen, K. A., S. B. Peterson, E. V. Stabb, W. E. Goldman, M. J. McFall-Ngai, and J. Handelsman.** (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:710-716.
- Collier-Hyams, L. S., H. Zeng, J. Sun, A. D. Tomlinson, Z. Q. Bao, H. Chen, J. L. Madara, K. Orth, and A. S. Neish.** (2002). Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J. Immunol.* **169**:2846-2850.
- Cooper, C. A., K. Zhang, S. N. Andres, Y. Fang, N. A. Kaniuk, M. Hannemann, J. H. Brumell, L. J. Foster, M. S. Junop, and B. K. Coombes.** (2010). Structural and biochemical characterization of SrcA, a multi-cargo type III secretion chaperone in *Salmonella* required for pathogenic association with a host. *PLoS. Pathog.* **6**(2):e1000751.

- Cossart, P. und P. J. Sansonetti.** (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**:242-248.
- Cowley, S. C., S. V. Myltseva, und F. E. Nano.** (1996). Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol. Microbiol.* **20**:867-874.
- Craven, P. C., D. C. Mackel, W. B. Baine, W. H. Barker, und E. J. Gangarosa.** (1975). International outbreak of *Salmonella* Eastbourne infection traced to contaminated chocolate. *Lancet* **1**:788-792.
- Crhanova, M., M. Malcova, M. Mazgajova, D. Karasova, A. Sebkova, A. Fucikova, Z. Bortlicek, L. Pilousova, K. Kyrova, M. Dekanova, und I. Rychlik.** (2011). LPS structure influences protein secretion in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* **152**:131-137.
- Crump, J. A. und E. D. Mintz.** (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin. Infect. Dis.* **50**:241-246.
- D'Aoust, J. Y.** (1985). Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. *Am. J. Epidemiol.* **122**:717-720.
- da Silva, C. J., K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, und R. J. Ulevitch.** (2001). Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.* **276**:21129-21135.
- da Silva, C. J., Y. Miranda, N. Leonard, und R. Ulevitch.** (2007). SGT1 is essential for Nod1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:6764-6769.
- Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. Whyte, und D. H. Dockrell.** (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS. One.* **5**(1):e8668.
- Damiano, J. S., C. Stehlik, F. Pio, A. Godzik, und J. C. Reed.** (2001). CLAN, a novel human CED-4-like gene. *Genomics* **75**:77-83.
- Damiano, J. S., V. Oliveira, K. Welsh, und J. C. Reed.** (2004). Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem. J.* **381**:213-219.
- Danbara, H., R. Moriguchi, S. Suzuki, Y. Tamura, M. Kijima, K. Oishi, H. Matsui, A. Abe, und M. Nakamura.** (1992). Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strain on pig septicemia. *J. Vet. Med. Sci.* **54**:1175-1178.
- Delbridge, L. M. und M. X. O'Riordan.** (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:10-16.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, und Z. J. Chen.** (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.* **103**:351-361.
- Deretic, V.** (2011). Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev.* **240**:92-104.
- Dhillon, T. S. und E. K. Dhillon.** (1981). Incidence of lysogeny, colicinogeny, and drug resistance in enterobacteria isolated from sewage and from rectum of humans and some domesticated species. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:894-902.
- Dias, M., B. Antony, H. Pinto, und B. Rekha.** (2009). *Salmonella enterica* serotype Dublin bacteraemia mimicking enteric fever. *Indian J. Med. Microbiol.* **27**:365-367.
- Dinarello, C. A.** (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **20**:S1-13.
- Drecktrah, D., S. Levine-Wilkinson, T. Dam, S. Winfree, L. A. Knodler, T. A. Schroer, und O. Steele-Mortimer.** (2008). Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic.* **9**:2117-2129.
- Drewinko, B., M. M. Romsdahl, L. Y. Yang, M. J. Ahearn, und J. M. Trujillo.** (1976). Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* **36**:467-475.
- Duguid, J. P., M. R. Darekar, und D. W. Wheeler.** (1976). Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.* **9**:459-473.

- Dumont, J. A. und A. J. Bitonti.** (1994). Modulation of human melanoma cell metastasis and adhesion may involve integrin phosphorylation mediated through protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**:264-272.
- Duncan, J. A., D. T. Bergstralh, Y. Wang, S. B. Willingham, Z. Ye, A. G. Zimmermann, und J. P. Ting.** (2007). Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:8041-8046.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff, und J. Fierer.** (1993). Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* **61**:4569-4574.
- Eckmann, L., W. F. Stenson, T. C. Savidge, D. C. Lowe, K. E. Barrett, J. Fierer, J. R. Smith, und M. F. Kagnoff.** (1997). Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. Bacterial entry induces epithelial prostaglandin h synthase-2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *J. Clin. Invest.* **100**:296-309.
- Eckmann, L. und M. F. Kagnoff.** (2001). Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes. Infect.* **3**:1191-1200.
- Eckmann, L.** (2004). Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**:82-88.
- Eckmann, L.** (2005). Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **21**:147-151.
- Eckmann, L.** (2006). Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **22**:95-101.
- Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira, und Reis e Sousa.** (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* **33**:827-833.
- EFSA - Report of European Food Safety Authority.** (2010). The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008., *In EFSA Journal* 8(1):1496[410pp] (ed.). Parma, Italy.
- Ehrbar, K., S. Miold, A. Friebel, S. Stender, und W. D. Hardt.** (2002). Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of Salmonella typhimurium. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:479-485.
- Eisenstein, T. K.** (2001). Implications of Salmonella-induced nitric oxide (NO) for host defense and vaccines: NO, an antimicrobial, antitumor, immunosuppressive and immunoregulatory molecule. *Microbes. Infect.* **3**:1223-1231.
- Ekperigin, H. E. und K. V. Nagaraja.** (1998). Microbial food borne pathogens. Salmonella. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* **14**:17-29.
- Elewaut, D., J. A. DiDonato, J. M. Kim, F. Truong, L. Eckmann, und M. F. Kagnoff.** (1999). NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.* **163**:1457-1466.
- Ellouz, F., A. Adam, R. Ciorbaru, und E. Lederer.** (1974). Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**:1317-1325.
- Eriksson, S., J. Bjorkman, S. Borg, A. Syk, S. Pettersson, D. I. Andersson, und M. Rhen.** (2000). Salmonella typhimurium mutants that downregulate phagocyte nitric oxide production. *Cell Microbiol.* **2**:239-250.
- Ernst, R. K., E. C. Yi, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett, und S. I. Miller.** (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa. *Science* **286**:1561-1565.
- Ernst, R. K., T. Guina, und S. I. Miller.** (2001). Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes. Infect.* **3**:1327-1334.
- Eswarappa, S. M., K. K. Panguluri, M. Hensel, und D. Chakravorty.** (2008). The yejABEF operon of Salmonella confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence. *Microbiology* **154**:666-678.
- Euzeby, J. P.** (1999). Revised Salmonella nomenclature: designation of Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species

of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 2**:927-930.

Evans, S. J., R. H. Davies, S. H. Binns, E. Liebana, T. W. Jones, M. F. Millar, E. J. Threlfall, L. R. Ward, K. L. Hopkins, P. H. Mackay, and P. J. Gayford. (2005). Multiple antimicrobial resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java in cattle: a case report. *Vet. Rec.* **156**:343-346.

Fang, F. C. und J. Fierer. (1991). Human infection with *Salmonella dublin*. *Medicine (Baltimore)* **70**:198-207.

Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, und D. G. Guiney. (1992). The alternative sigma factor katF (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:11978-11982.

Fearon, D. T. und R. M. Locksley. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* **272**:50-53.

Fedoraka-Cray, P. J., J. S. Bailey, N. J. Stern, N. A. Cox, S. R. Ladely, und M. Musgrove. (1999). Mucosal competitive exclusion to reduce *Salmonella* in swine. *J. Food Prot.* **62**:1376-1380.

Fehr, D., C. Casanova, A. Liverman, H. Blazkova, K. Orth, D. Dobbelaere, J. Frey, und S. E. Burr. (2006). AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-kappaB signalling pathway. *Microbiology* **152**:2809-2818.

Ferluga, J., H. U. Schorlemmer, L. C. Baptista, und A. C. Allison. (1976). Cytolytic effects of the complement cleavage product, C3a. *Br. J. Cancer.* **34**:626-634.

Fernandes-Alnemri, T., J. Wu, J. W. Yu, P. Datta, B. Miller, W. Jankowski, S. Rosenberg, J. Zhang, und E. S. Alnemri. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death. Differ.* **14**:1590-1604.

Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, und F. Heffron. (1986). Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:5189-5193.

Fields, P. I., E. A. Groisman, und F. Heffron. (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* **243**:1059-1062.

Figueroa-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol, und L. Bossi. (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **39**:260-271.

Fink, S. L. und B. T. Cookson. (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol.* **9**:2562-2570.

Finney, C. A., Z. Lu, L. Lebourhis, D. J. Philpott, und K. C. Kain. (2009). Disruption of Nod-like receptors alters inflammatory response to infection but does not confer protection in experimental cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**:718-722.

Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, und L. A. O'Neill. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **413**:78-83.

Foley, S. L., A. M. Lynne, und R. Nayak. (2008). *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim Sci.* **86**:E149-E162.

Folkman, J., C. C. Haudenschild, und B. R. Zetter. (1979). Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:5217-5221.

Forchielli, M. L. und W. A. Walker. (2005). The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br. J. Nutr.* **93 Suppl 1**:S41-S48.

Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, und G. Nunez. (2006). (a) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* **7**:576-582.

- Franchi, L., C. McDonald, T. D. Kanneganti, A. Amer, und G. Nunez.** (2006). (b) Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J. Immunol.* **177**:3507-3513.
- Franchi, L., T. D. Kanneganti, G. R. Dubyak, und G. Nunez.** (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* **282**:18810-18818.
- Frankenberger, M. und H. W. Ziegler-Heitbrock.** (1997). LPS tolerance in monocytes/macrophages: three 3' cytosins are required in the DNA binding motif for detection of upregulated NF-kappa B p50 homodimers. *Immunobiology* **198**:81-90.
- Fraser, I. P., H. Koziel, und R. A. Ezekowitz.** (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* **10**:363-372.
- Freudenberg, M. A., T. Merlin, M. Gumenscheimer, C. Kalis, R. Landmann, und C. Galanos.** (2001). Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes. Infect.* **3**:1213-1222.
- Friedrich-Loeffler-Institut (FLI).** (2010). Tiergesundheitsjahresbericht 2009, *In* Tiergesundheitsjahresbericht 2009.FLI (ed.). Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit Greifswald Insel-Riems, Poly Druck Dresden. ISSN 1867-9374.
- Friis, L. M., M. Keelan, und D. E. Taylor.** (2009). *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* **77**:1553-1560.
- Frirdich, E. und C. Whitfield.** (2005). Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J. Endotoxin. Res.* **11**:133-144.
- Fritz, J. H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J. G. Magalhaes, H. Fsihi, T. A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R. L. Ferrero, S. E. Girardin, und D. J. Philpott.** (2007). Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity.* **26**:445-459.
- Galan, J. E. und R. Curtiss, III.** (1989). Virulence and vaccine potential of *phoP* mutants of *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* **6**:433-443.
- Galan, J. E.** (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**:263-271.
- Galdiero, M., M. Vitiello, E. Sanzari, M. D'Isanto, A. Tortora, A. Longanella, und S. Galdiero.** (2002). Porins from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activate the transcription factors activating protein 1 and NF-kappaB through the Raf-1-mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect. Immun.* **70**:558-568.
- Ganz, T., M. E. Selsted, und R. I. Lehrer.** (1986). Antimicrobial activity of phagocyte granule proteins. *Semin. Respir. Infect.* **1**:107-117.
- Gao, X., F. Wan, K. Mateo, E. Callegari, D. Wang, W. Deng, J. Puente, F. Li, M. S. Chaussee, B. B. Finlay, M. J. Lenardo, und P. R. Hardwidge.** (2009). Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function. *PLoS. Pathog.* **5**(12):e1000708.
- Garcia-del Portillo, F., M. A. Stein, und B. B. Finlay.** (1997). Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing *Salmonella typhimurium* to vesicles of the host epithelial cell. *Infect. Immun.* **65**:24-34.
- Garvis, S. G., C. R. Beuzon, und D. W. Holden.** (2001). A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages. *Cell Microbiol.* **3**:731-744.
- Geddes, B. J., L. Wang, W. J. Huang, M. Lavellee, G. A. Manji, M. Brown, M. Jurman, J. Cao, J. Morgenstern, S. Merriam, M. A. Glucksmann, P. S. DiStefano, und J. Bertin.** (2001). Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:77-82.
- Gendler, S. J. und A. P. Spicer.** (1995). Epithelial mucin genes. *Annu. Rev. Physiol* **57**:607-634.

- Gerlach, R. G., D. Jackel, N. Geymeier, und M. Hensel.** (2007). Salmonella pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **75**:4697-4709.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, und J. L. Madara.** (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* **167**:1882-1885.
- Ghosh, S., M. J. May, und E. B. Kopp.** (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**:225-260.
- Giannella, R. A., O. Washington, P. Gemski, und S. B. Formal.** (1973). Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.* **128**:69-75.
- Gibson, A. M., N. Bratchell, und T. A. Roberts.** (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **6**:155-178.
- Girardin, S. E., R. Tournebize, M. Mavris, A. L. Page, X. Li, G. R. Stark, J. Bertin, P. S. DiStefano, M. Yaniv, P. J. Sansonetti, und D. J. Philpott.** (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* **2**:736-742.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, L. A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M. K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, J. Bertin, P. J. Sansonetti, und D. J. Philpott.** (2003). (a) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**:1584-1587.
- Girardin, S. E., J. P. Hugot, und P. J. Sansonetti.** (2003). (b) Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol.* **24**:652-658.
- Girardin, S. E., M. Jehanno, D. Mengin-Lecreux, P. J. Sansonetti, P. M. Alzari, und D. J. Philpott.** (2005). Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J. Biol. Chem.* **280**:38648-38656.
- Govoni, G. und P. Gros.** (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* **47**:277-284.
- Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C. G. Pfeifer, S. L. Marcus, S. D. Mills, D. J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B. B. Finlay, und P. Gros.** (1999). Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect. Immun.* **67**:2225-2232.
- Gray, J. T., P. J. Fedorka-Cray, T. J. Stabel, und T. T. Kramer.** (1996). Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:141-146.
- Greil, S.** (2002). Dissertation: Beeinflussung der Aktivität von NF-kappaB durch gram-negative Bakterien - Ein Beitrag zur Pathogenese der reaktiven Arthritis. Kinderklinik und Poliklinik der Universität Würzburg.
- Groisman, E. A., E. Chiao, C. J. Lipps, und F. Heffron.** (1989). *Salmonella typhimurium* phoP virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:7077-7081.
- Gross, O., A. Gewies, K. Finger, M. Schafer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Forster, und J. Ruland.** (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**:651-656.
- Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P. I. Fields, J. Bockemuhl, P. A. Grimont, und F. X. Weill.** (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* **161**:26-29.
- Guignot, J., M. F. Bernet-Camard, C. Pous, L. Plancon, C. Le Bouguenec, und A. L. Servin.** (2001). Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for alpha5beta1 integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect. Immun.* **69**:1856-1868.
- Guilloteau, L. A., T. S. Wallis, A. V. Gautier, S. MacIntyre, D. J. Platt, und A. J. Lax.** (1996). The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect. Immun.* **64**:3385-3393.

- Guiney, D. G., S. Libby, F. C. Fang, M. Krause, und J. Fierer.** (1995). Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in Salmonella. *Trends Microbiol.* **3**:275-279.
- Guiney, D. G.** (2005). The role of host cell death in Salmonella infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **289**:131-150.
- Guiney, D. G. und M. Lesnick.** (2005). Targeting of the actin cytoskeleton during infection by Salmonella strains. *Clin. Immunol.* **114**:248-255.
- Gulig, P. A. und T. J. Doyle.** (1993). The Salmonella typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect. Immun.* **61**:504-511.
- Gulig, P. A., T. J. Doyle, M. J. Clare-Salzler, R. L. Maiese, und H. Matsui.** (1997). Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- Salmonella typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* **65**:5191-5197.
- Gunn, J. S.** (2001). Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J. Endotoxin. Res.* **7**:57-62.
- Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, und S. I. Miller.** (1997). Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. *Science* **276**:250-253.
- Gupta, D., Q. Wang, C. Vinson, und R. Dziarski.** (1999). Bacterial peptidoglycan induces CD14-dependent activation of transcription factors CREB/ATF and AP-1. *J. Biol. Chem.* **274**:14012-14020.
- Gutierrez, O., C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez, und J. L. Fernandez-Luna.** (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* **277**:41701-41705.
- Gutzmann, F., H. Layton, K. Simkins, und H. Jarolmen.** (1976). Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of Salmonella typhimurium in experimentally infected swine. *Am. J. Vet. Res.* **37**:649-655.
- Hambleton, J., S. L. Weinstein, L. Lem, und A. L. DeFranco .** (1996). Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:2774-2778.
- Haraga, A. und S. I. Miller.** (2003). A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect. Immun.* **71**:4052-4058.
- Harder, J., L. Franchi, R. Munoz-Planillo, J. H. Park, T. Reimer, und G. Nunez.** (2009). Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J. Immunol.* **183**:5823-5829.
- Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, und J. E. Galan.** (1998). S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**:815-826.
- Harton, J. A., M. W. Linhoff, J. Zhang, und J. P. Ting.** (2002). Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J. Immunol.* **169**:4088-4093.
- Hartung, M.** (2009). Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2007, *In* Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)-Wissenschaft (ed.). BfR-Hausdruckerei, Berlin. ISBN 3-938163-47-X.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, und K. V. Anderson.** (1988). The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**:269-279.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, und A. Aderem.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
- Hayden, M. S. und S. Ghosh.** (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**:2195-2224.
- Hayward, R. D. und V. Koronakis.** (1999). Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. *EMBO J.* **18**:4926-4934.

- Hedl, M., J. Li, J. H. Cho, und C. Abraham.** (2007). Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:19440-19445.
- Heffernan, E. J., J. Fierer, G. Chikami, und D. Guiney.** (1987). Natural history of oral Salmonella dublin infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence. *J. Infect. Dis.* **155**:1254-1259.
- Heine, H. und A. J. Ulmer.** (2005). Recognition of bacterial products by toll-like receptors. *Chem. Immunol. Allergy* **86**:99-119.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, und S. Akira.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-745.
- Henderson, S. C., D. I. Bounous, und M. D. Lee.** (1999). Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis. *Infect. Immun.* **67**:3580-3586.
- Henikoff, S. und J. G. Henikoff.** (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:10915-10919.
- Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, und D. W. Holden.** (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**:163-174.
- Hensel, M.** (2004). Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:95-102.
- Hernandez, L. D., K. Hueffer, M. R. Wenk, und J. E. Galan.** (2004). Salmonella modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* **304**:1805-1807.
- Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, und A. Zychlinsky.** (1999). The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:2396-2401.
- Hiemstra, P. S. und R. van Furth.** (1994). Antimicrobial mechanisms: antimicrobial polypeptides of mononuclear phagocytes. *Immunol. Ser.* **60**:197-202.
- Higgs, R., P. Cormican, S. Cahalane, B. Allan, A. T. Lloyd, K. Meade, T. James, D. J. Lynn, L. A. Babiuk, und C. O'farrelly.** (2006). Induction of a novel chicken Toll-like receptor following Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **74**:1692-1698.
- Hisamatsu, T., M. Suzuki, und D. K. Podolsky.** (2003). (a) Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**:32962-32968.
- Hisamatsu, T., M. Suzuki, H. C. Reinecker, W. J. Nadeau, B. A. McCormick, und D. K. Podolsky.** (2003). (b) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**:993-1000.
- Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis, und J. E. Galan.** (1997). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* **159**:5550-5559.
- Hobert, M. E., K. A. Sands, R. J. Mrsny, und J. L. Madara.** (2002). Cdc42 and Rac1 regulate late events in Salmonella typhimurium-induced interleukin-8 secretion from polarized epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**:51025-51032.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway, und R. A. Ezekowitz.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**:1313-1318.
- Holmes, M. A., P. Li, E. W. Petersdorf, und R. K. Strong.** (2002). Structural studies of allelic diversity of the MHC class I homolog MIC-B, a stress-inducible ligand for the activating immunoreceptor NKG2D. *J. Immunol.* **169**:1395-1400.
- Holmskov, U. L.** (2000). Collectins and collectin receptors in innate immunity. *APMIS Suppl* **100**:1-59.
- Hornef, M. W., T. Frisan, A. Vandewalle, S. Normark, und A. Richter-Dahlfors.** (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **195**:559-570.

- Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle, und S. Normark.** (2003). Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **198**:1225-1235.
- Hornig, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, und R. Medzhitov.** (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**:329-333.
- Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, und G. Hartmann.** (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**:994-997.
- Hsu, H. S.** (1989). Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis. *Microbiol. Rev.* **53**:390-409.
- Hsu, Y. M., Y. Zhang, Y. You, D. Wang, H. Li, O. Duramad, X. F. Qin, C. Dong, und X. Lin.** (2007). The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **8**:198-205.
- Huang, G. T., L. Eckmann, T. C. Savidge, und M. F. Kagnoff.** (1996). Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Clin. Invest* **98**:572-583.
- Huang, X. Z., B. Tall, W. R. Schwan, und D. J. Kopecko.** (1998). Physical limitations on *Salmonella typhi* entry into cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**:2928-2937.
- Huang, Y. Z., M. Zang, W. C. Xiong, Z. Luo, und L. Mei.** (2003). Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **278**:1108-1114.
- Huber-Lang, M., E. M. Younkin, J. V. Sarma, N. Riedemann, S. R. McGuire, K. T. Lu, R. Kunkel, J. G. Younger, F. S. Zetoune, und P. A. Ward.** (2002). Generation of C5a by phagocytic cells. *Am. J. Pathol.* **161**:1849-1859.
- Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou, und G. Thomas.** (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.
- Husemann, J., A. Obstfeld, M. Febbraio, T. Kodama, und S. C. Silverstein.** (2001). CD11b/CD18 mediates production of reactive oxygen species by mouse and human macrophages adherent to matrixes containing oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**:1301-1305.
- Hwang, M. H., D. Damte, J. S. Lee, E. Gebru, Z. Q. Chang, H. Cheng, B. Y. Jung, M. H. Rhee, und S. C. Park.** (2011). *Mycoplasma hyopneumoniae* induces pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production through NFkappaB and MAPK pathways in RAW264.7 cells. *Vet. Res. Commun.* **35**:21-34.
- Inohara, N., T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, und G. Nunez.** (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**:14560-14567.
- Inohara, N., Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto, und G. Nunez.** (2001). Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **276**:2551-2554.
- Inohara, N. und G. Nunez.** (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:371-382.
- Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, und G. Nunez.** (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* **278**:5509-5512.
- Irie, T., T. Muta, und K. Takeshige.** (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* **467(2-3)**:160-164.
- Iscove, N. N. und F. Melchers.** (1978). Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **147**:923-933.
- Ishibashi, Y. und T. Arai.** (1996). A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars. *Microb. Pathog.* **21**:435-446.
- Islam, D., L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, und G. Gudmundsson.** (2001). Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.* **7**:180-185.

- Ismair, M. G., S. R. Vavricka, G. A. Kullak-Ublick, M. Fried, D. Mengin-Lecreux, und S. E. Girardin.** (2006). hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **84**:1313-1319.
- Iwanaga, Y., M. P. Davey, T. M. Martin, S. R. Planck, M. L. DePriest, M. M. Baugh, C. M. Suing, und J. T. Rosenbaum.** (2003). Cloning, sequencing and expression analysis of the mouse NOD2/CARD15 gene. *Inflamm. Res.* **52**:272-276.
- Iwasaki, A. und B. L. Kelsall.** (1999). Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am. J. Physiol* **276**:G1074-G1078.
- Jackson, L. K., P. Nawabi, C. Hentea, E. A. Roark, und K. Haldar.** (2008). The Salmonella virulence protein SifA is a G protein antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:14141-14146.
- Janeway, C. A., Jr.** (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:7461-7468.
- Janeway, C. A., Jr. und R. Medzhitov.** (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:197-216.
- Janeway, C. A., Jr., P. Travers, M. Walport, und M. Shlomchik.** (2002). Immunologie. Spektrum, Akad Verlag, Heidelberg, Berlin. ISBN 3-8274-1079-7.
- Jann, O. C., A. King, N. L. Corrales, S. I. Anderson, K. Jensen, T. Ait-Ali, H. Tang, C. Wu, N. E. Cockett, A. L. Archibald, und E. J. Glass.** (2009). Comparative genomics of Toll-like receptor signalling in five species. *BMC. Genomics* **10**:216.
- Jarvelainen, H. A., A. Galmiche, und A. Zychlinsky.** (2003). Caspase-1 activation by Salmonella. *Trends Cell Biol.* **13**:204-209.
- Jelinek, J., J. Salat, B. Sak, und J. Kopecky.** (2007). Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol. (Praha)* **54**:172-176.
- Jenkin, CR. und D. Rowley.** (1963). Basis for immunity to typhoid in mice and the question of cellular immunity. *Bacteriol. Rev.* **27**:391-404.
- Jeru, I., P. Duquesnoy, T. Fernandes-Alnemri, E. Cochet, J. W. Yu, M. Lackmy-Port-Lis, E. Grimpel, J. Landman-Parker, V. Hentgen, S. Marlin, K. McElreavey, T. Sarkisian, G. Grateau, E. S. Alnemri, und S. Amselem.** (2008). Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:1614-1619.
- Jiang, H. und L. Chess.** (2009). How the immune system achieves self-nonsel self discrimination during adaptive immunity. *Adv. Immunol.* **102**:95-133.
- Jones, B. D., N. Ghorri, und S. Falkow.** (1994). Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15-23.
- Jones, D. T.** (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**:195-202.
- Jones, R. M., H. Wu, C. Wentworth, L. Luo, L. Collier-Hyams, und A. S. Neish.** (2008). (a) Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host. Microbe* **3**:233-244.
- Jones, T. F., L. A. Ingram, P. R. Cieslak, D. J. Vugia, M. Tobin-D'Angelo, S. Hurd, C. Medus, A. Cronquist, und F. J. Angulo.** (2008). (b) Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J. Infect. Dis.* **198**:109-114.
- Joosten, L. A., B. Heinhuis, S. Abdollahi-Roodsaz, G. Ferwerda, L. Lebourhis, D. J. Philpott, M. A. Nahori, C. Popa, S. A. Morre, J. W. van der Meer, S. E. Girardin, M. G. Netea, und W. B. van den Berg.** (2008). Differential function of the NACHT-LRR (NLR) members Nod1 and Nod2 in arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:9017-9022.
- Jozaki, K., H. Shinkai, M. Tanaka-Matsuda, T. Morozumi, T. Matsumoto, D. Toki, N. Okumura, T. Eguchi-Ogawa, C. Kojima-Shibata, H. Kadowaki, E. Suzuki, Y. Wada, und H. Uenishi.** (2009). Influence of polymorphisms in porcine NOD2 on ligand recognition. *Mol. Immunol.* **47**:247-252.

- Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, und M. F. Kagnoff.** (1995). A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest* **95**:55-65.
- Kaiser, P., L. Rothwell, E. E. Galyov, P. A. Barrow, J. Burnside, und P. Wigley.** (2000). Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology* **146 Pt 12**:3217-3226.
- Kajava, A. V.** (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* **277**:519-527.
- Kana, R., P. Dunder, D. Tvrdik, E. Necas, und C. Povysil.** (2006). Expression of actin isoforms in human auricular cartilage. *Folia Biol. (Praha)* **52**:167-172.
- Kaniga, K., J. Uralil, J. B. Bliska, und J. E. Galan.** (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **21**:633-641.
- Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira, und G. Nunez.** (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**:233-236.
- Karin, M., Z. Liu, und E. Zandi.** (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:240-246.
- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, und S. Akira.** (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**:101-105.
- Kauffmann, F.** (1966). *The bacteriology of Enterobacteriaceae: collected studies.* Williams & Wilkins, 3. Ausgabe, University of Wisconsin - Madison.
- Kauffmann, F.** (1978). *Das Fundament: Zur Geschichte und Bedeutung der Salmonella- und Escherichia-Forschung.*, In University of California (ed.), Munksgaard, Copenhagen. ISBN 8716028848.
- Kawai, T. und S. Akira.** (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**:338-344.
- Kawasaki, A., Y. Karasudani, Y. Otsuka, M. Hasegawa, N. Inohara, Y. Fujimoto, und K. Fukase.** (2008). Synthesis of diaminopimelic acid containing peptidoglycan fragments and tracheal cytotoxin (TCT) and investigation of their biological functions. *Chemistry*. **14**:10318-10330.
- Kawasaki, K., R. K. Ernst, und S. I. Miller.** (2005). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* **187**:2448-2457.
- Kenny, E. F., S. Talbot, M. Gong, D. T. Golenbock, C. E. Bryant, und L. A. O'Neill.** (2009). MyD88 adaptor-like is not essential for TLR2 signaling and inhibits signaling by TLR3. *J. Immunol.* **183** :3642-3651.
- Khan, S. A., P. Everest, S. Servos, N. Foxwell, U. Zahringer, H. Brade, E. T. Rietschel, G. Dougan, I. G. Charles, und D. J. Maskell.** (1998). A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol. Microbiol.* **29**:571-579.
- Khorramizadeh, M. R., S. Hosseinzadeh, F. Safavifar, F. Saadat, N. Aalizadeh, R. Falak, Z. Jadali, und M. Pezeshki.** (2007). Interaction of CpG-oligodeoxynucleotides with Toll like receptor 9 induces apoptosis and modulates metalloproteinase-2 activity in human intestinal epithelium. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* **6**:107-114.
- Kihlstrom, E.** (1977). Infection of HeLa cells with *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR10 bacteria. *Infect. Immun.* **17**:290-295.
- Kim, D. W., G. Lenzen, A. L. Page, P. Legrain, P. J. Sansonetti, und C. Parsot.** (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:14046-14051.
- Kim, J. M., L. Eckmann, T. C. Savidge, D. C. Lowe, T. Witthoft, und M. F. Kagnoff.** (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J. Clin. Invest* **102**:1815-1823.

- Kingsley, R. A. und A. J. Baumler.** (2000). Host adaptation and the emergence of infectious disease: the Salmonella paradigm. *Mol. Microbiol.* **36**:1006-1014.
- Kingsley, R. A., A. D. Humphries, E. H. Weening, M. R. De Zoete, S. Winter, A. Papaconstantinou, G. Dougan, und A. J. Baumler.** (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of Salmonella enterica serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect. Immun.* **71**:629-640.
- Kleinert, H., C. Euchenhofer, I. Ihrig-Biedert, und U. Forstermann.** (1996). In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **271**:6039-6044.
- Knodler, L. A., B. B. Finlay, und O. Steele-Mortimer.** (2005). The Salmonella effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J. Biol. Chem.* **280**:9058-9064.
- Knodler, L. A. und O. Steele-Mortimer.** (2005). The Salmonella effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Mol. Biol. Cell* **16**:4108-4123.
- Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov, und R. A. Flavell.** (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**:194-199.
- Kobayashi, K. S., M. Chamillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, und R. A. Flavell.** (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**:731-734.
- Kobe, B. und J. Deisenhofer.** (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* **374**:183-186.
- Kobe, B. und A. V. Kajava.** (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:725-732.
- Kohbata, S., H. Yokoyama, und E. Yabuuchi.** (1986). Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol. Immunol.* **30**:1225-1237.
- Kojima-Shibata, C., H. Shinkai, T. Morozumi, K. Jozaki, D. Toki, T. Matsumoto, H. Kadowaki, E. Suzuki, und H. Uenishi.** (2009). Differences in distribution of single nucleotide polymorphisms among intracellular pattern recognition receptors in pigs. *Immunogenetics* **61**:153-160.
- Kolch, W.** (2003). Erbin: sorting out ErbB2 receptors or giving Ras a break? *Sci. STKE.* **2003(199)**:e37.
- Kops, S. K., D. K. Lowe, W. M. Bement, und A. B. West.** (1996). Migration of Salmonella typhi through intestinal epithelial monolayers: an in vitro study. *Microbiol. Immunol.* **40**:799-811.
- Kotova, A. L., S. A. Kondratskaya, und I. M. Yasutis.** (1988). Salmonella carrier state and biological characteristics of the infectious agent. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **32**:71-78.
- Kramer, M., J. Boeck, D. Reichenbach, C. Kaether, S. Schreiber, M. Platzer, P. Rosenstiel, und K. Huse.** (2010). NOD2-C2 - a novel NOD2 isoform activating NF-kappaB in a muramyl dipeptide-independent manner. *BMC. Res. Notes* **3**:224.
- Krauss, H., A. Weber, M. Appel, B. Enders, A. Graevenitz, H. Isenberg, H. Schiefer, W. Slenczka, und H. Zahner.** (2004). Zoonosen. Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln. ISBN 3-7691-0406-4.
- Krieg, A., R. G. Correa, J. B. Garrison, G. Le Negrate, K. Welsh, Z. Huang, W. T. Knoefel, und J. C. Reed.** (2009). XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:14524-14529.
- Krieg, A. M.** (2000). The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:35-43.
- Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan, und C. Gelinas.** (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**:8961-8982.
- Kufer, T. A., E. Kremmer, D. J. Banks, und D. J. Philpott.** (2006). Role for erbin in bacterial activation of Nod2. *Infect. Immun.* **74**:3115-3124.

- Kufer, T. A., E. Kremmer, A. C. Adam, D. J. Philpott, und P. J. Sansonetti.** (2008). The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol.* **10**:477-486.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley, und K. Tamura.** (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinform.* **9**:299-306.
- Kusters, J. G., G. A. Mulders-Kremers, C. E. van Doornik, und B. A. van der Zeijst.** (1993). Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **61**:5013-5020.
- Kwan, L. Y. und R. E. Isaacson.** (1998). Identification and characterization of a phase-variable nonfimbrial *Salmonella typhimurium* gene that alters O-antigen production. *Infect. Immun.* **66**:5725-5730.
- Laing, K. J., M. K. Purcell, J. R. Winton, und J. D. Hansen.** (2008). A genomic view of the NOD-like receptor family in teleost fish: identification of a novel NLR subfamily in zebrafish. *BMC. Evol. Biol.* **8**:42.
- Laitio, P., M. Virtala, M. Salmi, L. J. Pelliniemi, D. T. Yu, und K. Granfors.** (1997). HLA-B27 modulates intracellular survival of *Salmonella enteritidis* in human monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**:1331-1338.
- Lambert, M. A. und S. G. Smith.** (2008). The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC. Microbiol.* **8**:142.
- Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, L. Franchi, und G. Nunez.** (2007). Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **82**:220-225.
- Lange, C., G. Hemmrich, U. C. Klostermeier, J. A. Lopez-Quintero, D. J. Miller, T. Rahn, Y. Weiss, T. C. Bosch, und P. Rosenstiel.** (2011). Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution. *Mol. Biol. Evol.* **28**:1687-1702.
- Langermans, J. A., M. E. van der Hulst, P. H. Nibbering, und F. R. van.** (1990). Activation of mouse peritoneal macrophages during infection with *Salmonella typhimurium* does not result in enhanced intracellular killing. *J. Immunol.* **144**:4340-4346.
- Lara-Tejero, M., F. S. Sutterwala, Y. Ogura, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, R. A. Flavell, und J. E. Galan.** (2006). Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. *J. Exp. Med.* **203**:1407-1412.
- Lavelle, E. C., C. Murphy, L. A. O'Neill, und E. M. Creagh.** (2010). The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal. Immunol.* **3**:17-28.
- Lawrence, T., D. W. Gilroy, P. R. Colville-Nash, und D. A. Willoughby.** (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat. Med.* **7**:1291-1297.
- Le Bourhis, L., J. G. Magalhaes, T. Selvanantham, L. H. Travassos, K. Geddes, J. H. Fritz, J. Viala, K. Tedin, S. E. Girardin, und D. J. Philpott.** (2009). Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during *Salmonella* pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **77**:4480-4486.
- Le Minor, L., M. Veron, und M. Popoff.** (1982). A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Ann. Microbiol. (Paris)* **133**:245-254.
- Le Minor, L. und J. Bockemuhl.** (1984). Supplement No. XXVII (1983) to the Kauffmann-White scheme. *Ann. Microbiol. (Paris)* **135B**:45-51.
- Le Minor, L.** (1994). The genus *Salmonella*. Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E.: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass.* Volume 6, New York Springer. ISBN 0-387-25496-X.
- Le Negrate, G., B. Faustin, K. Welsh, M. Loeffler, M. Krajewska, P. Hasegawa, S. Mukherjee, K. Orth, S. Krajewski, A. Godzik, D. G. Guiney, und J. C. Reed.** (2008). (a) *Salmonella* secreted factor L deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* inhibits NF-kappaB, suppresses IkappaBalpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J. Immunol.* **180**:5045-5056.
- Le Negrate, G., A. Krieg, B. Faustin, M. Loeffler, A. Godzik, S. Krajewski, und J. C. Reed.** (2008). (b) ChlaDub1 of *Chlamydia trachomatis* suppresses NF-kappaB activation and inhibits IkappaBalpha ubiquitination and degradation. *Cell Microbiol.* **10**:1879-1892.

- LeBlanc, P. M., G. Yeretssian, N. Rutherford, K. Doiron, A. Nadiri, L. Zhu, D. R. Green, S. Gruenheid, und M. Saleh.** (2008). Caspase-12 modulates NOD signaling and regulates antimicrobial peptide production and mucosal immunity. *Cell Host. Microbe* **3**:146-157.
- Lee, B. C., M. S. Kim, S. H. Choi, und T. S. Kim.** (2010). Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF-kappaB pathway in *Vibrio vulnificus*-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* **25**:581-591.
- Lee, J., L. Mira-Arbibe, und R. J. Ulevitch.** (2000). TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* **68**:909-915.
- Lee, J., I. Tattoli, K. A. Wojtal, S. R. Vavricka, D. J. Philpott, und S. E. Girardin.** (2009). pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J. Biol. Chem.* **284**:23818-23829.
- Leipe, D. D., E. V. Koonin, und L. Aravind.** (2004). STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* **343**:1-28.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, und J. A. Hoffmann.** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973-983.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, und J. A. Bluestone.** (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:233-258.
- Lesage, S., H. Zouali, J. P. Cezard, J. F. Colombel, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, R. Modigliani, C. Gower-Rousseau, J. Macry, F. Merlin, M. Chamailard, A. S. Jannot, G. Thomas, und J. P. Hugot.** (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Hum. Genet.* **70**:845-857.
- Letunic, I., T. Doerks, und P. Bork.** (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **37**:D229-D232.
- Leulier, F., C. Parquet, S. Pili-Floury, J. H. Ryu, M. Caroff, W. J. Lee, D. Mengin-Lecreulx, und B. Lemaitre.** (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* **4**:478-484.
- Li, J., K. Nelson, A. C. McWhorter, T. S. Whittam, und R. K. Selander.** (1994). Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:2552-2556.
- Liang, H. H., Z. Cheng, X. L. Yang, S. Li, Z. Q. Ding, T. S. Zhou, W. J. Zhang, und J. K. Chen.** (2008). Genetic diversity and structure of *Cordyceps sinensis* populations from extensive geographical regions in China as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *J. Microbiol.* **46**:549-556.
- Liao, A. P., E. O. Petrof, S. Kuppireddi, Y. Zhao, Y. Xia, E. C. Claud, und J. Sun.** (2008). *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS. One.* **3**(6):e2369.
- Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer, und F. Heffron.** (1994). A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:489-493.
- Libby, S. J., L. G. Adams, T. A. Ficht, C. Allen, H. A. Whitford, N. A. Buchmeier, S. Bossie, und D. G. Guiney.** (1997). The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect. Immun.* **65**:1786-1792.
- Lich, J. D. und J. P. Ting.** (2007). Monarch-1/PYPAF7 and other CATERPILLER (CLR, NOD, NLR) proteins with negative regulatory functions. *Microbes. Infect.* **9**:672-676.
- Lien, E., T. K. Means, H. Heine, A. Yoshimura, S. Kusumoto, K. Fukase, M. J. Fenton, M. Oikawa, N. Qureshi, B. Monks, R. W. Finberg, R. R. Ingalls, und D. T. Golenbock.** (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest* **105**:497-504.
- Lin, W. W., S. H. Chang, und S. M. Wang.** (1999). Roles of atypical protein kinase C in lysophosphatidic acid-induced type II adenylyl cyclase activation in RAW 264.7 macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **128**:1189-1198.

- Lindgren, S. W., I. Stojiljkovic, und F. Heffron.** (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:4197-4201.
- Lindquist, B. L., E. Leberthal, P. C. Lee, M. W. Stinson, und J. M. Merrick.** (1987). Adherence of *Salmonella typhimurium* to small-intestinal enterocytes of the rat. *Infect. Immun.* **55**:3044-3050.
- Lipinski, S., A. Till, C. Sina, A. Arlt, H. Grasberger, S. Schreiber, und P. Rosenstiel.** (2009). DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J. Cell Sci.* **122**:3522-3530.
- Lissner, C. R., R. N. Swanson, und A. D. O'Brien.** (1983). Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J. Immunol.* **131**:3006-3013.
- Lomaga, M. A., W. C. Yeh, I. Sarosi, G. S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, S. Kaufman, H. A. van der, A. Itie, A. Wakeham, W. Khoo, T. Sasaki, Z. Cao, J. M. Penninger, C. J. Paige, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, W. J. Boyle, D. V. Goeddel, und T. W. Mak.** (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.* **13**:1015-1024.
- Lord, C. A., D. Savitsky, R. Sitcheran, K. Calame, J. R. Wright, J. P. Ting, und K. L. Williams.** (2009). Blimp-1/PRDM1 mediates transcriptional suppression of the NLR gene NLRP12/Monarch-1. *J. Immunol.* **182**:2948-2958.
- Lu, S., A. R. Manges, Y. Xu, F. C. Fang, und L. W. Riley.** (1999). Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. *Infect. Immun.* **67**:5651-5657.
- Luderitz, O., C. Galanos, V. Lehmann, M. Nurminen, E. T. Rietschel, G. Rosenfelder, M. Simon, und O. Westphal.** (1973). Lipid A: chemical structure and biological activity. *J. Infect. Dis.* **128**:(Suppl.)17-29.
- Lundberg, U., U. Vinatzer, D. Berdnik, G. A. von, und M. Baccarini.** (1999). Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J. Bacteriol.* **181**:3433-3437.
- Ly, K. T. und J. E. Casanova.** (2007). Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol.* **9**:2103-2111.
- Macaluso, F., M. Nothnagel, Q. Parwez, E. Petrasch-Parwez, F. G. Bechara, J. T. Epplen, und S. Hoffjan.** (2007). Polymorphisms in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* **16**:692-698.
- Mackey, B. M. und C. Derrick.** (1990). Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:373-383.
- Maeda, S., L. C. Hsu, H. Liu, L. A. Bankston, M. Iimura, M. F. Kagnoff, L. Eckmann, und M. Karin.** (2005). Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **307**:734-738.
- Magalhaes, J. G., D. J. Philpott, M. A. Nahori, M. Jehanno, J. Fritz, L. Le Bourhis, J. Viala, J. P. Hugot, M. Giovannini, J. Bertin, M. Lepoivre, D. Mengin-Lecreux, P. J. Sansonetti, und S. E. Girardin.** (2005). Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep.* **6**:1201-1207.
- Maki-Ikola, O. und K. Granfors.** (1992). *Salmonella*-triggered reactive arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **21**:265-270.
- Mandell, G. L.** (1973). Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics. *J. Clin. Invest.* **52**:1673-1679.
- Manning, E. J., G. D. Baird, und P. W. Jones.** (1986). The role of plasmid genes in the pathogenicity of *Salmonella dublin*. *J. Med. Microbiol.* **21**:239-243.
- Marathe, R. und S. P. Dinesh-Kumar.** (2003). Plant defense: one post, multiple guards?! *Mol. Cell* **11**:284-286.
- Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, und V. M. Dixit.** (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**:213-218.

- Mariathasan, S. und D. M. Monack.** (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:31-40.
- Marina-Garcia, N., L. Franchi, Y. G. Kim, Y. Hu, D. E. Smith, G. J. Boons, und G. Nunez.** (2009). Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J. Immunol.* **182**:4321-4327.
- Marr, N., A. M. Hajjar, N. R. Shah, A. Novikov, C. S. Yam, M. Caroff, und R. C. Fernandez.** (2010). Substitution of the Bordetella pertussis lipid A phosphate groups with glucosamine is required for robust NF-kappaB activation and release of proinflammatory cytokines in cells expressing human but not murine Toll-like receptor 4-MD-2-CD14. *Infect. Immun.* **78**:2060-2069.
- Marriott, I., D. M. Rati, S. H. McCall, und S. L. Tranguch.** (2005). Induction of Nod1 and Nod2 intracellular pattern recognition receptors in murine osteoblasts following bacterial challenge. *Infect. Immun.* **73**:2967-2973.
- Martin-Villa, J. M., S. Ferre-Lopez, J. C. Lopez-Suarez, A. Corell, M. Perez-Blas, und A. Arnaiz-Villena.** (1997). Cell surface phenotype and ultramicroscopic analysis of purified human enterocytes: a possible antigen-presenting cell in the intestine. *Tissue Antigens* **50**:586-592.
- Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani, und M. Locati.** (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* **13**:453-461.
- Martinon, F., K. Burns, und J. Tschopp.** (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**:417-426.
- Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan, und J. Tschopp.** (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.* **14**:1929-1934.
- Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, und J. Tschopp.** (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**:237-241.
- Maruyama, K., G. Sano, N. Ray, Y. Takada, und K. Matsuo.** (2007). c-Fos-deficient mice are susceptible to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **75**:1520-1523.
- Mastroeni, P., F. J. Morgan, T. J. McKinley, E. Shawcroft, S. Clare, D. J. Maskell, und A. J. Grant.** (2011). Enhanced virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium after passage through mice. *Infect. Immun.* **79**:636-643.
- Masumoto, J., K. Yang, S. Varambally, M. Hasegawa, S. A. Tomlins, S. Qiu, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, S. J. Foster, Y. Horie, T. W. Mak, G. Nunez, A. M. Chinnaiyan, K. Fukase, und N. Inohara.** (2006). Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J. Exp. Med.* **203**:203-213.
- Mavris, M. und P. Sansonetti.** (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**:373-386.
- Maw, J. und G. G. Meynell.** (1968). The true division and death rates of Salmonella typhimurium in the mouse spleen determined with superinfecting phage P22. *Br. J. Exp. Pathol.* **49**:597-613.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, und R. K. Wilson.** (2001). Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
- McCollister, B. D., T. J. Bourret, R. Gill, J. Jones-Carson, und A. Vazquez-Torres.** (2005). Repression of SPI2 transcription by nitric oxide-producing, IFN-gamma-activated macrophages promotes maturation of Salmonella phagosomes. *J. Exp. Med.* **202**:625-635.
- McCormick, B. A., C. A. Parkos, S. P. Colgan, D. K. Carnes, und J. L. Madara.** (1998). Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by Salmonella typhimurium. *J. Immunol.* **160**:455-466.
- McDonald, C., N. Inohara, und G. Nunez.** (2005). (a) Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.* **280**:20177-20180.
- McDonald, C., F. F. Chen, V. Ollendorff, Y. Ogura, S. Marchetto, P. Lecine, J. P. Borg, und G. Nunez.** (2005). (b) A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* **280**:40301-40309.

- McGhie, E. J., R. D. Hayward, und V. Koronakis.** (2004). Control of actin turnover by a salmonella invasion protein. *Mol. Cell* **13**:497-510.
- McGuffin, L. J., K. Bryson, und D. T. Jones.** (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*. **16**:404-405.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, und C. A. Janeway, Jr.** (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
- Medzhitov, R. und C. A. Janeway, Jr.** (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* **10**:351-353.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, und C. A. Janeway, Jr.** (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**:253-258.
- Medzhitov, R. und C. Janeway, Jr.** (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* **173**:89-97.
- Medzhitov, R.** (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:135-145.
- Medzhitov, R. und C. A. Janeway, Jr.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**:298-300.
- Meerburg, B. G., W. F. Jacobs-Reitsma, J. A. Wagenaar, und A. Kijlstra.** (2006). Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** :960-962.
- Menendez, A., E. T. Arena, J. A. Guttman, L. Thorson, B. A. Vallance, W. Vogl, und B. B. Finlay.** (2009). *Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever. *J. Infect. Dis.* **200**:1703-1713.
- Mercurio, F. und A. M. Manning.** (1999). Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:226-232.
- Merendino, N., M. B. Dwinell, N. Varki, L. Eckmann, und M. F. Kagnoff.** (1999). Human intestinal epithelial cells express receptors for platelet-activating factor. *Am. J. Physiol* **277**:G810-G818.
- Meyer, H.** (1999). Animals as sources of infections in humans-salmonellosis. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **106**:344-351.
- Meyers, B. C., A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B. W. Sobral, und N. D. Young.** (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* **20**:317-332.
- Meylan, E., J. Tschopp, und M. Karin.** (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**:39-44.
- Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, und A. Aderem.** (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**:569-575.
- Miao, E. A., R. K. Ernst, M. Dors, D. P. Mao, und A. Aderem.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:2562-2567.
- Miceli-Richard, C., S. Lesage, M. Rybojad, A. M. Prieur, S. Manouvrier-Hanu, R. Hafner, M. Chamailard, H. Zouali, G. Thomas, und J. P. Hugot.** (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat. Genet.* **29**:19-20.
- Miller, S. I., R. K. Ernst, und M. W. Bader.** (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:36-46.
- Mills, S. D. und B. B. Finlay.** (1994). Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb. Pathog.* **17**:409-423.
- Miold, S., K. Ehrbar, A. Weissmuller, R. Prager, H. Tschape, H. Russmann, und W. D. Hardt.** (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5, and sopE2. *J. Bacteriol.* **183**:2348-2358.

- Mitchell, E. K., P. Mastroeni, A. P. Kelly, und J. Trowsdale.** (2004). Inhibition of cell surface MHC class II expression by Salmonella. *Eur. J. Immunol.* **34**:2559-2567.
- Mitchell, J. A., M. J. Paul-Clark, G. W. Clarke, S. K. McMaster, und N. Cartwright.** (2007). Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J. Endocrinol.* **193**:323-330.
- Mittrucker, H. W. und S. H. Kaufmann.** (2000). Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**:457-463.
- Mittrucker, H. W., A. Kohler, und S. H. Kaufmann.** (2002). Characterization of the murine T-lymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* **70**:199-203.
- Modak, M. J., S. Nair, und A. Venkataraman.** (1967). Biochemistry of the Salmonella. I. Metabolism of phenylalanine and leucine by *S. typhi*, *S. paratyphi A* and *S. paratyphi B*. *Indian J. Pathol. Bacteriol.* **10**:312-317.
- Modrzakowski, M. C. und J. K. Spitznagel.** (1979). Bactericidal activity of fractionated granule contents from human polymorphonuclear leukocytes: antagonism of granule cationic proteins by lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **25**:597-602.
- Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, und S. Falkow.** (1996). Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:9833-9838.
- Montagne, A., P. Menanteau, R. Boivin, S. Bernard, F. Lantier, und A. C. Lalmanach.** (2001). Cytokine gene expression in lymph node and spleen of sheep in response to Salmonella infection by two serotypes displaying different host specificity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **82**:257-272.
- Montenegro, M. A., G. Morelli, und R. Helmuth.** (1991). Heteroduplex analysis of Salmonella virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb. Pathog.* **11**:391-397.
- Moore, K. J., L. P. Andersson, R. R. Ingalls, B. G. Monks, R. Li, M. A. Arnaout, D. T. Golenbock, und M. W. Freeman.** (2000). Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J. Immunol.* **165**:4272-4280.
- Mossel, D. A. und C. B. Struijk.** (1993). Workshop on risk assessment of human exposure to pathogenic micro-organisms. National Institute of Public Health & Environmental Protection. Bilthoven, The Netherlands. *Int. J. Food Microbiol.* **18**:239-244.
- Mosser, D. M.** (1994). Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. *Immunol. Ser.* **60**:99-114.
- Mota, L. J., A. E. Ramsden, M. Liu, J. D. Castle, und D. W. Holden.** (2009). SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell Microbiol.* **11**:1236-1253.
- Moue, M., M. Tohno, T. Shimazu, T. Kido, H. Aso, T. Saito, und H. Kitazawa.** (2008). Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**:134-144.
- Moxley, R. A. und G. E. Duhamel.** (1999). Comparative pathology of bacterial enteric diseases of swine. *Adv. Exp. Med. Biol.* **473**:83-101.
- Mroczenski-Wildey, M. J., J. L. Di Fabio, und F. C. Cabello.** (1989). Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by Salmonella typhi: the role of lipopolysaccharide. *Microb. Pathog.* **6**:143-152.
- Mukherjee, S., G. Keitany, Y. Li, Y. Wang, H. L. Ball, E. J. Goldsmith, und K. Orth.** (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* **312**:1211-1214.
- Murray, P. J.** (2005). NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr. Opin. Immunol.* **17**:352-358.
- Musa, M. und D. Rowley.** (1990). The *in vitro* Bactericidal Activity of Normal and Activated Mouse Macrophages against *Salmonella typhimurium* C5sr. *Pertanika* **13**:45-52.
- Nadler, C., K. Baruch, S. Kobi, E. Mills, G. Haviv, M. Farago, I. Alkalay, S. Bartfeld, T. F. Meyer, Y. Ben Neriah, und I. Rosenshine.** (2010). The type III secretion effector NleE inhibits NF-kappaB activation. *PLoS. Pathog.* **6**(1):e1000743.

- Nair, S., M. J. Modak, und A. Venkataraman.** (1967). Biochemistry of the Salmonella. II. Metabolism of purine bases--adenine-8-C14 and guanine-8-C14 by Salmonella typhi, S. paratyphi A and S. paratyphi B under stationary condition of growth. *Indian J. Pathol. Bacteriol.* **10**:318-323.
- Nair, S., M. J. Modak, und A. Venkataraman.** (1968). Biochemistry of the salmonella. 3. Metabolism of glucose-U-C-14 by S. typhi, S. paratyphi A and S. paratyphi B under stationary condition of growth. *Indian J. Pathol. Bacteriol.* **11**:19-23.
- Nair, S., S. Alokam, S. Kothapalli, S. Porwollik, E. Proctor, C. Choy, M. McClelland, S. L. Liu, und K. E. Sanderson.** (2004). Salmonella enterica serovar Typhi strains from which SPI7, a 134-kilobase island with genes for Vi exopolysaccharide and other functions, has been deleted. *J. Bacteriol.* **186**:3214-3223.
- Nalubamba, K. S., A. G. Gossner, R. G. Dalziel, und J. Hopkins.** (2007). Differential expression of pattern recognition receptors in sheep tissues and leukocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **118**:252-262.
- National Library of Medicine (NLM).** (2009). BLAST-Algorithmus. National Library of Medicine. [Online.] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Zugriff 17 August 2010.
- Nauciel, C. und F. Espinasse-Maes.** (1992). Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect. Immun.* **60**:450-454.
- NCBI.** (2009). Datenbank der National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine (NLM). [Online.] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Zugriff 17 August 2010.
- Neal, M. D., C. Leaphart, R. Levy, J. Prince, T. R. Billiar, S. Watkins, J. Li, S. Cetin, H. Ford, A. Schreiber, und D. J. Hackam.** (2006). Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J. Immunol.* **176**:3070-3079.
- Negroni, A., L. Stronati, M. Pierdomenico, D. Tirindelli, G. Di Nardo, V. Mancini, G. Maiella, und S. Cucchiara.** (2009). Activation of NOD2-mediated intestinal pathway in a pediatric population with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **15**:1145-1154.
- Neish, A. S., A. T. Gewirtz, H. Zeng, A. N. Young, M. E. Hobert, V. Karmali, A. S. Rao, und J. L. Madara.** (2000). Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* **289**:1560-1563.
- Nembrini, C., J. Kisielow, A. T. Shamshiev, L. Tortola, A. J. Coyle, M. Kopf, und B. J. Marsland.** (2009). The kinase activity of Rip2 determines its stability and consequently Nod1- and Nod2-mediated immune responses. *J. Biol. Chem.* **284**:19183-19188.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, D. J. de Jong, T. Jansen, L. Jacobs, M. Kramer, T. H. Naber, J. P. Drenth, S. E. Girardin, B. J. Kullberg, G. J. Adema, und J. W. van der Meer.** (2005). Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J. Immunol.* **174**:6518-6523.
- Netea, M. G., T. Azam, G. Ferwerda, S. E. Girardin, S. H. Kim, und C. A. Dinarello.** (2006). Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors. *J. Leukoc. Biol.* **80**:1454-1461.
- Newman, R. M., P. Salunkhe, A. Godzik, und J. C. Reed.** (2006). Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect. Immun.* **74**:594-601.
- Newton, H. J., J. S. Pearson, L. Badea, M. Kelly, M. Lucas, G. Holloway, K. M. Wagstaff, M. A. Dunstone, J. Sloan, J. C. Whisstock, J. B. Kaper, R. M. Robins-Browne, D. A. Jans, G. Frankel, A. D. Phillips, B. S. Coulson, und E. L. Hartland.** (2010). The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic E. coli and OspZ from Shigella block nuclear translocation of NF-kappaB p65. *PLoS. Pathog.* **6**(5):e1000898.
- Nguyen, T. D., H. Rabe, H. Terlau, und G. Jeserich.** (2000). Isolation and heterologous expression of two genomic clones encoding Shaker-related potassium channels of trout CNS. *J. Neurosci. Res.* **60**:174-183.
- Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, D. Lindenbergh, R. Willemsen, A. Kaser, Y. Simons-Oosterhuis, S. Brugman, K. Yamaguchi, H. Ishikawa, Y. Aiba, Y. Koga, J. N. Samsom, K. Oshima, M. Kikuchi, J. C. Escher, M. Hattori, A. B. Onderdonk, und R. S. Blumberg.** (2009).

- Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. *J. Clin. Invest* **119**:1241-1250.
- Nigro, G., L. L. Fazio, M. C. Martino, G. Rossi, I. Tattoli, V. Liparoti, C. De Castro, A. Molinaro, D. J. Philpott, and M. L. Bernardini.** (2008). Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol.* **10**:682-695.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B. F. Holt, III, and J. L. Dangl.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annu. Rev. Genet.* **37**:579-609.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto.** (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**:252-256.
- Norris, F. A., M. P. Wilson, T. S. Wallis, E. E. Galyov, and P. W. Majerus.** (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:14057-14059.
- Norris, T. L. und A. J. Baumler.** (1999). Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:13393-13398.
- Nossol, C., A. K. Diesing, N. Walk, H. Faber-Zuschratter, R. Hartig, A. Post, J. Kluess, H. J. Rothkotter, und S. Kahlert.** (2011). Air-liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC). *Histochem. Cell Biol.*
- O'Neill, L. A. und A. G. Bowie.** (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:353-364.
- Ochman, H. und E. A. Groisman.** (1996). Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **64**:5410-5412.
- Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nunez, und J. H. Cho.** (2001). (a) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-606.
- Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, und G. Nunez.** (2001). (b) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **276**:4812-4818.
- Ogura, Y., S. Lala, W. Xin, E. Smith, T. A. Dowds, F. F. Chen, E. Zimmermann, M. Tretiakova, J. H. Cho, J. Hart, J. K. Greenson, S. Keshav, und G. Nunez.** (2003). (a) Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* **52**:1591-1597.
- Ogura, Y., L. Saab, F. F. Chen, A. Benito, N. Inohara, und G. Nunez.** (2003). (b) Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. *Genomics* **81**:369-377.
- Okamura, M., H. S. Lillehoj, R. B. Raybourne, U. S. Babu, R. A. Heckert, H. Tani, K. Sasai, E. Baba, und E. P. Lillehoj.** (2005). Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **107**:327-335.
- Oliveira, C. J., L. F. Carvalho, und T. B. Garcia.** (2006). Experimental airborne transmission of *Salmonella Agona* and *Salmonella Typhimurium* in weaned pigs. *Epidemiol. Infect.* **134**:199-209.
- Olsen, G. J., H. Matsuda, R. Hagstrom, und R. Overbeek.** (1994). fastDNAmL: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* **10**:41-48.
- Opitz, B., S. Forster, A. C. Hocke, M. Maass, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp, und M. Krull.** (2005). Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomphila pneumoniae*. *Circ. Res.* **96**:319-326.
- Opitz, B., S. Hippenstiel, J. Eitel, und N. Suttorp.** (2007). Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **98**:319-326.
- Ouellette, A. J. und M. E. Selsted.** (1996). Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* **10**:1280-1289.

- Oyston, P. C., N. Dorrell, K. Williams, S. R. Li, M. Green, R. W. Titball, und B. W. Wren.** (2000). The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **68**:3419-3425.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, und A. Aderem.** (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:13766-13771.
- Pabst, R.** (1987). The anatomical basis for the immune function of the gut. *Anat. Embryol. (Berl)* **176**:135-144.
- Pahl, H. L.** (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6853-6866.
- Palazzo, M., S. Gariboldi, L. Zanobbio, G. F. Dusio, S. Selleri, M. Bedoni, A. Balsari, und C. Rumio.** (2008). Cross-talk among Toll-like receptors and their ligands. *Int. Immunol.* **20**:709-718.
- Pande, V. und M. J. Ramos.** (2005). NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **12**:357-374.
- Pang, T., Z. A. Bhutta, B. B. Finlay, und M. Altwegg.** (1995). Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* **3**:253-255.
- Pardon, P., M. Y. Popoff, C. Coynault, J. Marly, und I. Miras.** (1986). Virulence-associated plasmids of *Salmonella* serotype Typhimurium in experimental murine infection. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137B**:47-60.
- Parker, C. T., E. Liebana, D. J. Henzler, und J. Guard-Petter.** (2001). Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Typhimurium. *Environ. Microbiol.* **3**:332-342.
- Pascopella, L., B. Raupach, N. Ghori, D. Monack, S. Falkow, und P. L. Small.** (1995). Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect. Immun.* **63**:4329-4335.
- Pauleau, A. L. und P. J. Murray.** (2003). Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol. Cell Biol.* **23**:7531-7539.
- Paulin, S. M., A. Jagannathan, J. Campbell, T. S. Wallis, und M. P. Stevens.** (2007). Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. *Infect. Immun.* **75**:3950-3960.
- Pearson, A. M.** (1996). Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:20-28.
- Pedersen, G., L. Andresen, M. W. Matthiessen, J. Rask-Madsen, und J. Brynkskov.** (2005). Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin. Exp. Immunol.* **141**:298-306.
- Pegues, D. A., M. E. Ohi, und S. I. Miller.** (2004). *Salmonella* Species Including *Salmonella Typhi* chapter 220, p. 2636-2654. *In* G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin (ed.), *Principles and Practice of Infectious Diseases: 2. Volume*. Churchill Livingstone, Philadelphia. ISBN 0443066434.
- Perera, L., L. Shao, A. Patel, K. Evans, B. Meresse, R. Blumberg, D. Geraghty, V. Groh, T. Spies, B. Jabri, und L. Mayer.** (2007). Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm. Bowel. Dis.* **13**:298-307.
- Perkins, N. D. und T. D. Gilmore.** (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death. Differ.* **13**:759-772.
- Perrin, A. J., X. Jiang, C. L. Birmingham, N. S. So, und J. H. Brumell.** (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of Mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr. Biol.* **14**:806-811.
- Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, und J. Tschopp.** (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death. Differ.* **14**:1583-1589.
- Peyrin-Biroulet, L., C. Vignal, R. Dessein, M. Simonet, P. Desreumaux, und M. Chamillard.** (2006). NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation. *Trends Microbiol.* **14**:432-438.

- Philpott, D. J. und S. E. Girardin.** (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.* **41**:1099-1108.
- Phylip-Programm.** (2008). FastDNAMl 1. 2. 2. [Online.] <http://mobyale.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=fastdnaml>. Zugriff 17 August 2010.
- PhyloDendron.** (2008). Phylogenetic tree printer. Gilbert, DG. [Online.] <http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>. Zugriff 17 August 2010.
- Podolsky, D. K.** (2003). The future of IBD treatment. *J. Gastroenterol.* **38 Suppl 15**:63-66.
- Poli, V.** (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.* **273**:29279-29282.
- Popoff, M. Y., I. Miras, C. Coynault, C. Lasselin, und P. Pardon.** (1984). Molecular relationships between virulence plasmids of *Salmonella* serotypes typhimurium and dublin and large plasmids of other *Salmonella* serotypes. *Ann. Microbiol. (Paris)* **135A**:389-398.
- Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, und A. McWhorter-Murlin.** (1992). Supplement 1991 (no. 35) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* **143**:807-811.
- Porwollik, S. und M. McClelland.** (2003). Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes. Infect.* **5**:977-989.
- Pradipta, A. R., Y. Fujimoto, M. Hasegawa, N. Inohara, und K. Fukase.** (2010). Characterization of natural human nucleotide-binding oligomerization domain protein 1 (Nod1) ligands from bacterial culture supernatant for elucidation of immune modulators in the environment. *J. Biol. Chem.* **285**:23607-23613.
- PSI-BLAST-Programm.** (2008). National Library of Medicine (NLM). [Online.] www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome. Zugriff 17 August 2010.
- PSIPred-Programm.** (2008). University College London. [Online.] <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>. Zugriff 17 August 2010.
- Rabsch, W., H. Tschape, und A. J. Baumler.** (2001). Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes. Infect.* **3**:237-247.
- Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, L. G. Adams, und A. J. Baumler.** (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* **70**:2249-2255.
- Rahman, H.** (2006). Prevalence & phenotypic expression of *sopB* gene among clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Indian J. Med. Res.* **123**:83-88.
- Rajashekar, R., D. Liebl, A. Seitz, und M. Hensel.** (2008). Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of *Salmonella*-induced filaments by intracellular *Salmonella enterica*. *Traffic.* **9**:2100-2116.
- Ramsden, A. E., D. W. Holden, und L. J. Mota.** (2007). Membrane dynamics and spatial distribution of *Salmonella*-containing vacuoles. *Trends Microbiol.* **15**:516-524.
- Raschke, W. C., S. Baird, P. Ralph, und I. Nakoinz.** (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**:261-267.
- Reed, K. A., M. E. Hobert, C. E. Kolenda, K. A. Sands, M. Rathman, M. O'Connor, S. Lyons, A. T. Gewirtz, P. J. Sansonetti, und J. L. Madara.** (2002). The *Salmonella typhimurium* flagellar basal body protein FliE is required for flagellin production and to induce a proinflammatory response in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**:13346-13353.
- Reed, W. M., H. J. Olander, und H. L. Thacker.** (1986). Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* infection in weanling pigs. *Am. J. Vet. Res.* **47**:75-83.
- Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, und J. J. Farmer, III.** (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* **27**:313-320.
- Ren, T., D. S. Zamboni, C. R. Roy, W. F. Dietrich, und R. E. Vance.** (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS. Pathog.* **2(3)**:e18.

- Retamal, P., M. Castillo-Ruiz, und G. C. Mora.** (2009). Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *PLoS. One.* **4(5)**:e5551.
- Retamal, P., M. Castillo-Ruiz, N. A. Villagra, J. Morgado, und G. C. Mora.** (2010). Modified intracellular-associated phenotypes in a recombinant *Salmonella* Typhi expressing *S. Typhimurium* SPI-3 sequences. *PLoS. One.* **5(2)**:e9394.
- Richter-Dahlfors, A., A. M. Buchan, und B. B. Finlay.** (1997). Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J. Exp. Med.* **186**:569-580.
- Riedemann, N. C., R. F. Guo, V. J. Sarma, I. J. Laudes, M. Huber-Lang, R. L. Warner, E. A. Albrecht, C. L. Speyer, und P. A. Ward.** (2002). Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J. Immunol.* **168**:1919-1925.
- Roark, E. A. und K. Haldar.** (2008). Effects of lysosomal membrane protein depletion on the *Salmonella*-containing vacuole. *PLoS. One.* **3(10)**:e3538.
- Robert Koch-Institut (RKI).** (2008). Epidemiologisches Bulletin 04/2008, *In* Epidemiologisches Bulletin (ed.). MB Medienhaus GmbH, Berlin. ISSN 1430-0265.
- Robert Koch-Institut (RKI).** (2009). Epidemiologisches Bulletin 13/2009, *In* Epidemiologisches Bulletin (ed.). MB Medienhaus GmbH, Berlin. ISSN 1430-0265.
- Robert Koch-Institut (RKI).** (2010). Epidemiologisches Bulletin 03/2010, *In* Epidemiologisches Bulletin (ed.). Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft Potsdam mbH, Potsdam. ISSN 1430-0265.
- Robert Koch-Institut (RKI).** (2011). Epidemiologisches Bulletin 03/2011, *In* Epidemiologisches Bulletin (ed.). Brandenburgische Universitätsdruckerei und Verlagsgesellschaft Potsdam mbH, Potsdam. ISSN 1430-0265.
- Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein, und J. F. Bazan.** (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:588-593.
- Rodriguez, N. E., H. K. Chang, und M. E. Wilson.** (2004). Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.* **72**:2111-2122.
- Rolli, J., N. Loukili, S. Levrard, N. Rosenblatt-Velin, S. Rignault-Clerc, B. Waeber, F. Feihl, P. Pacher, und L. Liaudet.** (2010). Bacterial flagellin elicits widespread innate immune defense mechanisms, apoptotic signaling, and a sepsis-like systemic inflammatory response in mice. *Crit Care* **14**:R160.
- Romagnani, S.** (1992). Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol. Today* **13**:379-381.
- Roof, M. B., J. Roth, und T. T. Kramer.** (1992). Porcine salmonellosis: characterization, immunity, and potential vaccines. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **14**:411-423.
- Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Brautigam, T. Kuhbacher, G. H. Waetzig, D. Seegert, und S. Schreiber.** (2003). TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**:1001-1009.
- Rosenstiel, P., C. Sina, C. End, M. Renner, S. Lyer, A. Till, S. Hellmig, S. Nikolaus, U. R. Folsch, B. Helmke, F. Autschbach, P. Schirmacher, P. Kioschis, M. Hafner, A. Poustka, J. Mollenhauer, und S. Schreiber.** (2007). Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J. Immunol.* **178**:8203-8211.
- Rothkotter, H. J.** (2009). Anatomical particularities of the porcine immune system-a physician's view. *Dev. Comp Immunol.* **33**:267-272.
- Ruckdeschel, K., S. Harb, A. Roggenkamp, M. Hornef, R. Zumbihl, S. Kohler, J. Heesemann, und B. Rouot.** (1998). *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kappaB: involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor necrosis factor alpha production. *J. Exp. Med.* **187**:1069-1079.
- Rytkonen, A., J. Poh, J. Garmendia, C. Boyle, A. Thompson, M. Liu, P. Freemont, J. C. Hinton, und D. W. Holden.** (2007). SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:3502-3507.

- Saarinen, M., L. J. Pelliniemi, und K. Granfors.** (1996). Survival and degradation of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in intestinal epithelial cells in vitro. *J. Med. Microbiol.* **45**:463-471.
- Saccani, S., S. Pantano, und G. Natoli.** (2003). Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. *Mol. Cell* **11**:1563-1574.
- Saitou, N. und M. Nei.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- Salcedo, S. P., M. Noursadeghi, J. Cohen, und D. W. Holden.** (2001). Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. *Cell Microbiol.* **3**:587-597.
- Salzman, N. H., M. M. Chou, H. de Jong, L. Liu, E. M. Porter, und Y. Paterson.** (2003). Enteric salmonella infection inhibits Paneth cell antimicrobial peptide expression. *Infect. Immun.* **71**:1109-1115.
- Sambrook, J. und D. W. Russel.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory press. 3. Auflage, New York. ISBN 0879695773.
- Sanchez, E., I. Nadal, E. Donat, C. Ribes-Koninckx, M. Calabuig, und Y. Sanz.** (2008). Reduced diversity and increased virulence-gene carriage in intestinal enterobacteria of coeliac children. *BMC. Gastroenterol.* **8**:50.
- Sander, J.** (1993). [Pathogenesis of salmonella infections in humans]. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **100**:283-285.
- Sandvang, D., L. B. Jensen, D. L. Baggesen, und S. B. Baloda.** (2000). Persistence of a *Salmonella enterica* serotype typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *FEMS Microbiol. Lett.* **187**:21-25.
- Sang, Y., B. Ramanathan, C. R. Ross, und F. Blecha.** (2005). Gene silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in beta-defensin-1 expression. *Infect. Immun.* **73**:7133-7141.
- Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsois, R. A. Kingsley, L. G. Adams, und A. J. Baumler.** (2001). Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes. Infect.* **3**:1335-1344.
- Saroj, S. D., R. Shashidhar, M. Karani, und J. R. Bandekar.** (2008). Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. *J. Med. Microbiol.* **57**:424-427.
- Scharek, L. und K. Tedin.** (2007). The porcine immune system-differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by *Salmonella* serovars. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **120**:347-354.
- Scherer, K., I. Szabo, U. Rosler, B. Appel, A. Hensel, und K. Nockler.** (2008). Time course of infection with *Salmonella typhimurium* and its influence on fecal shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs. *J. Food Prot.* **71**:699-705.
- Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin, und L. H. Wieler.** (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem. Cell Biol.* **125**:293-305.
- Schierack, P., S. Kleta, K. Tedin, J. T. Babila, S. Oswald, T. A. Oelschlaeger, R. Hiemann, S. Paetzold, und L. H. Wieler.** (2011). *E. coli* Nissle 1917 Affects *Salmonella* adhesion to porcine intestinal epithelial cells. *PLoS. One.* **6**(2):e14712.
- Schleifer, K. H. und O. Kandler.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**:407-477.
- Schlumberger, M. C., A. J. Muller, K. Ehrbar, B. Winnen, I. Duss, B. Stecher, und W. D. Hardt.** (2005). Real-time imaging of type III secretion: *Salmonella* SipA injection into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:12548-12553.
- Schlumberger, M. C. und W. D. Hardt.** (2006). *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:46-54.

- Schmidt, L. D., L. J. Kohrt, und D. R. Brown.** (2008). Comparison of growth phase on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) and mucosal explants from porcine small intestine. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:63-69.
- Schroder, J. M. und J. Harder.** (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **63**:469-486.
- Schroeder, N., T. Henry, C. C. de, W. Zhao, A. A. Guilhon, J. P. Gorvel, und S. Meresse.** (2010). The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog.* **6**(7):e1001002.
- Schroeder, N., L. J. Mota, und S. Meresse.** (2011). *Salmonella*-induced tubular networks. *Trends Microbiol.* **19**:268-277.
- Schwalbe, R. A., B. Dahlback, J. E. Coe, und G. L. Nelsestuen.** (1992). Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* **31**:4907-4915.
- Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, und C. J. Kirschning.** (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* **274**:17406-17409.
- Selander, R. K., P. Beltran, N. H. Smith, R. Helmuth, F. A. Rubin, D. J. Kopecko, K. Ferris, B. D. Tall, A. Cravioto, und J. M. Musser.** (1990). Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
- Selander, R. K., N. H. Smith, J. Li, P. Beltran, K. E. Ferris, D. J. Kopecko, und F. A. Rubin.** (1992). Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella dublin*. *J. Bacteriol.* **174**:3587-3592.
- Selbitz, H.-J.** (1992). *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie*. Fischer Verlag, Jena. ISBN 978-3334603512.
- Selbitz, H.-J., H.-J. Sinell, und A. Sziegoleit.** (1995). *Das Salmonellen-Problem: Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen*. Fischer Verlag, Jena. ISBN 3-334-60909-X.
- Sha, Z., J. W. Abernathy, S. Wang, P. Li, H. Kucuktas, H. Liu, E. Peatman, und Z. Liu.** (2009). NOD-like subfamily of the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family receptors and their expression in channel catfish. *Dev. Comp Immunol.* **33**:991-999.
- Shaughnessy, L. M. und J. A. Swanson.** (2007). The role of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front Biosci.* **12**:2683-2692.
- Shaw, M. H., T. Reimer, C. Sanchez-Valdepenas, N. Warner, Y. G. Kim, M. Fresno, und G. Nunez.** (2009). T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat. Immunol.* **10**:1267-1274.
- Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, und D. W. Holden.** (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:2593-2597.
- Shea, J. E., C. R. Beuzon, C. Gleeson, R. Mundy, und D. W. Holden.** (1999). Influence of the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect. Immun.* **67**:213-219.
- Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, und D. R. Lovley.** (2004). Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:2959-2965.
- Shi, Z., Z. Cai, S. Wen, C. Chen, C. Gendron, A. Sanchez, K. Patterson, S. Fu, J. Yang, D. Wildman, R. H. Finnell, und D. Zhang.** (2009). Transcriptional regulation of the novel Toll-like receptor Tlr13. *J. Biol. Chem.* **284**:20540-20547.
- Shigeoka, A. A., A. Kambo, J. C. Mathison, A. J. King, W. F. Hall, C. J. da Silva, R. J. Ulevitch, und D. B. McKay.** (2010). Nod1 and nod2 are expressed in human and murine renal tubular epithelial cells and participate in renal ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* **184**:2297-2304.
- Shimada, K., S. Chen, P. W. Dempsey, R. Sorrentino, R. Alsabeh, A. V. Slepchenkin, E. Peterson, T. M. Doherty, D. Underhill, T. R. Crother, und M. Arditi.** (2009). The NOD/RIP2 pathway is

essential for host defenses against *Chlamydomydia pneumoniae* lung infection. *PLoS. Pathog.* **5(4)**:e1000379.

Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, und M. Kimoto. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**:1777-1782.

Shimosato, T., M. Tohno, H. Kitazawa, S. Katoh, K. Watanabe, Y. Kawai, H. Aso, T. Yamaguchi, und T. Saito. (2005). Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol. Lett.* **98**:83-89.

Silver, N. C. und W. P. Dunlap. (2011). Averaging correlation coefficients: Should Fisher's z transformation be used? *Journal of Applied Psychology* **72**:146-148.

Sioud, M. und Y. Floisand. (2009). NOD2/CARD15 on bone marrow CD34+ hematopoietic cells mediates induction of cytokines and cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **85**:939-946.

Sirard, J. C., C. Vignal, R. Dessein, und M. Chamillard. (2007). Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. *PLoS. Pathog.* **3(12)**:e152.

SMART. (2008). Simple Modular Architecture Research Tool. EMBL-Heidelberg. [Online.] <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Zugriff 17 August 2010.

Smith, H. W. und S. Halls. (1968). The simultaneous oral administration of *Salmonella dublin*, *S. typhimurium* and *S. choleraesuis* to calves and other animals. *J. Med. Microbiol.* **1**:203-209.

Smyth, D. J., J. D. Cooper, R. Bailey, S. Field, O. Burren, L. J. Smink, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, B. Widmer, D. B. Dunger, D. A. Savage, N. M. Walker, D. G. Clayton, und J. A. Todd. (2006). A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat. Genet.* **38**:617-619.

Stanley, J. und N. Baquar. (1994). Phylogenetics of *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* **21**:79-87.

Starnbach, M. N. und M. J. Bevan. (1994). Cells infected with *Yersinia* present an epitope to class I MHC-restricted CTL. *J. Immunol.* **153**:1603-1612.

Stebbins, C. E. und J. E. Galan. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol. Cell* **6**:1449-1460.

Steele-Mortimer, O., J. H. Brumell, L. A. Knodler, S. Meresse, A. Lopez, und B. B. Finlay. (2002). The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol.* **4**:43-54.

Stehlik, C., H. Hayashi, F. Pio, A. Godzik, und J. C. Reed. (2003). CARD6 is a modulator of NF-kappa B activation by Nod1- and Cardiak-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* **278**:31941-31949.

Stein, C., M. Caccamo, G. Laird, und M. Leptin. (2007). Conservation and divergence of gene families encoding components of innate immune response systems in zebrafish. *Genome Biol.* **8(11)**:R251.

Steinbach, G. und M. Hartung. (1999). [Attempt to estimate the share of human *Salmonella* infections, which are attributable to *Salmonella* originating from swine]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **112**:296-300.

Stender, S., A. Friebel, S. Linder, M. Rohde, S. Miold, und W. D. Hardt. (2000). Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol. Microbiol.* **36**:1206-1221.

Streckel, W., A. C. Wolff, R. Prager, E. Tietze, und H. Tschape. (2004). Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**:496-503.

Strober, W., P. J. Murray, A. Kitani, und T. Watanabe. (2006). Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:9-20.

Sun, Y. H., H. G. Rolan, und R. M. Tsolis. (2007). Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **282**:33897-33901.

- Sutherland, A., J. Davies, C. J. Owen, S. Vaikkakara, C. Walker, T. D. Cheetham, R. A. James, P. Perros, P. T. Donaldson, H. J. Cordell, R. Quinton, und S. H. Pearce.** (2007). Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**:3338-3341.
- Sutterwala, F. S. und R. A. Flavell.** (2009). NLR4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin. Immunol.* **130**:2-6.
- Suzuki, T., L. Franchi, C. Toma, H. Ashida, M. Ogawa, Y. Yoshikawa, H. Mimuro, N. Inohara, C. Sasakawa, und G. Nunez.** (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS. Pathog.* **3**(8):e111.
- Suzuki, T. und G. Nunez.** (2008). A role for Nod-like receptors in autophagy induced by Shigella infection. *Autophagy.* **4**:73-75.
- Swaan, P. W., T. Bensman, P. M. Bahadduri, M. W. Hall, A. Sarkar, S. Bao, C. M. Khantwal, S. Ekins, und D. L. Knoell.** (2008). Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**:536-542.
- Swaminathan, C. P., P. H. Brown, A. Roychowdhury, Q. Wang, R. Guan, N. Silverman, W. E. Goldman, G. J. Boons, und R. A. Mariuzza.** (2006). Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:684-689.
- Swerdlow, M. P., D. R. Kennedy, J. S. Kennedy, R. J. Washabau, P. S. Henthorn, P. F. Moore, S. R. Carding, und P. J. Felsburg.** (2006). Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **114**:313-319.
- Szabó, I.** (2008). Dissertation: Einfluss von Enterococcus faecium als Probiotikum auf Salmonella Typhimurium DT104 am Infektionsmodell Schwein. Bundesinstitut für Risikobewertung und Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin. ISBN 978-3-86664-577-6.
- Tagesson, C. und O. Stendahl.** (1973). Influence of the cell surface lipopolysaccharide structure of Salmonella typhimurium on resistance to intracellular bactericidal systems. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* **81**:473-480.
- Tahara, E., H. Kadara, L. Lacroix, D. Lotan, und R. Lotan.** (2009). Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction. *Cancer Biol. Ther.* **8**:801-807.
- Takada, H. und A. Uehara.** (2006). Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling. *Curr. Pharm. Des* **12**:4163-4172.
- Takahashi, Y., K. Isuzugawa, Y. Murase, M. Imai, S. Yamamoto, M. Iizuka, S. Akira, G. M. Bahr, E. Momotani, M. Hori, H. Ozaki, und K. Imakawa.** (2006). Up-regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF-alpha in LPS-treated murine macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* **68**:471-478.
- Takeda, K., T. Kaisho, und S. Akira.** (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:335-376.
- Takeuchi, A.** (1967). Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am. J. Pathol.* **50**:109-136.
- Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, und S. Akira.** (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol.* **13**:933-940.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, und S. Kumar.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599.
- Tang, J., M. Hu, S. Lee, und R. Roblin.** (2000). A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. *J. Microbiol. Methods* **39**:121-126.
- Tang, L., X. D. Zhou, Q. Wang, L. Zhang, Y. Wang, X. Y. Li, und D. M. Huang.** (2011). Expression of TRAF6 and pro-inflammatory cytokines through activation of TLR2, TLR4, NOD1, and NOD2 in human periodontal ligament fibroblasts. *Arch. Oral Biol.*, in press.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka, und N. Tanaka.** (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:623-655.
- Tattoli, I., L. A. Carneiro, M. Jehanno, J. G. Magalhaes, Y. Shu, D. J. Philpott, D. Arnoult, und S. E. Girardin.** (2008). NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep.* **9**:293-300.

- Thomas, G. W.** (1978). *Salmonella paratyphi B* in cattle. *Vet. Rec.* **103(23)**:512.
- Thompson, C. B.** (1995). New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity*. **3**:531-539.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, und T. J. Gibson.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tian, X., G. Pascal, und P. Monget.** (2009). Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC. Evol. Biol.* **9**:202.
- Tindall, B. J., P. A. Grimont, G. M. Garrity, und J. P. Euzeby.** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:521-524.
- Ting, J. P. und B. K. Davis.** (2005). CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **23**:387-414.
- Ting, J. P., D. L. Kastner, und H. M. Hoffman.** (2006). CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:183-195.
- Ting, J. P., R. C. Lovering, E. S. Alnemri, J. Bertin, J. M. Boss, B. K. Davis, R. A. Flavell, S. E. Girardin, A. Godzik, J. A. Harton, H. M. Hoffman, J. P. Hugot, N. Inohara, A. Mackenzie, L. J. Maltais, G. Nunez, Y. Ogura, L. A. Otten, D. Philpott, J. C. Reed, W. Reith, S. Schreiber, V. Steimle, und P. A. Ward.** (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. **28**:285-287.
- Tohno, M., T. Shimosato, H. Kitazawa, S. Katoh, I. D. Iliev, T. Kimura, Y. Kawai, K. Watanabe, H. Aso, T. Yamaguchi, und T. Saito.** (2005). Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**:547-554.
- Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, Y. Kawai, T. Saito, und H. Kitazawa.** (2007). Molecular cloning and functional characterization of porcine MyD88 essential for TLR signaling. *Cell Mol. Immunol.* **4**:369-376.
- Tohno, M., W. Ueda, Y. Azuma, T. Shimazu, S. Katoh, J. M. Wang, H. Aso, H. Takada, Y. Kawai, T. Saito, und H. Kitazawa.** (2008). (a) Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2). *Mol. Immunol.* **45**:194-203.
- Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, A. Uehara, H. Takada, A. Kawasaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Saito, und H. Kitazawa.** (2008). (b) Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine. *Mol. Immunol.* **45**:1807-1817.
- Toma, C., N. Higa, Y. Koizumi, N. Nakasone, Y. Ogura, A. J. McCoy, L. Franchi, S. Uematsu, J. Sagara, S. Taniguchi, H. Tsutsui, S. Akira, J. Tschoop, G. Nunez, und T. Suzuki.** (2010). Pathogenic *Vibrio* activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J. Immunol.* **184**:5287-5297.
- Tomita, M., R. Ohkubo, und M. Hayashi.** (2004). Lipopolysaccharide transport system across colonic epithelial cells in normal and infective rat. *Drug Metab Pharmacokinet.* **19**:33-40.
- Travassos, L. H., S. E. Girardin, D. J. Philpott, D. Blanot, M. A. Nahori, C. Werts, und I. G. Boneca.** (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5**:1000-1006.
- Tschoop, J., F. Martinon, und K. Burns.** (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:95-104.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, und F. Heffron.** (1995). Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infect. Immun.* **63**:1739-1744.
- Tsolis, R. M., L. G. Adams, T. A. Ficht, und A. J. Baumler.** (1999). Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* **67**:4879-4885.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, und K. Tada.** (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**:171-176.

- Uehara, A., Y. Sugawara, S. Kurata, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Satta, T. Sasano, S. Sugawara, und H. Takada.** (2005). Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol.* **7**:675-686.
- Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, und H. Takada.** (2007). Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* **44**:3100-3111.
- Uenishi, H. und H. Shinkai.** (2009). Porcine Toll-like receptors: the front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Dev. Comp Immunol.* **33**:353-361.
- Unajak, S., M. D. Santos, J. Hikima, T. S. Jung, H. Kondo, I. Hirono, und T. Aoki.** (2011). Molecular characterization, expression and functional analysis of a nuclear oligomerization domain proteins subfamily C (NLRC) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish. Shellfish. Immunol.* **31**:202-211.
- Uthe, J. J., A. Royae, J. K. Lunney, T. J. Stabel, S. H. Zhao, C. K. Tuggle, und S. M. Bearson.** (2007). Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol. Immunol.* **44**:2900-2914.
- Uzzau, S., M. Hovi, und B. A. Stocker.** (1999). Application of ribotyping and IS200 fingerprinting to distinguish the five *Salmonella* serotype O6,7:c:1,5 groups: Choleraesuis sensu stricto, Choleraesuis var. Kunzendorf, Choleraesuis var. Decatur, Paratyphi C, and Typhisuis. *Epidemiol. Infect.* **123**:37-46.
- Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, D. J. Platt, und J. E. Olsen.** (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* **125**:229-255.
- Uzzau, S., G. S. Leori, V. Petruzzi, P. R. Watson, G. Schianchi, D. Bacciu, V. Mazzarello, T. S. Wallis, und S. Rubino.** (2001). *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infect. Immun.* **69**:3092-3099.
- Valdez, Y., R. B. Ferreira, und B. B. Finlay.** (2009). Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **337**:93-127.
- Valle, E. und D. G. Guiney.** (2005). Characterization of *Salmonella*-induced cell death in human macrophage-like THP-1 cells. *Infect. Immun.* **73**:2835-2840.
- Valone, S. E., G. K. Chikami, und V. L. Miller.** (1993). Stress induction of the virulence proteins (SpvA, -B, and -C) from native plasmid pSDL2 of *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* **61**:705-713.
- Vamadevan, A. S., M. Fukata, E. T. Arnold, L. S. Thomas, D. Hsu, und M. T. Abreu.** (2010). Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate. Immun.* **16**:93-103.
- Van Amersfoort, E. S., T. J. Van Berkel, und J. Kuiper.** (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:379-414.
- van Aubel, R. A., A. M. Keestra, D. J. Krooshoop, W. van Eden, und J. P. van Putten.** (2007). Ligand-induced differential cross-regulation of Toll-like receptors 2, 4 and 5 in intestinal epithelial cells. *Mol. Immunol.* **44**:3702-3714.
- Van der Meide, P. H. und H. Schellekens.** (1996). Cytokines and the immune response. *Biotherapy* **8**:243-249.
- van der Velden, V., M. K. Copass, und M. N. Starnbach.** (2005). *Salmonella* inhibit T cell proliferation by a direct, contact-dependent immunosuppressive effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:17769-17774.
- van Hemert, S., A. J. Hoekman, M. A. Smits, und J. M. Rebel.** (2007). Immunological and gene expression responses to a *Salmonella* infection in the chicken intestine. *Vet. Res.* **38**:51-63.
- van Putten, J. P. und B. D. Robertson.** (1995). Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **16**:847-853.
- Vance, R. E., R. R. Isberg, und D. A. Portnoy.** (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host. Microbe* **6**:10-21.
- Vassiloyanakopoulos, A. P., S. Okamoto, und J. Fierer.** (1998). The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to *Salmonella dublin* infections in genetically susceptible and resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:7676-7681.

- Vaudaux, P. und F. A. Waldvogel.** (1979). Gentamicin antibacterial activity in the presence of human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**:743-749.
- Vavricka, S. R., M. W. Musch, J. E. Chang, Y. Nakagawa, K. Phanvijhitsiri, T. S. Waypa, D. Merlin, O. Schneewind, und E. B. Chang.** (2004). hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* **127**:1401-1409.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, und F. C. Fang.** (1999). Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-808.
- Vazquez-Torres, A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, und F. C. Fang.** (2000). Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**:1655-1658.
- Veldhuizen, E. J., I. Koomen, T. Ultee, A. van Dijk, und H. P. Haagsman.** (2009). Salmonella serovar specific upregulation of porcine defensins 1 and 2 in a jejunal epithelial cell line. *Vet. Microbiol.* **136**:69-75.
- Verma, R., V. Ahuja, und J. Paul.** (2009). Frequency of single nucleotide polymorphisms in NOD1 gene of ulcerative colitis patients: a case-control study in the Indian population. *BMC. Med. Genet.* **10**:82.
- Vernikos, G. S. und J. Parkhill.** (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. *Bioinformatics.* **22**:2196-2203.
- Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott, und R. L. Ferrero.** (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**:1166-1174.
- Vidal, K., I. Grosjean, J. P. evillard, C. Gespach, und D. Kaiserlian.** (1993). immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J. Immunol. Methods* **166**:63-73.
- Vidal, S., M. L. Tremblay, G. Govoni, S. Gauthier, G. Sebastiani, D. Malo, E. Skamene, M. Olivier, S. Jothy, und P. Gros.** (1995). The lty/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J. Exp. Med.* **182**:655-666.
- Vighi, G., F. Marcucci, L. Sensi, G. Di Cara, und F. Frati.** (2008). Allergy and the gastrointestinal system. *Clin. Exp. Immunol.* **153 Suppl 1**:3-6.
- Vinzing, M., J. Eitel, J. Lippmann, A. C. Hocke, J. Zahlten, H. Slevogt, P. D. N'Guessan, S. Gunther, B. Schmeck, S. Hippenstiel, A. Fliieger, N. Suttorp, und B. Opitz.** (2008). NAIP and Ipaf control Legionella pneumophila replication in human cells. *J. Immunol.* **180**:6808-6815.
- Virtala, M., J. Kirveskari, und K. Granfors.** (1997). HLA-B27 modulates the survival of Salmonella enteritidis in transfected L cells, possibly by impaired nitric oxide production. *Infect. Immun.* **65**:4236-4242.
- Vladoianu, I. R., H. R. Chang, und J. C. Pechere.** (1990). Expression of host resistance to Salmonella typhi and Salmonella typhimurium: bacterial survival within macrophages of murine and human origin. *Microb. Pathog.* **8**:83-90.
- Voss, E., J. Wehkamp, K. Wehkamp, E. F. Stange, J. M. Schroder, und J. Harder.** (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J. Biol. Chem.* **281**:2005-2011.
- Wagner, R. N., M. Proell, T. A. Kufer, und R. Schwarzenbacher.** (2009). Evaluation of Nod-like receptor (NLR) effector domain interactions. *PLoS. One.* **4(4)**:e4931.
- Waldmann, K., M. Wendt, H. Plonait, und K. Bickhardt.** (2004). Lehrbuch der Schweinekrankheiten. Parey Verlag, 4. Auflage, MVS Medizinverlag Stuttgart. ISBN 3830441045.
- Wallis, T. S., S. M. Paulin, J. S. Plested, P. R. Watson, und P. W. Jones.** (1995). The Salmonella dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect. Immun.* **63**:2755-2761.

- Wallis, T. S. und E. E. Galyov.** (2000). Molecular basis of Salmonella-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* **36**:997-1005.
- Wang, Y., O. P. Couture, L. Qu, J. J. Uthe, S. M. Bearson, D. Kuhar, J. K. Lunney, D. Nettleton, J. C. Dekkers, und C. K. Tuggle.** (2008). Analysis of porcine transcriptional response to Salmonella enterica serovar Choleraesuis suggests novel targets of NFkappaB are activated in the mesenteric lymph node. *BMC. Genomics* **9**:437.
- Watson, P. R., S. M. Paulin, P. W. Jones, und T. S. Wallis.** (2000). (a) Interaction of Salmonella serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology* **146 (Pt7)**:1639-1649.
- Watson, P. R., A. V. Gautier, S. M. Paulin, A. P. Bland, P. W. Jones, und T. S. Wallis.** (2000). (b) Salmonella enterica serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* **68**:3744-3747.
- Weingartl, H. M., M. Sabara, J. Pasick, E. van Moorlehem, und L. Babiuk.** (2002). Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility. *J. Virol. Methods* **104**:203-216.
- Weinstein, D. L., B. L. O'Neill, D. M. Hone, und E. S. Metcalf.** (1998). Differential early interactions between Salmonella enterica serovar Typhi and two other pathogenic Salmonella serovars with intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **66**:2310-2318.
- Weiss, D. S., B. Raupach, K. Takeda, S. Akira, und A. Zychlinsky.** (2004). Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* **172**:4463-4469.
- Wells, C. L.** (1990). Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**:87-93.
- Werner, S. B., G. L. Humphrey, und I. Kamei.** (1979). Association between raw milk and human Salmonella dublin infection. *Br. Med. J.* **2**:238-241.
- Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, G. Saint, I. D. A. Haake, P. J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D. M. Underhill, C. J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P. S. Tobias, und R. J. Ulevitch.** (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* **2**:346-352.
- Wesche, H., W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, und Z. Cao.** (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* **7**:837-847.
- Wijburg, O. L., C. P. Simmons, R. N. van, und R. A. Strugnell.** (2000). Dual role for macrophages in vivo in pathogenesis and control of murine Salmonella enterica var. Typhimurium infections. *Eur. J. Immunol.* **30**:944-953.
- Williams, K. L., J. D. Lich, J. A. Duncan, W. Reed, P. Rallabhandi, C. Moore, S. Kurtz, V. M. Coffield, M. A. Accavitti-Loper, L. Su, S. N. Vogel, M. Braunstein, und J. P. Ting.** (2005). The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor alpha-, and Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory signals. *J. Biol. Chem.* **280**:39914-39924.
- Willingham, S. B., D. T. Bergstralh, W. O'Connor, A. C. Morrison, D. J. Taxman, J. A. Duncan, S. Barnoy, M. M. Venkatesan, R. A. Flavell, M. Deshmukh, H. M. Hoffman, und J. P. Ting.** (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host. Microbe* **2**:147-159.
- Wilson, G. S. und A. A. Miles.** (1955). Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. Arnold, London.
- Wilson, R. L., J. Elthon, S. Clegg, und B. D. Jones.** (2000). Salmonella enterica serovars gallinarum and pullorum expressing Salmonella enterica serovar typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. *Infect. Immun.* **68**:4782-4785.
- Winkler, G. C.** (1988). Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. *Am. J. Anat.* **181**:217-234.
- Winter, S. E., P. Thiennimitr, S. P. Nuccio, T. Haneda, M. G. Winter, R. P. Wilson, J. M. Russell, T. Henry, Q. T. Tran, S. D. Lawhon, G. Gomez, C. L. Bevins, H. Russmann, D. M. Monack, L. G. Adams, und A. J. Baumler.** (2009). Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during Salmonella enterica serotype typhimurium infection. *Infect. Immun.* **77**:1904-1916.

- Witthoft, T., L. Eckmann, J. M. Kim, und M. F. Kagnoff.** (1998). Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol* **275**:G564-G571.
- Wolfert, M. A., T. F. Murray, G. J. Boons, und J. N. Moore.** (2002). The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* **277**:39179-39186.
- Wolfert, M. A., A. Roychowdhury, und G. J. Boons.** (2007). Modification of the structure of peptidoglycan is a strategy to avoid detection by nucleotide-binding oligomerization domain protein 1. *Infect. Immun.* **75**:706-713.
- Wu, W., N. E. Alexis, X. Chen, P. A. Bromberg, und D. B. Peden.** (2008). Involvement of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB in LPS-induced CD40 expression on human monocytic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228**:135-143.
- Yamamoto-Furusho, J. K., N. Barnich, R. Xavier, T. Hisamatsu, und D. K. Podolsky.** (2006). Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **281**:36060-36070.
- Yang, D., O. Chertov, und J. J. Oppenheim.** (2001). The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol. Life Sci.* **58**:978-989.
- Yang, S. K., L. Eckmann, A. Panja, und M. F. Kagnoff.** (1997). Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* **113**:1214-1223.
- Ye, Z., E. O. Petrof, D. Boone, E. C. Claud, und J. Sun.** (2007). Salmonella effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am. J. Pathol.* **171**:882-892.
- Ye, Z., J. D. Lich, C. B. Moore, J. A. Duncan, K. L. Williams, und J. P. Ting.** (2008). ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function. *Mol. Cell Biol.* **28**:1841-1850.
- Yoo, N. J., W. S. Park, S. Y. Kim, J. C. Reed, S. G. Son, J. Y. Lee, und S. H. Lee.** (2002). Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1beta processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**:652-658.
- Zhang, S., R. L. Santos, R. M. Tsoilis, S. Miold, W. D. Hardt, L. G. Adams, und A. J. Baumler.** (2002). Phage mediated horizontal transfer of the sopE1 gene increases enteropathogenicity of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for calves. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**:243-247.
- Zhou, D., M. S. Mooseker, und J. E. Galan.** (1999). Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**:2092-2095.
- Zhou, D., L. M. Chen, L. Hernandez, S. B. Shears, und J. E. Galan.** (2001). A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol. Microbiol.* **39**:248-259.
- Zhou, X., D. H. Shah, M. E. Konkel, und D. R. Call.** (2008). Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Mol. Microbiol.* **69**:747-764.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. und R. J. Ulevitch.** (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today* **14**:121-125.
- Zilbauer, M., N. Dorrell, A. Elmi, K. J. Lindley, S. Schuller, H. E. Jones, N. J. Klein, G. Nunez, B. W. Wren, und M. Bajaj-Elliott.** (2007). A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.* **9**:2404-2416.

Verzeichnis eigener Publikationen

Bisherige Publikationen:

Guenther S, Filter M, Tedin K, Szabo I, Wieler LH, Nöckler K, Walk N, Schierack P: *Enterobacteriaceae* populations during experimental *Salmonella* infection in pigs. *Vet Microbiol* 142(3-4):352-60, 2010

Schierack P, Walk N, Ewers C, Wilking H, Steinrück H, Filter M, Wieler LH: ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. *Environ Microbiol* 10(7):1742-51, 2008

Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch KD, Wieler LH: Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153(Pt 11):3830-7, 2007

Abstracts:

Interaction of *Salmonella* serotypes with enterocytes and macrophages. Walk N, Tedin K, Wieler LH. Poster: 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie. Bonn 30.03.-02.04.2011

Host-adaptation and the zoonotic potential of *Salmonella* serovars. Tedin K, Molina-Alvaredo A, Walk N, Schwerk P. Vortrag: Nationales Symposium für Zoonoseforschung Berlin, 07.10-08.10.2009

ExPEC-typical virulence associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group. Schierack P, Walk N, Ewers C, Filter M, Wilking H, Wieler LH. Poster: Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG). Braunschweig, 25.06-27.06.2008

Integrative analysis of the modes of action of probiotics in pigs. Host-pathogen interactions and the cellular microbiology of probiotic function. Tedin K; Schierack P; Kleta S; Tölke S; Nordhoff M; Pollmann M; Walk N; Schwerk P; Lübke-Becker A; Wieler L H. Vortrag: International Conference "Sustainable animal health through Eubiosis - Relevance for Man" Ascona-Monte Verité/Schweiz, 08.10.-13.10.2006

Transmission of *E. coli* clones from the sow to their piglets. Walk N; Wieler L -H; Schierack P. Poster: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG), Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie". Wetzlar, 14.-17.6.2006 (Abstr. in: Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120(1-2), 2007 Seiten 18, P15)

Danksagung

Bei den zahlreichen Personen, die diese Arbeit durch Ihren Einsatz und ihre Unterstützung ermöglicht haben, möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Wieler danke ich herzlichst für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Gewährung zur Durchführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, sowie für die wissenschaftliche Betreuung und die kritischen Anmerkungen zum Manuskript dieser Arbeit.

Für die finanzielle Unterstützung und damit die Ermöglichung dieser Arbeit danke ich der Schaumann-Promotionsförderung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karsten Tedin für die allseits gewährte Hilfsbereitschaft, die hervorragende Betreuung, die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der vorliegenden Arbeit und vor allem für die herzliche Zusammenarbeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen für die konstruktive Unterstützung und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Herrn Peter Schwerk danke ich für seine Geduld, seine exzellente Hilfestellung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit und seine beständige Bereitschaft, meine Fragen ausführlich und erschöpfend zu beantworten. Bei Antje, Astrid, Christa, Christiane, Claudia, Mirjam und Peter bedanke ich mich für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und die tolle Zusammenarbeit.

Mein herzlichster Dank gilt Sylvia und Anke, die mich immer selbstlos unterstützt haben, für ihre unverzichtbare Hilfe in allen Lebensbereichen und für das Vertrauen in meine Fähigkeiten. Stephanie, Anja und Constanze danke ich von Herzen für Ihren mir gewährten Rückhalt und ihre Freundschaft. Ihr werdet für mich immer ein wichtiger und motivierender Teil meines Lebens bleiben.

Insbesondere danke ich auch meinen Eltern für das Korrekturlesen dieser Arbeit, vor allem aber für das stete Vertrauen und die allseits gewährte Unterstützung.

Meinem Freund Daniel danke ich für seine Geduld und Zuversicht; hauptsächlich jedoch für seinen unbeirrbaren Rückhalt während meiner Doktorandenzeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation zum Thema „Experimentelle Untersuchung zur Rolle der angeborenen Immunantwort und der Wirtsspezifität von *Salmonella*-Serovaren“ im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin selbstständig angefertigt habe. Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe 'Intestinale zelluläre Mikrobiologie' um Dr. Tedin und Prof. Dr. Wieler im Zeitraum von Januar 2007 bis März 2009 durchgeführt und im August 2011 an der Freien Universität Berlin eingereicht. Ich versichere, ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen zu haben.

Magdeburg, den

.....
(Nicole Walk)