

Wirtsabhängige Faktoren
in der Pathogenese & Persistenz von
***Salmonella* Serovaren in Mensch und Tier**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Sven Maurischat
aus Berlin

Berlin, Februar 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2008 bis Mai 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Lothar H. Wieler in der Arbeitsgruppe von Dr. Karsten Tedin am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar. H. Wieler

Freie Universität Berlin
Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Mikrobiologie & Tierseuchen
Philippstr. 13
10115 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge

Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Biologie; Arbeitsgruppe Mikrobiologie I
Königin-Luise-Str. 12-16
14195 Berlin

Disputation am 17.01.2013

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Summary	3
I. Einleitung	5
I.1. Phylogenie, Systematik und Nomenklatur der Salmonellen	6
I.2. Epidemiologie (Prävalenz) von <i>Salmonella</i> – Infektionen	8
I.2.1. Infektionsquellen	10
I.3. Wirtsspezifität	12
I.3.1. <i>Salmonella</i> im Menschen	13
I.3.2. <i>Salmonella</i> im Schwein	15
I.3.3. <i>Salmonella</i> im Huhn	16
I.4. Immunologische Grundlagen	19
I.4.1. Die intestinale Immunabwehr	19
I.4.2. Intestinale Epithelzellen	23
I.4.3. Intestinale Makrophagen	25
I.4.4. Pathogenerkennung	26
I.4.5. Pathogen-associated molecular patterns (Flagellin, Peptidoglycan, LPS) ...	27
I.4.6. Toll-like Rezeptoren (TLRs)	29
I.4.7. NOD-like Rezeptoren (NLRs)	32
I.4.8. Das NF- κ B Signalling	34
I.4.9. Zytokine und Chemokine	35
I.5. Pathogenese enterischer Salmonellosen	37
I.6. Wechselwirkungen von <i>Salmonella</i> mit dem Wirt	42
I.7. Zielsetzung	45
II. Material	47
II.1. Zelllinien	47
II.1.1. Humane Zelllinien	47
II.1.2. Porcine Zelllinien	48
II.1.3. Hühner-Zelllinien	48
II.2. Bakterienstämme	50
II.3. Plasmide & Vektoren	51
II.4. Oligonukleotide (primers)	51
II.5. Chemikalien, Enzyme, Nukleinsäuren	53
II.6. Lösungen & Medien	54
II.7. Kits	56

II.8. Verbrauchsmaterialien	56
II.9. Geräte	57
II.10. Software	58
III. Methoden	59
III.1. Mikrobiologische Methoden.....	59
III.1.1. Bakterienkultur	59
III.1.2. Bakterienzahlbestimmung	59
III.1.3. Bakterielle Wachstumskurven.....	59
III.1.4. Kryokonservierung von Bakterienstämmen	60
III.1.5. Mutagenese nach Wanner [535].....	60
III.1.6. Herstellung elektrokompenter Bakterien.....	61
III.1.7. Elektroporation	61
III.1.8. Herstellung von Lysaten des Bakteriophagen P22.....	62
III.1.9. Generalisierte Transduktion von Bakterien.....	62
III.1.10. Herstellung bakterieller Lysate (Kochlysate).....	63
III.1.11. Motilitätstest	63
III.2. Zellbiologische Methoden.....	64
III.2.1. Kultur eukaryotischer Zellen	64
III.2.2. Subkultivierung eukaryotischer Zellen	64
III.2.3. Bestimmung der Zellzahl	65
III.2.4. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	65
III.2.5. Untersuchung auf Mykoplasmen.....	65
III.2.6. Isolation und Kultur humaner Primärmakrophagen	65
III.2.7. Infektionsversuch oder Gentamicin - Protection - Assay.....	66
III.2.8. Transduktion eukaryotischer Zellen mit lentiviralen NF- κ B Reporterkonstrukten.....	68
III.2.9. Bestimmung der NF- κ B Aktivierung.....	69
III.2.10. Zytotoxizitätsmessung	70
III.3. Molekularbiologische Methoden	70
III.3.1. Agarosegelelektrophorese	70
III.3.2. Extraktion von RNA (inkl. DNase Verdau).....	71
III.3.3. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	71
III.3.4. Reverse Transkription	72
III.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)	72
III.3.6. Real-Time (quantitative) Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR).....	73
III.3.7. Microarray-basierte genomweite Genexpressionsanalysen	74
III.3.8. Statistische Auswertung	77

IV. Ergebnisse	78
IV.1. Wachstum von <i>Salmonella</i> bei 37°C und 42°C.....	78
IV.2. Invasion und intrazelluläre Persistenz	80
IV.2.1. Schwein	81
IV.2.2. Huhn.....	82
IV.2.3. Mensch	83
IV.2.4. Persistenz bei 37°C und 42°C	90
IV.3. Zytotoxische Effekte.....	91
IV.4. Untersuchung der Flagellin-Mutanten hinsichtlich ihrer Motilität	97
IV.5. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB	97
IV.5.1. NF-κB Aktivierung als Reaktion auf verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster	99
IV.5.2. NF-κB Aktivierung als Reaktion auf Infektionen mit verschiedenen <i>Salmonella</i> Serovaren	105
IV.6. Expression bestimmter Zytokine infolge einer Salmonelleninfektion.....	108
IV.7. Genomweite Genexpression humaner Primärmakrophagen infolge einer Infektion mit verschiedenen <i>Salmonella</i> Serovaren.....	113
V. Diskussion	123
V.1. Invasion und Persistenz von <i>Salmonella</i>.....	127
V.2. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch <i>Salmonella</i>.....	134
V.2.1. Die Rolle bakteriellen Flagellins in der Pathogenerkennung	137
V.2.2. Die Reaktion der Hühnermakrophagen HD-11	138
V.2.3. Die Reaktion der porcinen Zelllinien	141
V.3. Die Rolle von Makrophagen und Epithelzellen bezüglich der Wirtsadaptation von <i>Salmonella</i>	145
V.4. Ausblick	157
VI. Literaturverzeichnis.....	160
VII. weitere Verzeichnisse	212
VII.1. Abkürzungsverzeichnis	212
VII.2. Abbildungsverzeichnis	218
VII.3. Tabellenverzeichnis	222
VIII. Anhang	223
VIII.1. Zusätzliche Daten	223
VIII.2. Publikationsliste	246
VIII.3. Danksagung	247
VIII.4. Eidesstattliche Erklärung.....	249

ZUSAMMENFASSUNG

Salmonella enterica führt deutschlandweit zu den zweithäufigsten lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten. Auffällig ist die Heterogenität des Wirtsspektrums. Während auf der einen Seite stark adaptierte Serovare wie etwa *S. Typhi* ausschließlich schwere Infektionen im Menschen und höheren Primaten auslösen, verursachen auf der anderen Seite Serovare wie *S. Typhimurium* als klassische Zoonoseerreger Infektionen in diversen Tierspezies und im Menschen. Dabei unterscheiden sich die jeweiligen Krankheitsabläufe z.T. erheblich in Abhängigkeit der Immunkompetenz, des Alters sowie der Spezies des infizierten Wirts. Zur Aufklärung möglicher Wirts- und Serovar-abhängiger Faktoren, die zur unterschiedlichen Adaptation und Pathogenese von *Salmonella enterica enterica* Serovaren beitragen, wurden systematisch vergleichende Infektionsstudien mit *Salmonella* Serovaren unterschiedlichen Wirtsspektrums (Breitspektrum: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*; Rinder-adaptiert: *S. Dublin*; Schweine-adaptiert: *S. Choleraesuis*; Geflügel-beschränkt: *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*) in intestinalen Epithel- und Makrophagenzelllinien sowie Primärmakrophagen porcinen, aviären und humanen Ursprungs als repräsentative Zelltypen der frühen Infektionsphase durchgeführt. Die Wirts-Pathogen-Interaktionen wurden hinsichtlich der Invasivität und Persistenz der Serovare, daraus resultierender zytotoxischer Effekte und hinsichtlich der Wirtsimmunreaktion sowie der genomweiten Genexpressionsänderung des Wirtes untersucht. Zur Analyse der Immunreaktion wurden Reporterzelllinien des zentralen immunregulatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B hergestellt. Unter Berücksichtigung aller Faktoren ergaben sich Phänotypen, die wichtige Hinweise auf Mechanismen zur Wirtsadaptation und Pathogenese liefern. So wiesen die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* Spezies- und Zelltyp-übergreifend hohe Invasionsraten und eine hervorragende intrazelluläre Persistenz auf. *S. Dublin* ergab ähnlich hohe Invasionsraten, persistierte jedoch schlechter in Epithelzellen und Makrophagen. Die hohen Invasionsraten verursachten eine starke Aktivierung von NF- κ B und demfolgend eine starke Induktion proinflammatorischer Zytokine. Parallel führten sie jedoch auch im verhältnismäßig hohen Maße zu zytotoxischen Effekten, was *in vivo* zu einer starken Inflammation und örtlichen Begrenzung der Infektion führen würde, wie sie etwa bei der humanen Gastroenteritis durch Breitspektrum-Serovare zu beobachten ist. Dagegen stellten sich die beiden *S. Choleraesuis* – Stämme insbesondere in den porcinen Zelllinien als schwach invasiv dar, persistierten jedoch in den meisten Zelllinien ähnlich gut wie die Breitspektrum-Serovare und führten dementsprechend zu einer mittleren NF- κ B Aktivierung und Zytotoxizität. Diesbezüglich stellten sich die verwendeten porcinen Zell-

linien als sehr robust heraus, indem sie selbst bei sehr hohen MOIs nicht abstarben und bei Behandlung mit verschiedenen synthetischen *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) wie Flagellin, PGN-Fragmenten und LPS nur schwach bis mäßig reagierten. *In vivo* würde die beobachtete schwache Invasivität von *S. Choleraesuis* vor allem in porcinen Zellen und die relativ gute Persistenz, die durch das robuste Verhalten der porcinen Zelllinien jedoch weitestgehend toleriert wird, auf eine „sanfte“ Infektion ohne starke Inflammation hindeuten, die damit eine systemische Ausbreitung ermöglicht, wie sie für *S. Choleraesuis* im Schwein beschrieben wurde.

Die Geflügel-beschränkten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* wiesen Spezies- und Zelltyp-übergreifend die niedrigsten Invasionsraten auf und persistierten verhältnismäßig schlecht. Dementsprechend verursachten sie kaum zytotoxische Effekte. Hinsichtlich der NF- κ B Aktivierung deuteten speziell diese Serovare daraufhin, dass die Stärke der Aktivierung nicht immer nur eine einfache Funktion der intrazellulären Keimzahl ist, so dass sie in Anbetracht ihrer niedrigen intrazellulären Keimzahlen und dem Fehlen von Flagellin als einem der wichtigsten PAMPs in den meisten Zelllinien zu einer immer noch recht hohen Immunaktivierung führten. Auffällig war diesbezüglich auch die hohe Sensibilität der Hühnermakrophagen, die bereits bei einer moderaten MOI um 5 bei höher invasiven Serovaren abstarben. Demnach begünstigt die schwache Invasivität und intrazelluläre Persistenz sowie die geringe Zytotoxizität von *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* trotz eines relativ hohen inflammatorischen Potentials das Überleben in sehr sensibel reagierenden Hühnermakrophagen, die für eine systemische Infektion, wie sie bei *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* Infektionen im Huhn auftreten, notwendig wären.

Untersuchungen mit synthetischen PAMPs sowie entsprechenden *Salmonella* Deletionsmutanten mit beeinträchtigter Flagellensynthese und Peptidoglycanrecycling deuteten zudem vor allem auf die initiale Interaktion mit Epithelzellen eher als die mit Makrophagen als diskriminierenden Faktor hin, der eine Spezies-spezifische Anpassung und Pathogenität ermöglicht. So reagierten alle hier verwendeten Makrophagen Spezies-übergreifend sehr ähnlich auf die Infektion mit den *Salmonella* Mutanten als auch hinsichtlich ihrer genomweiten Genexpression auf eine Infektion mit unterschiedlichen Serovaren.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Wirtsadaptation von *Salmonella* neben einer möglichen bakteriellen Adaptation insbesondere aus immunologischen oder anatomischen Eigenschaften resultiert, die einem Serovar, das im Vergleich zu Breitspektrum-Serovaren Einschränkungen der Virulenz oder des Metabolismus aufweist, in bestimmten Spezies eine erfolgreiche Infektion und Persistenz ermöglichen.

SUMMARY

Host-dependent factors in the pathogenicity and persistence of *Salmonella* serovars in animals and man

Salmonella enterica is the second most prevalent causative agent of foodborne diseases in Germany. With regard to their host range, *Salmonella* is a group of strong heterogeneity. There are highly adapted serovars such as *S. Typhi* which infect and cause severe disease only in humans and higher primates, whereas other serovars such as *S. Typhimurium* infect many different animal species as well as humans. The particular pathogenicity of the infections depends considerably on the age, immune status and species of the host. To identify possible host- and serovar-specific determinants which might be involved in adaptation and different pathogenicities of *Salmonella enterica enterica* serovars, we systematically compared infections with *Salmonella* serovars of different host-ranges (broad host-range: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*; cattle-adapted: *S. Dublin*; swine-adapted: *S. Choleraesuis*; poultry-restricted: *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*) in intestinal epithelial and macrophage-like cell lines and primary macrophages of porcine, avian and human origin as representative of the early affected cell types during infection. Host-pathogen interactions were analyzed with regard to invasiveness and persistence of the serovars, cytotoxic effects and host immune responses as well as whole genome expression patterns of the host. To analyze the early, innate immune responses to infections, we established reporter cell lines for the central immunoregulatory transcription factor NF- κ B. Evaluation of all the resulting individual outcomes of these different assays revealed certain phenotypes suggesting possible mechanisms for host adaptation and pathogenicity. We observed high invasion rates and persistence of the broad host-range serovars *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* regardless of the cell type and species. While *S. Dublin* showed similar invasion rates, persistence was reduced in both epithelial cells and macrophages. High invasion rates correlated with a strong NF- κ B activation and subsequent induction of proinflammatory cytokines. Relatively strong cytotoxic effects were associated with this type of pathogenicity, which suggest a strong inflammation and a local limitation of the infection *in vivo*, consistent with observations of human gastroenteritis due to broad host-range serovars.

In contrast, *S. Choleraesuis* strains were weakly invasive, especially in porcine cells, but showed similar levels of persistence in most cell lines as the broad host-range serovars. The innate immune responses to infections with *S. Choleraesuis* were correspondingly intermediate, with average NF- κ B activation levels and associated cytotoxicity. The porcine

cell lines were found to be extremely robust, showing little or no cell death in response to infections with even very high infective doses, and responded to synthetic pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) with only average or weak NF- κ B activation. The lower invasiveness of the swine-adapted serovar *S. Choleraesuis* in porcine cells but the fairly high-level persistence which is tolerated by these host cells would result in a “soft” infection without a strong inflammation *in vivo* that allows this serovar to spread systemically as has been described for *S. Choleraesuis* infections in pigs.

The poultry-restricted *Salmonella* serovars Gallinarum and Pullorum showed the lowest invasion rates and persisted poorly, independent of the cell type or species. This correlated with no or only very weak cytotoxic effects. Infections with these serovars also indicated that NF- κ B activation is not necessarily a simple function of the intracellular bacterial numbers. These serovars showed a higher NF- κ B activation in most cell lines relative to their intracellular numbers as did other serovars, and the lack of flagellin typical for these serovars as major PAMP required for innate immune recognition. We observed a strong sensitivity of the chicken macrophages to the numbers of invading bacteria, with early onset of cell cytotoxicity at even moderate MOI of 5 with the more highly invasive serovars. These observations suggest the weak invasiveness and low-level intracellular persistence result in a low cytotoxicity of *Salmonella* serovars Gallinarum and Pullorum, enabling them to survive despite a relatively high inflammatory potential. This conclusion would also be consistent with the patterns of systemic infections reported for *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* infections in chickens.

In addition, screening of the cell lines of different species with synthetic PAMPs like flagellin, PGN-fragments or LPS as well as *Salmonella* mutants with disrupted synthesis of flagella and recycling of peptidoglycan indicate a major role of the epithelial cell layer rather than interactions with macrophages in discrimination of those factors. Independent of the species origins, all of the macrophages used in this study reacted very similarly to infections with *Salmonella* mutants including whole genome gene expression patterns in response to infections with the different *Salmonella* serovars. The results of this study therefore point towards the initial interactions with the intestinal epithelia provides the major discriminating factor enabling a species-specific host adaptation and pathogenicity.

Rather than an adaptation to a particular host, this study suggests host adaptation is the result of a particular host providing the necessary prerequisites, anatomical or immunological, which permit successful infection and persistence of serovars which may have virulence or metabolic disadvantages compared to broad host-range serovars.

I. EINLEITUNG

Salmonellen sind Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien mit einer Länge von 2 – 5 µm und einem Durchmesser von ~ 1 µm [1]. Mit Ausnahme weniger *Salmonella enterica enterica* Serovare (z.B. *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*) sind Salmonellen peritrich begeißelt und motil. Sie leben überwiegend proto- sowie chemotroph und besitzen sowohl die Möglichkeit eines oxidativen als auch fermentativen Energiestoffwechsels. Derart angepasst an eine fakultativ-anaerobe Lebensweise kommen sie intra- als auch extrazellulär in warm- und kaltblütigen Organismen wie auch in der Umwelt vor. Weltweit hat sich *Salmonella* damit als besonders erfolgreicher Infektionserreger sowohl im Menschen als auch in Tieren diverser Herkunft etabliert und gehört trotz wirksamer Antibiotika-Therapien und Bekämpfungs- sowie Überwachungsmaßnahmen immer noch mit zu den wichtigsten Pathogenen lebensmittelbedingter Infektionskrankheiten in der Humanmedizin. Die Übertragung erfolgt meist oral, so dass zumindest in den Industrienationen Nahrungsmittel als bedeutenste Infektionsquelle anzusehen sind. Damit wird auch deutlich, dass eine erfolgreiche Bekämpfung über die Grenzen der Human- und Veterinärmedizin erfolgen muss. Insbesondere das Auftreten immer neuer Stämme, die häufig anstelle erfolgreich verdrängter Stämme treten sowie die steigende Tendenz zur Ausbildung von (Mehrfach-) Resistenzen gegenüber Antibiotika stellen sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin vor neue Herausforderungen. Ähnlich variabel wie die Besiedlung unterschiedlicher Lebensräume durch die über 2500 Serovare scheint auch die Auswirkung einer Salmonelleninfektion im Wirtsorganismus zu sein. So führen Infektionen in Abhängigkeit des Serovars, der Wirtsspezies, dessen Alters und Immunstatus zu Erkrankungen, die von einer klinisch inapparenten Symptomatik über eine lokale Gastroenteritis bis hin zu systemischen Erkrankungen mit fatalem Ausgang führen können. Zudem weisen die Serovare sehr unterschiedliche Wirtsspektren und -spezifitäten auf. Die vordergründige Verdrängung stark adaptierter Serovare wie *S. Gallinarum*, *S. Typhisuis* etc., die oftmals mit schweren Krankheitsbildern und entsprechenden ökonomischen Verlusten in der Lebensmittelindustrie einhergingen, hat dazu geführt, dass diese Serovare heute meist nur noch in Entwicklungsländern eine Rolle spielen, in den Industrienationen jedoch größtenteils durch Serovare wie *S. Typhimurium* ersetzt wurden, die kaum adaptiert sind und häufig unauffälligere Krankheitsbilder verursachen. Folglich wurde das Erkennen von Infektionen in Tierbeständen erschwert, die Gefahr einer Übertragung durch tierische Produkte auf den Menschen erhöht. Die Mechanismen, die der Anpassung bestimmter *Salmonella* Serovare an bestimmte Wirte oder der Verursachung distinkter Krankheitsverläufe zugrunde liegen, sind

bislang nur punktuell und ansatzweise untersucht.

In einem systematischen und möglichst umfassenden Ansatz sollen in dieser Arbeit *Salmonella enterica enterica* Serovare als Vertreter verschiedener Stufen der Wirtsadaptation mit intestinalen Epithelzellen sowie Makrophagen, die im Verdacht stehen, ursächlich für den Verlauf einer Infektion zu sein, in Kontakt gebracht werden. Die folgenden Auswirkungen auf die Bakterien und Wirtszellen sollen untersucht und hinsichtlich Wirts- und Serovar-spezifischer Unterschiede analysiert werden. Hierbei liegt der Fokus auf möglichen Unterschieden im angeborenen Wirtsimmunsystem und der Frage, welche Rolle in diesem Kontext die hier verwendeten Zelltypen (intestinale Epithelzellen und Makrophagen) spielen. Dazu werden Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Mensch, Huhn, Schwein) genutzt und die bestehenden Systeme durch Reporter für zentrale Immunregulatoren wie NF- κ B erweitert. Die aus der Arbeit hervorgehenden Ergebnisse sollen mögliche Faktoren und Mechanismen zur Adaptation von *Salmonella* an den Menschen sowie wichtige Lebensmittel liefernde Tiere wie das Schwein und das Huhn aufdecken, damit die Grundlage für weitere tiefere Studien legen und darüberhinaus zum Verständnis der vielseitigen Pathogenese von Salmonelleninfektionen beitragen.

I.1. Phylogenie, Systematik und Nomenklatur der Salmonellen

Die Gattung *Salmonella*, die ihren Namen infolge der Isolation des „*hog cholera bacillus*“ (*Salmonella Choleraesuis*) als vermeintlichen Erreger der klassischen Schweinepest (*hog cholera*) 1885 durch Theobald Smith (1859 – 1934), einem wissenschaftlichen Assistenten D.E. Salmons, im Jahre 1900 von J. Lignières erhielt, gehört auf Grundlage phylogenetischer Untersuchungen ihrer 16S rRNA Gensequenz in die Familie der *Enterobacteriaceae*, zu denen andere wichtige Darmpathogene wie *Yersinia*, *Shigella* und *Escherichia* zählen, und ist damit Teil der γ -*Proteobacteria* des Phylum der *Proteobacteria* innerhalb der Domäne der *Bacteria* [1].

Die Einteilung der Salmonellen in Spezies und Subspezies ist ständigen Veränderungen unterworfen und erfolgte erstmals 1934 als Kauffmann-White Schema mit 44 Serovaren nach einem 1926 publizierten Vorschlag zur serologischen Einteilung von P.R. White [2]. Das Schema wurde kontinuierlich durch F. Kauffmann (Statens Institut Kopenhagen), L. Le Minor, M.Y. Popoff und P.A.D. Grimont / F.-X. Weill (alle Institute Pasteur, Paris) erweitert und verändert, so dass es heute mehr als 2555 Serovare umfasst und aufgrund größerer Abwandlungen in der Zeit Le Minors heute als Kauffmann-White-Le Minor Schema bezeichnet wird. Im Abstand von einigen Jahren erscheinen Veröffentlichungen des World

Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* im Institute Pasteur, Paris zur Aktualisierung des Schemas [3]. Danach unterscheidet man lediglich zwei Spezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* [4, 5], die weiterhin in sechs Subspecies (ssp.) *S. enterica* ssp. *enterica* (I), *S. enterica* ssp. *salamae* (II), *S. enterica* ssp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssp. *houtenae* (IV) und *S. enterica* ssp. *indica* (VI) eingeteilt werden. 2005 wurden die Vorschläge von Le Minor, Popoff und Reeves offiziell durch den Beschlussfassungsausschuss (Judicial Commission) des International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) angenommen [6, 7].

Klinisch relevant sind vor allem die Subspezies I, IIIa und IIIb. Etwa 1500 der bislang bekannten Serovare gehören zur Subspezies I und sind historisch bedingt häufig mit Namen stellvertretend für Krankheitssymptome, Wirtsspezifität oder Herkunft benannt (z.B. *S. Choleraesuis* – Cholera beim Schwein, *S. Abortusovis* – Aborte beim Schaf, *S. Moabit* – isoliert 2003 in Berlin - Moabit). In dieser Arbeit werden *Salmonella enterica enterica* Serovare durch *S.* und dem Namen des Serovars abgekürzt (vgl. VII.1). Alternativ werden alle Serovare auf Grundlage des Kauffmann-White-Schemas serologisch unterschieden und entsprechend ihrer Antigenformel bestehend aus dem O- (somatischen), dem H- (flagellären) und gegebenenfalls dem Vi- (Kapsel-) Antigen bezeichnet. Dabei beschreibt man die O-Antigene (äußere Oligosaccharide des Lipopolysachcharids (LPS) der bakteriellen Zellwand) numerisch und teilt die Serovare anhand des Auftretens bestimmter Haupt-O-Antigene in eine von neun O-Gruppen (A, B, C, ...) ein. Diese Gruppeneinteilung ist insbesondere in der Diagnostik und Medizin von Bedeutung und entsprechend weit verbreitet. Die über 70 verschiedenen H-Antigene als Teil bakterieller Flagellen können in zwei Formen, der sogenannten spezifischen Phase 1 (H1) und der unspezifischen Phase 2 (H2), auftreten. Welche der beiden Phasen vorliegt, hängt von der sogenannten Phasen-Variation ab, die zur Expression der Flagellin-Gene *fliC* oder *fljB* führt. Monophasische Stämme wie *S. Enteritidis* besitzen häufig nur das spezifische Phase 1 H-Antigen, nicht-motile Serovare wie *S. Gallinarum* gar kein H-Antigen. Die H1-Antigene werden mit Kleinbuchstaben bezeichnet oder dem Buchstaben „z“ folgend nummeriert (z1, z2, etc.). Die H2-Antigene können alphabetisch als auch numerisch gekennzeichnet werden. Zudem besitzen einige Serovare (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C* und *S. Dublin*) eine Kapsel, die als Vi-Antigen in der Antigenformel angegeben ist (siehe Tabelle 1).

Neben dieser als Serotypisierung bezeichneten Einteilung der *Salmonella* Serovare lassen diese sich weiterhin durch Lysotypisierung in Phagentypen (PT) oder definitive Typen (DT),

durch Resistenzprofile, genetische und biochemische Charakteristika unterscheiden, was insbesondere für die Epidemiologie von Interesse ist [8].

Serovar	O-Gruppe	O-Antigen	H1-Antigen	H2-Antigen
Typhimurium	B	1,4,(5),12	i	1,2
Enteritidis	D1	1,9,12	g,m	-
Choleraesuis	C1	6,7	c	1,5
Dublin	D1	9,12	g,p	-
Gallinarum	D1	9,12	-	-
Typhi	D1	9,12 (Vi)	d	-

Tabelle 1: Beispiel der Antigenformel einiger in dieser Arbeit verwendeten Serovare

I.2. Epidemiologie (Prävalenz) von *Salmonella* – Infektionen

Durch *Salmonella* bedingte Infektionen können entsprechend des Krankheitsbildes in typhoidale (verursacht z.B. von *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B, C) und nicht-typhoidale Erkrankungen (verursacht z.B. von *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) eingeteilt werden. Zu beachten ist jedoch, dass die Ausprägung einer Salmonellen-Infektion je nach Wirtsspezies, Immunstatus und Alter des Wirts bei demselben Serovar sehr unterschiedlich ausfallen kann und somit diese Einteilung nur begrenzt der Tatsache entspricht.

Im Jahr 2000 wurde die Zahl typhoidaler (inkl. paratyphoidaler) Erkrankungen weltweit auf etwa 27,1 Mio. mit 217.000 Toten geschätzt. Der Schwerpunkt liegt in südost- und zentralasiatischen Ländern, zu Ausbrüchen kommt es jedoch auch regelmäßig im subsaharischen Afrika, infolge des gestiegenen Lebensstandards und der hygienischen Zustände nur noch selten in Lateinamerika [9].

Die Zahl nicht-typhoidaler, gastroenteritischer Salmonellosen wird dagegen nach einer Berechnung von S.E. Majowicz auf 94 Mio. Fälle pro Jahr mit etwa 155.000 Toten geschätzt [10], wovon etwa 80 Mio. (86%) auf lebensmittelbedingte Infektionen zurückzuführen sind. Damit wäre *Salmonella* für etwa 3% der geschätzten 2,8 Milliarden Durchfallerkrankungen weltweit verantwortlich. Die ökonomischen Kosten, die durch *Salmonella* Infektionen entstehen, lassen sich schwer abschätzen und unterscheiden sich von Land zu Land stark. In den USA führen die geschätzten 1,4 Mio. Salmonellosen nach einer Berechnung der WHO allein durch die Behandlung und den Produktivitätsverlust jährlich zu Kosten in Höhe von 3 Milliarden USD [11]. Auch nicht zu vernachlässigen sind zudem bedeutende ökonomische Verluste in Tierbeständen der Lebensmittelindustrie.

In Deutschland erreichte die Zahl lebensmittelbedingter Salmonellosen 1992 mit 195.000 gemeldeten Fällen ihren Höhepunkt und sinkt seitdem infolge verstärkter Monitoring - Programme und Richtlinien zur Prävention und Bekämpfung von *Salmonella* Ausbrüchen

kontinuierlich [12, 13]. 2009 wurden etwa 32.000 Salmonellose Fälle beim Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen (NRZ) am Robert-Koch Institut gemeldet. Nichtsdestotrotz ist die *Salmonella*-Enteritis nach der *Campylobacter*-Enteritis immer noch die zweithäufigste meldepflichtige bakterielle Erkrankung in Deutschland mit den höchsten Inzidenzraten bei Kindern unter 10 Jahren [14].

Der Höhepunkt der Infektionswelle 1992 wurde maßgeblich durch das damals europaweit vorherrschende *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis angetrieben. Entsprechend der insgesamt sinkenden Fallzahlen sanken seitdem auch die durch *S. Enteritidis* verursachten Infektionsfälle, was jedoch einem erneuten verstärkten Auftreten von *S. Typhimurium* als früherem Haupterreger humaner Salmonellosen in Deutschland den Weg zu bereiten scheint [15]. So gingen nach einem Bericht des Bundesinstitutes für Risikobewertung 2009 58% der 31397 gemeldeten Erkrankungen auf *S. Enteritidis* (2008: 62%) und 33% auf *S. Typhimurium* (2008: 30%) zurück, was laut European Food Safety Authority (EFSA) in etwa auch den Anteilen in der EU entspricht [16]. Der häufigste Phagentyp ist seit Mitte der 80er Jahre mit abnehmender Tendenz *S. Enteritidis* PT4 gefolgt von PT8 (in den USA vorherrschend) [17]. Auffällig dagegen ist das immer häufigere Auftreten einer monophasischen Variante von *S. Typhimurium* mit der Seroformel 4,5,12:i:-, der mittlerweile bereits 40% aller *S. Typhimurium* - Infektionen ausmacht und keine Phase 2 Flagellen (codiert durch *fljB*) exprimiert. Mittlerweile gehört diese monophasische Variante in vielen Ländern weltweit zu den zehn am häufigsten isolierten *Salmonella* Stämmen humaner Infektionen [18].

Ebenso besorgniserregend ist das zunehmende Auftreten multiresistenter (MDR) *Salmonella* Stämme, die erstmals in den 70er Jahren beschrieben wurden [19-21]. Häufig entwickeln sich Resistenzen in der Tierhaltung, und erst nach Übertragung dieser Stämme auf den Menschen lassen sich diese auch bei humanen Infektionen nachweisen [22-24]. Ein Beispiel hierfür ist die Einführung der Fluoroquinolone Mitte der 80er Jahre. Trotz des Einsatzes in der Humanmedizin in den Jahren zuvor verzeichnete man erst in Folge der Zulassung von Fluoroquinolonen für die Veterinärmedizin eine deutliche Zunahme resistenter *Salmonella* Stämme, so dass insbesondere die präventive Gabe von Antibiotika und der falsche bzw. übermäßige Einsatz von antimikrobiellen Agenzien in der Tiermast und -zucht als Ursache für das zunehmende Auftreten resistenter und multiresistenter Bakterien auch im Menschen anzusehen ist [25, 26]. Ein Beispiel für die Überlegenheit und starke Verbreitung multiresistenter Stämme ist *S. Typhimurium* DT104, der aufgrund der erworbenen Pentaresistenz (Ampicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazykline) zu einem der wichtigsten global vorkommenden Erreger geworden ist [27, 28]. Ebenfalls mit dem Einsatz von speziell für die

Tiermedizin entwickelten Antibiotika wie Ceftiofur wird das Auftreten multiresistenter *S. Newport* Stämme begründet, die auch gegen *extended spectrum* Cefalosporine resistent sind und zuerst in Rindern, später auch im Menschen auftraten [29, 30]. Von den 2009 vom NRZ für Salmonellen erfassten humanen *Salmonella* Isolaten waren bereits 30% mehrfachresistent. Dabei unterschieden sich die Serovare deutlich von 3% Mehrfachresistenzen aller *S. Enteritidis* Isolate bis zu 75% bei *S. Typhimurium* [31].

I.2.1. Infektionsquellen

Salmonellen wurden bislang aus einer großen Vielzahl verschiedener Tierspezies wie Säugtieren, Fischen, Vögeln, Reptilien, Insekten und dem Menschen isoliert [15, 32-35], sind aber aufgrund ihrer fakultativ aeroben und intrazellulären Lebensweise auch in der Lage, über längere Zeit in der unbelebten Umwelt also auf Oberflächen und in Gewässern zu überleben [36]. So ist es nicht verwunderlich, dass neben den üblichen Infektionsquellen wie rohes Fleisch, Milch und Eier [37] auch Früchte und Gemüse, die in Kontakt mit kontaminierten Küchengeräten kamen (Kreuzkontamination), zu *Salmonella* Ausbrüchen führten [38]. Diese vorübergehende Persistenz außerhalb eines Wirts ist letztendlich eine überlebenswichtige Eigenschaft von *Salmonella*, denn sie ermöglicht dem Stamm trotz z.T. nur kurzzeitiger Infektionsphasen und Bekämpfungsmaßnahmen durch die Immunabwehr und Antibiotika die langfristige Besiedlung eines bestimmten Lebensraums wie etwa eines Tierstalls. So sind Studien bekannt, bei denen derselbe *Salmonella* Stamm über Jahre hinweg trotz Desinfektionsmaßnahmen in Tierställen überleben konnte [39, 40]. Mangelnde Hygiene und fehlende Kontrollen in den Tierbeständen sind oft die Ursache für einen Befall ganzer Bestände. Hinzukommt, dass insbesondere *Salmonella* Serovare mit breitem Wirtsspektrum wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* in vielen Tieren lediglich zu einer latenten Infektion führen, die kaum klinische Symptome hervorruft und eine langanhaltende Ausscheidung der Salmonellen über den Kot und die damit verbundene Neuinfektion weiterer Tiere im Bestand ermöglicht [41-44].

Als natürliche Vektoren zur weiteren Ausbreitung auch über den Stall hinaus können sowohl Vögel als auch Insekten wie Fliegen dienen [45-47]. So zeigten Greenberg und Klowden, dass Hausfliegen (*Musca domestica*) nach vorheriger Inokulation mit *Salmonella* in der Lage sind, bis zu 10^7 Salmonellen auszuschleiden, und damit eine Dosis zu erzeugen, die zur Infektion von Tier und Mensch ausreicht [48].

Auch kontaminiertes Wasser gilt als häufige Infektionsquelle und ermöglicht die weitläufige Ausbreitung [49, 50]. So werden Salmonellen ständig durch Tiere und den Menschen in das

Wasser von z.B. Flüssen eingetragen und besitzen im Gegensatz zu anderen Pathogenen wie *V. cholerae* oder *S. aureus* eine relativ hohe Überlebensrate in diesem Umfeld [51].

Im Menschen erfolgt eine Infektion jedoch am häufigsten insbesondere mit *S. Enteritidis* durch den Verzehr von Geflügelfleisch, Eiern und damit assoziierten Nahrungsmitteln. Eine Stichprobenuntersuchung des BfR in Tierbeständen und Lebensmitteln 2009 ergab eine Prävalenz für *Salmonella enterica* ssp. in Hähnchenfleisch von 7,5% und Putenfleisch von 5,6%. In Schweinefleisch (2,5%) und Kalbsfleisch (0,5%) wurden deutlich seltener Salmonellen nachgewiesen. Bemerkenswert ist jedoch, dass insbesondere in Schweinehackfleisch, das häufig roh verzehrt wird, die Prävalenz mit 5% ähnlich hoch wie im Geflügelfleisch lag [15]. Unterschiede gibt es auch in den vorherrschenden Serovaren. So wurden bei Routineeinsendungen an das NRZ für Salmonellen aus Hähnchenfleisch insbesondere *S. Enteritidis* gefolgt von *S. Paratyphi B*, *S. Typhimurium* und *S. Infantis* isoliert, in Schweinefleisch dominiert dagegen *S. Typhimurium* und *S. 4,[5],12:i:-*, in Rindfleisch *S. Typhimurium* und *S. Dublin* [15, 16]. Damit konnten die wichtigsten Serovare humaner Infektionen auch an der Spitze kontaminierter tierischer Erzeugnisse gefunden werden.

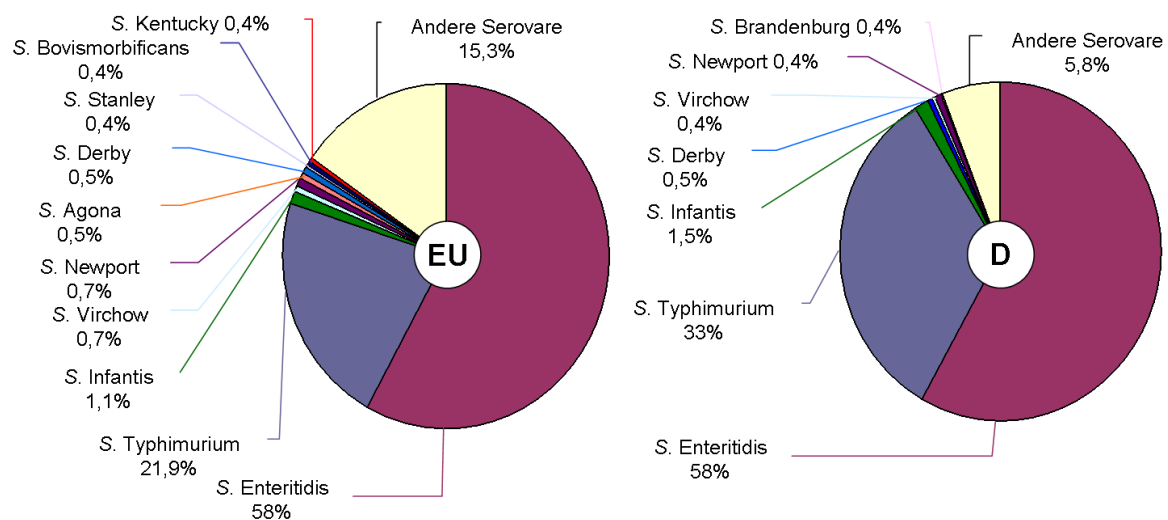


Abbildung 1: Verteilung der häufigsten Serovare humaner Infektionen in der EU 2008 (links) und in Deutschland 2009 (rechts). Modifiziert nach EFSA Report 1496 der EU (2010) [16] und dem Infektionsepidemiologischen Jahrbuch 2009 des RKI (2010) [31]

Auch Eier gehören zu den wichtigsten Infektionsquellen. Salmonellen gelangen meist über die Ovarien noch vor Bildung der Eierschale in die Eier und lassen sich später aufgrund des Schutzes der Schale nicht mehr beseitigen [52, 53]. Zwar wurden in nur 0,3% aller verkaufsfertigen Eier in Deutschland Salmonellen nachgewiesen, jedoch variiert diese Prävalenz stark allein in der EU bis zu 23% in der Slowakei [16]. Bemerkenswert sind zudem z.T. sehr hohe Prävalenzen in Tierbeständen. Dank geeigneter Kontrollmaßnahmen lag 2008 die *Salmonella* Prävalenz in Deutschland bei Legehennen bei 3,5%. In Masthähnchen-

beständen fand man jedoch die europaweit höchste Prävalenz von 23,1% und verzeichnete damit einen deutlichen Anstieg von 7% im Vorjahr.

Neben der oralen Übertragung von *Salmonella* über den Verzehr kontaminierter Lebensmittel und Flüssigkeiten sind auch Fälle bekannt, bei denen Menschen über Haustiere infiziert worden sind, die zuvor über die übliche Route Salmonellen aufgenommen haben [54-56]. Neben carnivoren Haustieren können auch Infektionen insbesondere bei Kindern mit Reptilien-assoziierten Serovaren infolge einer Reptilienexposition auftreten [31, 57, 58]. Mensch-zu-Mensch Übertragungen spielen in der Regel nur in Entwicklungsländern mit schlechten hygienischen Bedingungen eine Rolle.

I.3. Wirtsspezifität

Salmonella lässt sich entsprechend seiner Adaptation und des Vorkommens in bestimmten Wirtsspezies in folgende Kategorien einteilen [59]:

1. *Serovare mit breitem Wirtsspektrum*

Hierzu gehören ubiquitär vorkommende Serovare wie *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, die weltweit sowohl im Menschen als auch im Tier die größten Inzidenzen aufweisen. Somit stehen insbesondere Serovare mit breitem Wirtsspektrum für den Inbegriff des Zoonoseerregers.

2. *Wirtsadaptierte Serovare*

Diese Serovare zeigen eine hohe Prävalenz in bestimmten Wirtsspezies, kommen jedoch in seltenen Fällen auch in anderen Wirtsspezies vor. Beispiele hierfür sind *S. Choleraesuis*, klassischerweise ein Pathogen des Schweins, sowie *S. Dublin*, ein häufig aus Rindern isolierter Erreger, die in seltenen Fällen auch zu humanen Infektionen führen.

3. *Wirtsbeschränkte Serovare*

Als Untergruppierung der wirtsadaptierten Serovare gibt es solche, die bislang nur in bestimmten Wirtsspezies gefunden wurden und somit auf diese Spezies beschränkt zu sein scheinen. Dementsprechend findet eine Übertragung auch nur innerhalb dieser Spezies z.B. beim Menschen ohne tierischen Zwischenwirt statt. Wichtige Beispiele hierfür sind das Hühner-Pathogen *S. Gallinarum* mit seiner Variante *S. Pullorum*, das Schweine-Pathogen *S. Typhisuis* sowie die auf den Menschen beschränkten Serovare *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* und *C*.

I.3.1. *Salmonella* im Menschen

Für den Menschen gelten > 500 *Salmonella* Serovare als pathogen, gemeldet wurden seit 2001 in Deutschland auf Grundlage des Infektionsschutzgesetzes nur 24 [60]. Auf den Menschen beschränkte *Salmonella* Serovare sind vor allem *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* und *S. Sendai*, die schwere systemische Infektionen und enterisches Fieber verursachen. Sie kommen verhältnismäßig häufig in Entwicklungsländern vor, spielen jedoch in Industrienationen kaum mehr eine Rolle. Der Anteil an allen *Salmonella* – bedingten Erkrankungen lag z.B. 2005 in den USA bei < 1%, und meist sind diese Fälle mit Auslandsaufenthalten assoziiert [61, 62]. In seltenen Fällen treten Tier-adaptierte Serovare wie *S. Choleraesuis* (adaptiert an Schweine) oder *S. Dublin* (adaptiert an Rinder) auch bei menschlichen Infektionen auf und verursachen dann jedoch in hohem Maße schwere systemische Infektionen wie Bakteriämie [63] (siehe Tabelle 2).

Serovar	Isolate (Gesamt)	Isolate (Blut)	Ratio (in%)
Enteritidis	563.221	6.775	1,2
Typhimurium	183.542	2.692	1,5
Infantis	11.795	198	1,7
Typhi	4.636	2.825	60,9
Paratyphi A	3.125	1.727	55,3
Paratyphi B*	2.463	308	12,5
Paratyphi C	37	20	54,1
Choleraesuis	147	48	32,7
Dublin	1.283	530	41,3

Tabelle 2: An die Enter-net Datenbank übermittelte *Salmonella* Serovare mit Anzahl der Gesamtisolate und speziell aus dem Blut isolierten Stämme zwischen 1994 – 2004 sowie dem Quotienten dieser Werte. In weiß: Serovare mit breitem Wirtsspektrum, in gelb: human-adaptierte Serovare, in rot: Tier-adaptierte Serovare. * *S. Paratyphi B* dT+ führt zu Infektionen in Mensch und Tier, *S. Paratyphi B* dt- nur im Menschen. Modifiziert nach Wollin, 2007 [64]

Anhand von *S. Paratyphi B* zeigt sich, dass die Eingruppierung entsprechend der Wirt-adaptation nicht immer auf das Serovar als solches zutrifft, sondern manchmal weitere Unterteilungen nötig sind. Entsprechend des Kaufmann – White Schemas unterscheidet man d-Tatrat – fermentierende *S. Paratyphi B* (dT+) (ursprünglich *S. Java*), die gastrointestinale Erkrankungen im Menschen und vor allem in Hühnern hervorrufen, von d-Tatrat – nicht-fermentierenden *S. Paratyphi B* (dT-), die ausschließlich im Menschen zu systemischen Infektionen führen [65-68]. Nichtsdestotrotz verursachen auch in diesem Fall insbesondere die human-adaptierten dT- Stämme typhoidale Erkrankungen [69].

Wie oben bereits erwähnt, hängen die Schwere der Erkrankung und der pathologische Verlauf auch maßgeblich von der Konstitution der infizierten Person ab. So führen Immunsuppressionen durch Medikamente, Infektionen mit HIV und Operationen sowie ein noch nicht

ausgereiftes Immunsystem im Säuglingsalter, aber insbesondere auch die abnehmende Vitalität mit zunehmendem Alter eher zu systemischen Verläufen und einem tödlichen Ende [15, 70-73]. Zu der schwachen Immunabwehr älterer Menschen und Kleinkinder kommt meist eine schwache Magensäureproduktion, die die Magenpassage von *Salmonella* weniger stark einschränkt und zu höheren Dosen im Darm führt. Unter diesem Aspekt ist auch eine magensäurehemmende Medikation bei Krankenhauspatienten und Pflegebedürftigen als möglicher Risikofaktor zu beachten [74].

Die Infektionsdosis liegt bei einem Erwachsenen in der Regel bei 10^4 - 10^6 Keimen [75]. In Abhängigkeit des Lebensmittels, mit dem die Salmonellen aufgenommen wurden, variiert diese Zahl jedoch stark. So ist bekannt, dass bei Aufnahme in besonders fetthaltigen Nahrungsmitteln wie Käse, Schokolade und Eis die infektiöse Dosis bei nur 1 – 100 Keimen liegen kann [76-78]. Man geht davon aus, dass die Ummantelung der Salmonellen durch hydrophobe Lipid-Micellen sie wirksam vor der bakteriziden Wirkung der Magensäure schützt. Die Wirkung der Galle im Duodenum würde dann zu einer Freisetzung der Salmonellen führen und eine Besiedlung insbesondere des anschließenden Dünndarms ermöglichen.

Die Infektionsdauer liegt in Abhängigkeit der Dosis und des Serovars bei 6 – 72 Stunden, in der Regel jedoch bei 12 – 36 Stunden [60]. Die klassische Gastroenteritis geht primär einher mit Durchfall infolge der Darminflammation, teilweise Erbrechen, Unwohlsein, Kopf- und Magenschmerzen mit leichtem Fieber für die Dauer weniger Tage. Da sie lokal auf den Darm begrenzt sowie häufig selbstlimitierend ist, genügt im Normalfall die Prävention einer drohenden Dehydrierung. Eine stationäre Behandlung sowie der Einsatz von Antibiotika sind bei schwereren Verläufen mit hohem Fieber und Sepsis angezeigt, die in etwa 5% der Fälle vorkommen [13]. Auch ist eine Absiedlung in andere Organe möglich, was zu diversen Entzündungen als Cholezystitis, Endocarditis, Osteomyelitis, Pneumonie, Pyelonephritis oder Meningitis führen kann [79]. Folgeerkrankung kann z.B. eine reaktive Arthritis sein [80, 81]. Auch ein akutes Nierenversagen ist möglich. Die Gesamtlethalität liegt bei weniger als 0,1%. Die Ausscheidung von nicht-typhoidalen Salmonellen dauert bei Erwachsenen etwa einen Monat [82], bei Kinder unter 5 Jahren bis hin zu sechs Monaten [83]. Durch eine Antibiotika-Behandlung kann die Exkretion der Bakterien noch verlängert werden [84, 85]. Eine chronische Ausscheidung ist in Abhängigkeit des Alters insgesamt jedoch sehr selten. Die wenigen Studien dazu zeigten in keinem Fall *Salmonella* Exkretionen über die 67. Woche hinaus, nach neun Wochen konnten in 90% aller Fälle keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden [82, 86].

Im Gegensatz zur Gastroenteritis sind systemische Verläufe z.B. nach einer *S. Typhi* Infektion weit schwerwiegender. Die Infektionsdosis ist gering, die Inkubationszeit ist mit wenigen Tagen bis zu drei Wochen etwas länger als bei nicht-typhoidalen Infektionen. Zu den häufigsten Infektionsorten zählen das Ileum, Leber, Milz und die Gallenblase. Danach kommt es zu einer schweren, zyklisch verlaufenden Allgemeininfektion mit hohem Fieber und Unterleibsschmerzen [87]. Eine Diarrhoe tritt nur in etwa 1/3 der Fälle auf. Es können Organschäden an Darm, Herz, Leber, Niere und Galle auftreten; in schweren Fällen treten lebensgefährdende Symptome wie Darmperforationen, Septikämie oder Meningitis auf. Eine chronische Ausscheidung auch nach mehr als 12 Monaten tritt in 2-4% der Fälle und häufig in Kombination mit Gallensteinen auf [88, 89].

I.3.2. *Salmonella* im Schwein

Schweinefleisch ist eine der wichtigsten Infektionsquellen des Menschen. Da Salmonellen-Infektionen im Schwein nur selten zu Erkrankungen führen, die Tiere aber in einer klinisch inapparenten latenten Infektion als Träger fungieren [90], sind Infektionen von Schweinen mit *Salmonella* hinsichtlich der menschlichen Gesundheit von entscheidender Bedeutung.

Als auf das Schwein adaptierte Serovare gelten vor allem *S. Choleraesuis*, das auch im Menschen vereinzelt für Infektionen sorgt, und *S. Typhisuis*, deren Infektiösität auf das Schwein beschränkt zu sein scheint. Beide führen im Schwein zu septikämischen Allgemeininfektionen mit Zyanosen der Rüsselscheiben, Ohrmuscheln und der Bauchdecke.

Pneumonien, aber auch Durchfall, 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 [91].

Insbesondere in den 50er und 60er Jahren stellte *S. Choleraesuis* das dominante Serovar in Schweinen dar [92]. Seit dem Höhepunkt im Jahr 1958 sank die Prävalenz von *S.*

Choleraesuis – Infektionen stark, so dass es heute zumindest in Europa anders als in Nord-

Amerika oder Asien keine Rolle mehr spielt, Infektionen nur noch vereinzelt vorkommen [92-

96]. *S. Typhisuis* ist eng verwandt mit *S. Choleraesuis* [97, 98], unterscheidet sich jedoch phänotypisch und in der Pathogenese. Weltweit spielt *S. Typhisuis* nur noch eine untergeordnete Rolle. Aufgrund der schwierigen Isolation ist jedoch mit einer Grauzone zu rechnen. Ein Grund könnte im langsamen Wachstum liegen, das im Wirt zu einer langsam fortschreitenden chronischen typhoidalen Erkrankung führt, die meist innerhalb weniger Wochen tödlich endet [59].

Stattdessen treten vornehmlich Infektionen durch Breitspektrum-Serovare wie *S.*

Typhimurium und *S. Derby*, aber je nach Region auch *S. Agona* und *S. Infantis* auf [99, 100], die häufig asymptomatische oder lokale enteritische Infektionen ähnlich der humanen Salmonellose hervorrufen.

Die Übertragung erfolgt meist über die fäkal-orale Route, auch wenn eine Übertragung über Aerosole in Anbetracht sehr hoher Dosen im Kot infizierter Tiere von 10^6 *S. Choleraesuis* bzw. 10^7 *S. Typhimurium* pro Gramm Kot bereits experimentell nachgewiesen wurde [101-106]. Im trockenen Kot können Salmonellen bis zu 13 Monaten überdauern [43], was verdeutlicht, wie wichtig hygienische Maßnahmen in der Schweinezucht zur Restriktion von Transmissionen sind.

I.3.3. *Salmonella* im Huhn

Neben Schweinen tragen Hühner über ihr Fleisch und ihre Eier zu den meisten *Salmonella* Infektionen im Menschen bei. Die wichtigsten auf Geflügel beschränkten Serovare sind *S. Gallinarum*, der Erreger des Hühnertyphus, und seine Biovariante *S. Pullorum*, das zur Pullorum Krankheit bzw. der sogenannten weißen Kükenruhr führt. Die beiden Erreger wurden erstmals 1889 (*S. Gallinarum*; [107]) bzw. 1900 (*S. Pullorum*; [108]) beschrieben und gehörten um die Jahrhundertwende zu den wichtigsten Pathogenen der kommerziellen Geflügelhaltung, die aufgrund der hohen Mortalitätsraten zu großen Verlusten führten. Durch intensives Monitoring, der Schlachtung seropositiver Herden und verbesserter Hygienemaßnahmen, die von staatlicher Stelle (z.B. dem *Poultry Stock Improvement Plan* in Großbritannien oder dem *National Poultry Improvement Plan* der USA) koordiniert wurden, konnte die Prävalenz seit den 50er und 60er Jahren in den Industriestaaten stark reduziert werden [109]. Auch wenn die Erreger zwischenzeitlich nicht mehr in Westeuropa und Nordamerika auftraten [93, 110], so stellten sie jedoch stets ein Problem in asiatischen [111-114], afrikanischen [115, 116], mittel- bis südamerikanischen Ländern [117] sowie in Osteuropa [118] dar. Selbst in den bereits für *Gallinarum* / *Pullorum* - frei erklärten Staaten kommt es von Zeit zu Zeit wieder zu regional begrenzten Ausbrüchen, die vermutlich durch Wildvögel wie Enten, Wachteln und Papageien [119-121] sowie in kleinen Hobbyzuchten verursacht werden [122-129].

Obwohl *S. Pullorum* und *S. Gallinarum* eng verwandt und serologisch nicht zu differenzieren sind, gibt es doch entscheidende Unterschiede hinsichtlich ihres Stoffwechsels [130-132], in der Infektiosität sowie einigen pathologischen Details, so dass man sie mittlerweile als verschiedene Biovare eines Serovars *Gallinarum* behandelt [133-135]. So erfolgt z.B. die Übertragung und Infektion der Hühner mit *S. Gallinarum* überwiegend horizontal über die

fäkal-orale Route, während bei *S. Pullorum* auch die vertikale Transmission, also vom Elterntier während einer systemischen Infektion der Ovarien oder des Oviduktes vor Ausbildung der Eierschale auf das Ei, eine bedeutende Rolle spielt [136-138]. Für die Infektion durch *S. Pullorum* empfänglich sind im Gegensatz zur *S. Gallinarum*-Infektion eher junge Tiere mit einem Alter unter 4 Wochen [111]. Hühnertyphus durch *S. Gallinarum* ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer gelblich-grünen Diarrhoe 24 – 36 Std. vor Eintritt des Todes wohingegen *S. Pullorum* entsprechend der Bezeichnung „weiße Kükenruhr“ typischerweise eine weißliche Diarrhoe verursacht [139].

Im Gegensatz zu Mammaliern gelangen Salmonellen im Huhn über den Kropf, den Drüsen- und Muskelmagen als Äquivalent des Säugermagens in den Dünndarm, wo der Eintritt über diffus verteilte lymphoide Strukturen und Peyer´sche Plaques erfolgt. Besonders betroffen sind das Ileum, Caecum und die Caecaltonsillen als größtes sekundär lymphatisches Organ im Gastrointestinaltrakt des Huhns [140-142]. Bei systemischen Infektionen erfolgt von hier aus primär die Besiedlung weiterer lymphatischer Organe wie Milz, Leber und Knochenmark und später auch anderer Organe. Der systemische Verlauf geht mit einer Infiltration mononukleärer Zellen in die periportalen Bereiche der Leber, in das Myokard, in die Lunge und Niere einher, die letztendlich zu Nekrosen und Vergrößerungen der Organe führen. Die Tiere zeigen neben der oben beschriebenen Diarrhoe vor allem Appetitlosigkeit, Gelenkentzündungen, Atemnot und ein gesträubtes Gefieder, erscheinen kraftlos und abgemagert [143]. Meist sterben die Tiere innerhalb weniger Tage nach Eintritt der ersten Symptome. Die Mortalität ist mit bis zu 100% allgemein sehr hoch [132], jedoch zusammen mit der Suszeptibilität stark abhängig vom Stamm und dem genetischen Hintergrund des Huhns [144, 145]. Bei einem chronischen Verlauf beobachtet man häufig eine Reduktion der Fertilität sowie der Legeleistung [146], die Hühner weisen blasse, eingefallenen Kämmen und Entzündungen im Bereich der Ovarien auf [147].

Bei einer Infektion mit *S. Pullorum* kann die Erkrankung anfangs längere Zeit symptomlos verlaufen [148] und setzt dann unabhängig vom Geschlecht meist erst mit der sexuellen Reife ein. Ausschließlich bei Hennen kommt es dann auch zu einer Ausbreitung in den Reproduktionstrakt [149] und einer Reduktion der T-Zellzahl als Voraussetzung für eine vertikale Transmission [110].

Für den Großteil der *Salmonella* Infektionen im Huhn verantwortlich und dementsprechend für die Übertragung auf den Menschen am relevantesten sind heutzutage eher Breitspektrum-Serovaren. Wie auch beim Menschen gehörte *S. Typhimurium* insbesondere in den 50er bis Ende der 70er Jahre zum meist isolierten *Salmonella* Serovar in weiten Teilen der Welt [93,

150] und wurde dann durch *S. Enteritidis* größtenteils ersetzt [15, 16, 151]. Die Auswirkungen und Suszeptibilität einer Infektion sind stark vom Alter abhängig. Bei Küken mit einem Alter bis zu 12 Tagen reichen bereits geringste Dosen auf oralem Wege (~ 100 Bakterien), um eine Infektion hervorzurufen. Häufig kommt es dann auch bei diesen Seroaren zu systemischen Infektionen mit ähnlichen Symptomen wie bei *S. Gallinarum* / *Pullorum* und tödlichem Ausgang aufgrund von Anorexie und Dehydrierung in 2 - 10% der Fälle [152-154]. Mit zunehmendem Alter sinkt die Suszeptibilität und Infektionen verlaufen meist ohne klinische Symptome, obwohl eine Persistenz und Ausscheidung von Salmonellen über mehrere Monate durchaus möglich ist [155, 156]. Die Gefahr einer unauffälligen horizontalen Übertragung innerhalb der Herde und der späteren Kreuzkontamination während der Schlachtung ist dementsprechend hoch [157]. Erst im hohen Alter (etwa ab 55 Wochen) nimmt die Morbidität und Mortalität wieder zu [146, 158]. Wie *S. Pullorum* ist auch *S. Enteritidis* in der Lage, Eier während ihrer Entwicklung bereits im Huhn zu infizieren. Insbesondere äußerlich gesund erscheinende Legehennen stellen dann ein großes Problem dar [27].

Zusammenfassend können die Vertreter der *Salmonella enterica* Spezies also eine große Zahl verschiedener Wirtsspezies infizieren und besiedeln. Die Adaptation an bestimmte Wirte unterscheidet sich jedoch zwischen den Serovaren und scheint evolutionär eher hinderlich zu sein. Breitspektrum-Serovare führen allgemein eher zu milderer Erkrankungen, deren Grad in Abhängigkeit der Wirtsspezies, des Alters und der Immunkompetenz jedoch stark variiert. So verursachen *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* eher enterische Erkrankungen im Menschen. In Schweinen, Rindern und Hühnern verläuft die Erkrankung abhängig vom Alter asymptomatisch, enterisch, aber auch systemisch mit fatalem Ausgang. In Mäusen führt sie meist nach systemischem Verlauf zum Tode. Mit steigender Wirtsadaptation scheinen auch die Infektionen schwerwiegender zu verlaufen. So haben wirtsadaptierte Erreger wie *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* eher die Tendenz, systemische Infektionen auszulösen, die bei zufälligen Infektionen anderer Spezies auch erhalten bleibt. Ebenso lösen wirtsbeschränkte Serovare wie *S. Typhi* oder *S. Gallinarum* systemische Infektionen bei ihren Wirten aus; eine Infektion anderer Wirtsspezies ist jedoch nicht bzw. nur durch extrem hohe Dosen möglich. Welche Faktoren letztendlich zu einer Adaptation an eine bestimmte Spezies führen, somit also für einen evolutionären Vorteil in dieser speziellen Nische sorgen, ist bislang nur in Ansätzen geklärt. Auch die Gründe für die Ausprägung einer Erkrankung speziell bei Breitspektrum-Serovaren in verschiedenen Spezies sind kaum geklärt, da Spezies-übergreifende Arbeiten selten sind. Zu welchen Anteilen bakterielle Faktoren und Faktoren

des Wirtes letztendlich zur Adaptation und Pathogenese beitragen, ist dementsprechend spekulativ. Die Tatsache, dass ein und derselbe Stamm in unterschiedlichen Spezies nur aufgrund veränderter anatomischer, physiologischer und immunologischer Faktoren zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Infektion führen kann, legt die Fokussierung auf Wirtsfaktoren nahe. Es gibt zudem einige Arbeiten, die darauf hindeuten, dass insbesondere Faktoren des Wirtsimmunsystems in einer frühen Phase der Infektion dabei eine entscheidende Rolle spielen könnten.

I.4. Immunologische Grundlagen

I.4.1. Die intestinale Immunabwehr

Die Funktion des Darms besteht primär in der Aufnahme von Wasser, Nährstoffen und Elektrolyten aus dem intestinalen Lumen. Aufgrund des starken Austausches von Substanzen und der damit verbundenen direkten Kontaktfläche zur Außenwelt, kommt er zwangsläufig mit einer Vielzahl potentiell pathogener Bakterien in Kontakt, deren Eindringen es trotz der Durchlässigkeit für diverse Moleküle zu verhindern gilt. Somit bilden die Epithelzellen des Darms eine streng regulierte selektiv permeable Barriere am äußersten Rand der Mukosa. An dieses Epithelium schließt eine lockere Gewebsschicht, die Lamina Propria, und eine dünne Schicht glatter Muskulatur (*muscularis Mukosae*) als Übergang zur Submukosa an [159]. Um die absorptive Oberfläche zu vergrößern, bildet die Mukosa Villi in das Lumen, die im Kern durch eine Arteriole und einen lymphatischen Kanal an das Blut- und Lymphsystem angeschlossen sind. So kommt es im Dünndarm zur effizienten Aufnahme von Nährstoffen, was ihn jedoch auch für Infektionen durch invasive Bakterien prädestiniert. Der Dünndarm lässt sich anatomisch in das Duodenum, das Jejunum und das Ileum einteilen. Mit etwa 90% der Absorption im 1. Meter des Dünndarms ist der proximale Teil am aktivsten [159]. Die Bakteriendichte nimmt dagegen aufgrund der Darmperistaltik und des geringeren Durchmessers des Dünn- im Vergleich zum Dickdarm sowie der damit verbundenen hohen Fließgeschwindigkeit mit durchschnittlich 100 Bakterien / g Darminhalt im proximalen Ileum bis zu 10^{12} Bakterien / g im Colon deutlich zu [160]. Mit rund 400 verschiedenen Bakterienpezies ist die Mikrobiota des Darms dazu sehr divergent. 99% der Mikrobiota werden jedoch durch nur 30 – 40 dominierende Spezies der Gattungen *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* und einigen Gram-positiven Kokken gebildet. *Enterobacteriaceae* kommen normalerweise nur in geringen Zahlen vor [160].

Den Hauptanteil der eukaryotischen Zellen im intestinalen Epithel stellen absorptive

Enterozyten, die auf der apikalen Seite eine Glykokalyx und einen Bürstensaum, die sogenannten Mikrovilli, bilden. Sie werden kontinuierlich aus Stammzellen in der unteren Hälfte der Krypten gebildet und reifen auf ihrem Weg in Richtung des Villus Apex aus [161]. Die Zellen besitzen eine bestimmte strukturelle wie auch funktionelle Polarität, die u.a. auf der unterschiedlichen Ausstattung der basolateralen und apikalen Membran mit Membranproteinen wie Rezeptoren und Transportern beruht. Um die unkontrollierte parazelluläre Diffusion zu unterbinden, wird der Bereich zwischen den Enterozyten durch den *apical junction complex* verschlossen. Ein Teil davon, die *tight junction*, dichtet am äußersten apikalen Bereich zwischen zwei Enterozyten ab und dient zudem der Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzellen, indem sie die freie Diffusion der Membranproteine zwischen der apikalen und basalen Seite unterbindet. Neben den Enterozyten kommen im Darmepithel eingelagerte Schleim-produzierende Goblet-Zellen vor, die ebenfalls für die Pathogenabwehr bedeutend sind. Ihre Zahl nimmt in distaler Richtung entlang des Darms entsprechend der Besiedlung mit Bakterien zu [162]. Sie exprimieren Mucin Glykoproteine, welche im endoplasmatischen Reticulum stark glykosyliert werden und nach der Sekretion zusammen mit Trefoil Peptiden eine Schleimschicht über dem Epithel bilden [163]. Diese Schicht kann aufgrund ihres Kohlenhydratreichtums als Bindungsstelle, Kohlenstoff- und Energiequelle für kommensale Bakterien aber auch Pathogene dienen, die an die Schleimschicht binden und diese durch Abbau oder Inhibition der Mucin-Expression überwinden [164, 165].

Ebenfalls erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die sekretorischen Paneth-Zellen, die ausschließlich in den Krypten des Dünndarms vorkommen [165]. Ihre Granula enthalten eine Reihe antimikrobieller Substanzen wie Lysozym, Phospholipase A₂, Cathelicidin und Defensine, die sich nach der Sekretion im Lumen der Krypten konzentrieren und die dort ansässigen Stammzellen vor Infektionen schützen [166, 167].

Zu den wichtigsten lymphatischen Strukturen des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) gehören die Peyer'schen Plaques (PP) und die daran angeschlossenen mesenterialen Lymphknoten (MLN). PP kommen im Menschen überwiegend im Ileum vor und setzen sich aus distinkten Zonen mit B- und T-Zellen sowie Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) zusammen [159]. Sie sind ausschließlich an efferente Lymphgefäße angeschlossen, die Antigen-signale aus dem direkt darunterliegenden Follikel-assoziierten Epithel (FAE) an die MLN übertragen. Neben den PP kommen im Dünndarm auch isolierte lymphatische Follikel vor, die jedoch keine T-Zell Zonen aufweisen [168-170]. Im Schwein gibt es zwei Arten von PP, die sich über das Jejunum und das proximale Ileum erstrecken [171]. Während die jejunalen PP ein Leben lang im Schwein vorkommen, verschwinden die ileocaecalen PP nach

etwa einem Jahr. Auch in ihrer Zusammensetzung und Verteilung aus verschiedenen Populationen an T- und B-Zellen unterscheiden sich die beiden PP deutlich voneinander. Die immunologische Relevanz ist jedoch bislang ungeklärt. Das Huhn besitzt zwar keine Lymphknoten, wie man sie vom Menschen kennt, weist aber im Bereich des Darms diffuse lymphatische Strukturen und PPs auf, die denen des Schweins und Menschen ähneln [172, 173].

Neben Enterozyten sind spezialisierte (*microfold-*) M-Zellen Bestandteil des FAE im Menschen, im Schwein und im Huhn [174, 175]. Diese Epithelzellen sind auf die Aufnahme luminaler Antigene durch Endozytose mit anschließender Präsentation an Immunzellen der Peyer'schen Plaques ausgerichtet. Im Gegensatz zu herkömmlichen Enterozyten weisen M-Zellen auf ihrer apikalen Oberfläche wenige Transporter zur Nährstoffaufnahme und keine hydrolytischen Enzyme auf, besitzen verhältnismäßig kurze Microvilli und eine sehr dünne Schleimschicht, die eine leichtere Endozytose von Antigenen und Bakterien ermöglicht [176, 177]. Diese Partikel werden dann auf der basalen Seite wieder exozytiert, durch Makrophagen sowie DCs aufgenommen und entsprechende inflammatorische Signale und Abwehrmechanismen induziert. DCs gehen meist aus zirkulierenden Monozyten hervor und gelangen entlang eines durch Epithelzellen konsitativ aufrechterhaltenen Chemokin-Gradienten aus CCL20 (MIP-3 α) und CCL9 (MIP-1 γ) in die Mukosa [178]. Dort kommen sie entweder stationär in der Lamina Propria vor und erfüllen infolge fehlender costimulatorischer Faktoren meist Toleranz-Funktionen oder migrieren nach Antigen-Aufnahme zu den PP oder MLN, um sie dort T- und B-Zellen zu präsentieren [179, 180]. Neben der Bindung von Antigenen nach Transzytose durch M-Zellen oder dem Eindringen auf parazellulärem Wege können DCs ihre Pseudopodien auch durch die Epithelschicht ins intestinale Lumen ausstrecken und damit Bakterien direkt aus dem Darminhalt aufnehmen [181]. Dabei formen sie selbst *tight junction* – ähnliche Strukturen, die ein Aufbrechen der Barrierefunktion verhindert [182].

Ein weiterer wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems sind polymorphonukleäre Granulozyten (PMNs). Normalerweise kommen diese Zellen selten in der intestinalen Mukosa vor. Jedoch ändert sich das während einer Inflammation. Die Funktion der Neutrophilen scheint sich dabei deutlich zwischen den beiden Krankheitsbildern der Salmonelleninfektion zu unterscheiden. Während einer Enterocolitis kommt es infolge der Sekretion der Chemokine IL-8 (CXCL8) und ENA-78 (CXCL1) durch intestinale Epithelzellen zu einem massiven Influx von Neutrophilen in die Lamina Propria [183, 184]. Diese phagozytieren die Pathogene und töten sie intraphagosomal u.a. durch α -Defensine, Lysozym, saure Hydrolasen, *bactericidal permeability inducing protein* (BPI) und reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS) ab,

was zur lokalen Begrenzung der Infektion, durch die Sekretion der Sauerstoffspezies jedoch auch zu einer Gewebeschädigung beiträgt. Aufgrund der kurzen Lebensdauer der Neutrophilen unter Einleitung von Apoptose kommt es letztlich zur Auflösung der Infektion [185, 186]. Insbesondere bei systemischen Erregern hat man jedoch diesen massiven Influx zumindest im Mausmodell nicht festgestellt. In diesem Fall scheinen die Neutrophilen ohne ihre bakteriozide Funktion eher als Vektor zu fungieren und damit eine zuträgliche Funktion für *Salmonella* zu übernehmen. Einige Pathogene können die Induktion der Apoptose verzögern bzw. überleben und im Sinne eines „Trojanischen Pferdes“ in phagozytierende Makrophagen überführt werden, die dann als Vehikel für die Ausbreitung der Infektion dienen [187, 188]. Beispielsweise umgeht *S. Typhi* den *oxidative burst* zur Bildung von ROS [189]. In Hühnern wird diese Funktion der Neutrophilen in ähnlicher Weise durch Heterophile ausgeführt.

Im Darm bilden die PP den Knotenpunkt zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Sie sind die wichtigste Stelle zur Sammlung von Antigeninformationen und spielen eine zentrale Rolle in der Entsendung von Lymphozyten sowie inflammatorischen Signalen [190-193]. Lymphozyten des Darms lassen sich entsprechend ihrer Lokalisation in intraepitheliale und Lamina Propria Lymphozyten einteilen. Die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) sind überwiegend T-Zellen mit Gedächtnischarakter und lassen sich entsprechend ihrer Oberflächenrezeptoren in Typ A und B einteilen [194]. Typ A entspricht den konventionellen T-Zellen mit $\alpha\beta$ - T-Zell Rezeptoren (TCR) und CD4 oder CD8 $\alpha\beta$, erkennt MHC-abhängig körperfremde Antigene und wirkt dann häufig zytotoxisch. Zu den Typ B Zellen gehören solche mit $\alpha\beta$ TCR CD8 $\alpha\alpha$, $\gamma\delta$ TCR CD8 $\alpha\alpha$ oder doppelt negativen $\gamma\delta$ TCR, deren Aktivierung unabhängig von MHC ist [159, 195, 196]. In der Regel überwiegen CD8⁺ Zellen unter den IEL. Welche Rolle sie im Darm spielen, ist bislang erst ansatzweise untersucht und hängt wahrscheinlich vom jeweiligen Aktivierungsgrad des Immunsystems ab [197-199]. Doch deuten einige Veröffentlichungen auf ihre Funktionen in der Homeostase, der Pathogenabwehr und der Krebs-Überwachung hin [196, 200].

Im Gegensatz zu den IEL ist der B-Zell – Anteil unter den Lymphozyten der Lamina Propria deutlich größer. Nach ihrer Aktivierung migrieren B-Zellen meist über lymphatische Gefäße zu den MLN, wo sie weiterhin stimuliert werden und letztendlich wieder über die Blutgefäße in die Lamina Propria gelangen. Dort differenzieren sie dann zu Plasmazellen aus, die IgA sekretieren [160]. IgA lässt sich in die Subtypen IgA1 und IgA2 einteilen, von denen das IgA2 meist als Dimer an mukosalen Oberflächen dominiert. Das IgA wird basolateral an intestinalen Epithelzellen über polymere Immunglobulin-Rezeptoren (pIgR) gebunden und

FcR-abhängig durch die Zelle auf die apikale Seite transportiert, um dort vom Rezeptor proteolytisch getrennt und als sekretorisches IgA-Dimer im Lumen aktiv zu werden [201, 202]. Bei Hühnern ist darüber hinaus auch die Freisetzung von IgA über den Leber-Gallen-Weg direkt in den proximalen Dünndarm möglich [203]. IgA kann im Lumen diverse Funktionen haben, die von der Neutralisierung toxischer Substanzen über die Blockade der Adhäsion von Pathogenen bis zur Maskierung proinflammatorischer Epitope wie LPS an Kommensalen reichen [204-206]. Die T-Zellen der Lamina Propria ähneln stärker als die IEL denen im Blut und weisen meist $\alpha\beta$ TCR (95%) sowie CD4- oder CD8-Rezeptoren auf, wobei CD4⁺ Zellen überwiegen (60-70%) [207]. Naïve CD4⁺-T-Zellen werden nach ihrer initialen Aktivierung meist pluripotent und sekretieren sowohl die Zytokine IL-4 zur Unterstützung der humoralen Immunantwort und IFN γ für eine effiziente zelluläre Immunreaktion. Infolge kontinuierlicher Stimulation übernehmen sie festgelegtere Funktionen und sekretieren als Th1-Zellen größtenteils IFN γ oder als Th2-Zellen IL-4 und IL-13 mit einer eher pro- bzw. anti-inflammatorischen Wirkung [208].

Auffällig bei den Lamina Propria T-Lymphozyten ist der große Anteil regulatorischer T-Zellen wie CD25⁺ CD4⁺ Tr-Zellen, CD4⁺ Th3-Zellen, CD4⁺ Tr1-Zellen und CD8⁺ „suppressor“ T-Zellen [209-211]. Durch die Sekretion diverser Zytokine, vor allem IL-4, IL-10 und TGF β , üben sie ihre regulatorische Funktion in der Lamina Propria aus und wirken suppressierend auf die Aktivierung von Makrophagen [212, 213]. Eine erhöhte Hemmschwelle zur Aktivierung im Gegensatz zu Blut-Lymphozyten verhindert zudem eine zu schnelle Reaktion auf die zahlreichen harmlosen luminalen Antigene [214].

I.4.2. Intestinale Epithelzellen

Epithelzellen des Darms sind eine der ersten Zellen, mit denen *Salmonella* bei einer Infektion in Kontakt kommt und die für die frühe Immunantwort und damit der weiteren Ausbreitung der Infektion und Pathogenese von Bedeutung sind. Zusätzlich zu ihrer Barrierefunktion und ihrer Rolle beim Transport von Ionen, Nährstoffen und Antigenen können sie auch die Immunantwort entscheidend beeinflussen. Sie besitzen ähnlich wie Makrophagen eine Reihe von *pattern recognition receptors* (PRRs), die bei Bindung bakterieller oder viraler Produkte verschiedene Signalkaskaden aktivieren, welche in der Expression und Sekretion inflammatorisch und regulatorisch wichtiger Stoffe wie Zytokine und Chemokine münden [215]. Bislang wurde beschrieben, dass Epithelzellen des Colons bei einer bakteriellen Infektion u.a. mit einer Induktion der Chemokine IL-8 [216, 217], CCL20 [218] und MCP-1 [219] sowie der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6, IL-18, TGF β [219-222] und des Wachstumsfaktors GM-CSF

reagieren [219]. Selbst erkennen sie eine Reihe von Zytokinen wie TNF α [223], IL-1 [224, 225], IL-4 [226], IL-6 [227], IFN γ [228] und TGF β 1 [229], die u.a. die Defensin-Bildung stimulieren. Z.T. widersprüchliche Ergebnisse in diesem Rahmen deuten jedoch darauf hin, dass die Frage der Zytokinexpression und -sekretion von intestinalen Epithelzellen bei bakteriellen Infektionen schwer zu verallgemeinern ist und häufig von den verwendeten Zelllinien, Pathogenen und Infektionsdauern abhängig ist. So fanden Jung *et al.* z.B. keine erhöhte Expression von IL-1, -2, -4, -5, -6, -10, -12p40 und TGF β 1 bei einer *S. Dublin* Infektion von T84-Zellen, wohingegen Bahrami *et al.* deutliche Induktionen von z.B. IL-1 α , IL-6 und TGF β in HT-29 Zellen bei *S. Typhimurium* Infektion zeigte, Foster *et al.* bei Caco-2 Zellen wiederum keine IL-1, jedoch eine TGF β 1 Induktion erkannten [219, 222, 230]. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass intestinale Epithelzellen neben den klassischen Immunzellen aktiv zu einer Immunantwort während einer Infektion beitragen und die Migration beispielsweise von T-Zellen, Makrophagen und PMNs koordinieren [231, 232]. Zudem produzieren sie Leukotriene und Prostaglandine, die zur Aktivierung der NO-Synthase in Makrophagen als wichtigem Faktor der Pathogenabwehr beitragen. Nicht zu vernachlässigen ist auch die epitheliale Funktion zur Toleranz von Kommensalen im Darm [233]. So führen nicht-pathogene Bakterien eher zu einer Induktion der Zytokine TGF β und IL-10, welche eine dämpfende und regulatorische Funktion in der Immunreaktion ausüben [234, 235]. Von Laktobazillen ist zudem bekannt, dass sie die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF α inhibieren [235].

Um die Einwanderung aktivierter Neutrophilen und die damit verbundene Gewebszerstörung zu mindern, können intestinale Epithelzellen anti-inflammatorische Lipide, sogenannten Lipoxine, sekretieren, die zudem die Apoptose von Neutrophilen und deren Abbau durch Gewebsmakrophagen fördern [236]. Damit tragen sie entscheidend zur Beendigung inflammatorischer Vorgänge im Darm bei.

Desweiteren vermögen intestinale Epithelzellen, direkt über die Expression von MHC (*major histocompatibility complex*) Molekülen der Klasse I und II, CD1d, MICA/MICB Antigene an T-Zellen zu präsentieren [237]. Während einer Inflammation wird die Expression von MHC II sogar noch erhöht und steigert damit die Antigenpräsentation [238]. Da sie jedoch auch nur unter inflammatorischen Bedingungen die erforderlichen kostimulatorischen Faktoren wie CD86 oder reifes IL-18 zur Aktivierung naiver T-Zellen exprimieren, bleibt ihre Wirkung meist auf Gedächtnis – T-Zellen beschränkt [221, 239].

I.4.3. Intestinale Makrophagen

Der gastrointestinale Trakt beinhaltet den größten Pool an Makrophagen im gesamten Körper und weist neben dem Knochenmark die größte Makrophagen-Dichte auf [240]. Monozyten sind die Vorläuferzellen sowohl von intestinalen Makrophagen als auch dendritischen Zellen und gehen selbst aus Stammzellen des Knochenmarks hervor [241, 242]. Nach einer rund 72-stündigen Zirkulation im Blutkreislauf wandern die Monozyten in die intestinale Mukosa ein. Für die Differenzierung in Gewebsmakrophagen mit spezifischen Funktionen ist letztendlich die Mikroumgebung im jeweiligen Gewebe ausschlaggebend. So sekretieren intestinale Epithelzellen und Mastzellen unter normalen Bedingungen z.B. TGF β , was eine Differenzierung hin zu nicht-inflammatorischen Makrophagen fördert [243]. Strategisch günstig in direkter Umgebung eines riesigen Antigen-Reservoirs kommen Makrophagen auch in der Lamina Propria vor. Ähnlich wie zuvor für die intestinalen Epithelzellen beschrieben, fehlen diesen intestinalen Gewebsmakrophagen unter normalen Bedingungen häufig kostimulatorische Faktoren wie CD14, CD40, CD80 oder CD86 [243-245]. So sind sie vor allem phagozytisch aktiv, bauen fremde Zelltrümmer sowie apoptotische Zellen ab und spielen damit eine wichtige Rolle in der Gewebserneuerung [246], stellen jedoch weniger klassische Antigen-präsentierende Zellen (APC) mit der Fähigkeit zur Aktivierung naiver T-Zellen dar [245, 247]. Entsprechend unterbleibt auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Obwohl sie eine Reihe von Rezeptoren für Chemokine wie IL-8 und TGF β exprimieren, scheinen sie zudem nicht auf die entsprechenden Signale durch Chemotaxis zu reagieren [248]. Da intestinale Gewebsmakrophagen nicht migrieren und auch nicht proliferieren [243], Studien über Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease* - IBD) jedoch einen großen Pool an CD14⁺- Makrophagen in der Darmmukosa nachwiesen [249, 250], liegt der Schluss nahe, dass während einer Inflammation der Pool von residierenden Gewebsmakrophagen massiv von Monozyten aus dem Blut ergänzt wird [243, 250]. Dabei reagieren die Monozyten chemotaktisch besonders auf CC-Chemokine, die von intestinalen Epithel- und Endothelzellen sekretiert werden. Neben möglicher anderer Faktoren führt die Anwesenheit von TNF α und IFN γ im entzündeten Gewebe, die eine inhibitorische Wirkung auf den TGF β / Smad Signalweg in Monozyten ausüben [251, 252], zu einer Inhibition der Differenzierung, wie sie zuvor für die intestinalen Gewebsmakrophagen beschrieben wurde. Damit erhalten die Monozyten neben den Rezeptoren für Komplementfaktoren, IgG und CD14 auch ihr Potential zur Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-12p40 und TNF α [253]. Die zusätzliche Erhöhung der Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 für die Erkennung bakterieller Oberflächenstrukturen [254] und der

kostimulatorischen Faktoren CD40, CD80 und CD86 ermöglicht eine starke Stimulation von Zellen des adaptiven Immunsystems wie T- und B-Lymphozyten [255]. Darüberhinaus besitzen diese Monozyten im Gegensatz zu herkömmlichen intestinalen Gewebsmakrophagen TREM-1 (*triggering receptor expressed on myloid cells-1*), das zur Synthese von zytotoxischen reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Stickstoffmonoxid (NO) notwendig ist [256]. So wird z.B. das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* deutlich durch die Synthese von NO beeinträchtigt [257, 258]. Die zusätzliche Synthese von Defensinen, Hydrolasen, Lysozym, dem Eisen-Entzug durch Lactoferrin oder NRAMP-1 sowie die Ansäuerung des Phagosomens führen letztlich zum effizienten Abtöten der phagozytierten Pathogene. Insgesamt übernehmen Makrophagen also eine Vielzahl von Funktionen, indem sie durch die Sezernierung diverser Wachstumsfaktoren für die Gewebserneuerung sorgen, über die Bildung von Leukotrienen und Prostaglandinen die Entzündungsvorgänge beeinflussen, andere Immunzellen über die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen anlocken und stimulieren, Pathogene phagozytieren und intrazellulär abtöten.

I.4.4. Pathogenerkennung

Der erste Schritt zur Abwehr eines Pathogens ist seine Erkennung. Als Teil des angeborenen Immunsystems verfügen intestinale Epithelzellen und Makrophagen über ein Arsenal verschiedener Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen bzw. ihrer Bestandteile (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), die allgemein als *pathogen recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden. Neben löslichen Rezeptoren wie dem Mannan-bindenden Lektin (MBL) und dem LPS-bindenden Protein (LBP), die überwiegend von Hepatozyten sezerniert und der Opsonisierung bzw. Komplementaktivierung dienen, sind für die zelluläre Immunabwehr insbesondere zellständige Rezeptoren von Bedeutung. Zu diesen zählen zum Einen die für die Bindung und Phagozytose von Mikroorganismen notwendigen phagozytären Rezeptoren wie Scavenger-Rezeptoren oder Makrophagen-Mannose-Rezeptoren auf Makrophagen, DCs und Neutrophilen als auch Rezeptoren, die bei Ligandenbindung intrazelluläre Signalkaskaden induzieren wie Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), Nod-ähnliche Rezeptoren (NLR), Dektine, RIG-ähnliche Rezeptoren (RLR) und DNA-Rezeptoren [259]. Da sowohl TLRs als auch NLRs von intestinalen Epithelzellen und Makrophagen exprimiert werden und in der intestinalen Pathogen-Erkennung in der Literatur als bedeutsam beschrieben wurden [259], sind diese Rezeptoren in der Folge näher beschrieben und während dieser Arbeit adressiert worden.

I.4.5. Pathogen-associated molecular patterns (Flagellin, Peptidoglycan, LPS)

Neben Nukleinsäuren gehören insbesondere Moleküle wie LPS, Peptidoglycan oder Flagellin, die mit der bakteriellen Zellwand assoziiert sind und in Eukaryonten nicht vorkommen, zu den wichtigsten Pathogen-Erkennungsfaktoren für das Wirtsimmunsystem.

Ein großer Teil der Gram-negativen Zellwand besteht aus Lipopolysacchariden (LPS). Diese sind zusammengesetzt aus einer Lipid A Region, die in der äußeren Membran verankert ist, einem Kernoligosaccharid und einem O-spezifischen Polysaccharid (O-Antigen) [260]. Dabei unterscheiden sich *Salmonella* Serovare insbesondere in der Länge des O-Antigens. Diese bestimmt nicht nur den Phänotypen (glatte oder raue Isoformen) sondern auch die Resistenz gegenüber dem Komplementsystem [261-265]. Für die Erkennung des LPS durch eukaryotische TLRs ist jedoch insbesondere das hochkonservierte Lipid A (auch Endotoxin) von Bedeutung [266, 267]. Da es eine Vielzahl von Variationen des O-Antigens gibt, wurde eine möglicherweise Serovar-spezifische LPS-Erkennung hier nicht untersucht.

Peptidoglycan (PGN) oder Murein ist ein weiterer Bestandteil der Zellwände sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien und damit hervorragend für Wirtserkennungsmechanismen geeignet. Es besteht aus N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) und N-Acetylmuramylsäuren (MurNAc), die miteinander β -(1-4)-verknüpft und über kurze Peptide an der MurNAc zudem quervernetzt sind. Deren Aminosäuren kommen abwechselnd in der D- oder L-Form vor. Wie alle Gram-negativen besitzt *Salmonella* an der dritten Stelle des Peptids eine *meso*-Diaminopimelinsäure (m-DAP).

Im Wirt kann Peptidoglycan zum einen durch *peptidoglycan recognition proteins* gebunden werden, die sowohl intra- als auch extrazellulär vorkommen und von denen in Säugern bislang vier Klassen bekannt sind (PGRP-L, -S, -I α , -I β bzw. PGLYRP1-4) [268]. Im Gegensatz zu den Insekten wird den Säuger-PGRPs jedoch eher eine neutralisierende und effektorische Wirkung als eine signaltransduzierende zugesagt [269]. Da zudem die Expression und Funktion von PGRPs im Schwein und vor allem im Huhn kaum untersucht sind, wurden sie in dieser Arbeit nicht adressiert.

Ausschließlich intrazellulär kann Peptidoglycan zudem durch die NLRs NOD1 und NOD2 gebunden werden und aktiviert dadurch eine Signalkaskade, die über NF- κ B vorwiegend zur Expression proinflammatorischer Zytokine führt [270]. So erkennt NOD1 Peptidoglycan-Motive, die m-DAP enthalten, wohingegen NOD2 weniger spezifisch Muramyl-dipeptide (MDP) bindet, die in allen Bakterien zu finden sind. Neben der naheliegenden Relevanz dieses Mechanismus für intrazellulär persistierende Pathogene wie *Shigella* oder *Salmonella* rückten durch Aufdeckung wirtsseitiger Transporter für Peptidoglycan und dessen

Fragmenten, sogenannten Muropeptiden, auch extrazelluläre Pathogene in den Fokus der Forschung. So wurde in humanen intestinalen Epithelzellen gezeigt, dass die Aufnahme von Peptiden wie MDP über ein apikal vorkommendes Transmembranprotein hPepT1 möglich ist und zur Aktivierung eines NOD2-abhängigen Signalweges führt [271], während Swaan *et al.* den Transport von γ -iE-DAP durch den transmembranären Transporter hPepT2 in humanen Lungene epithelzellen nachwies, der zu einer NOD1-abhängigen Sekretion von IL-6 und IL-8 führte [272]. 2009 deuteten Lee *et al.* außerdem auf eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von Peptidoglycan hin, die ebenfalls eine Aktivierung von NOD bewirkt [273]. Zudem wurde gezeigt, dass einige Bakterien wie *E. coli*, *N. gonorrhoeae* und *Shigella* im Laufe ihrer Peptidoglycan-Remodellierung Muropeptide vor allem im Periplasma akkumulieren, z.T. jedoch auch ausscheiden, so dass eine Erkennung nicht notwendigerweise direkt am Bakterium bzw. in Abhängigkeit eines Verdaus erfolgen muss [274-276]. Diese Exkretion konnte durch Deletionen bakterieller Gene für das Peptidoglycanrecycling (*ampG*, *mppA*) noch verstärkt werden [274]. Für *H. pylori* wurde sogar eine aktive T4SS-abhängige Injektion von PGN in das Wirtszellzytosol gezeigt, was neben der Funktion des Peptidoglycan für die Wirtszelle auch eine nützliche Rolle für das Pathogen nahelegt [277]. Dass Peptidoglycan nichtsdestotrotz auch intrazellulär hydrolysiert wird, zeigten Quintela *et al.* in Epithelzellen [278]. Woher jedoch die verantwortliche Amidase stammt, ist unklar. Möglicherweise könnte hier eine Wechselwirkung mit der Amidaseaktivität einiger PGRPs zum Tragen kommen. Ebenso ungeklärt ist die Frage, wie die Fragmente im Falle von *Salmonella* letztendlich die Membranen der SCV überwinden, um so im Zytosol erkannt zu werden. Betrachtet man jedoch eine Population infizierter Immunzellen, so wird es immer einige geben, in denen *Salmonella* nicht überlebt hat und so Opfer eines Verdaus geworden ist, der zu der beschriebenen NOD-Erkennung führt und damit ausreicht, insgesamt zu einer Inflammation zu führen. Wie wichtig der Verdau von Bakterien in Immunzellen für die NOD-Aktivierung und die Einleitung inflammatorischer Maßnahmen ist, zeigte eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, die Peptidoglycan-Polymeren infolge eines lysosomalen Abbaus eine stärker aktivierendere Wirkung nachwies als Monomeren wie MDP [279].

Eine membranständige Komponente motiler Bakterien sind die Flagellen. Sie sind größtenteils aus 55 kDa großen Flagellin-Monomeren, codiert durch die Gene *fljC* und *fljB*, zusammengesetzt [280]. Bakteriellies Flagellin wird jedoch nicht nur in Flagellen eingebaut, sondern auch durch *Salmonella* SPI1-abhängig als Effektor in die Wirtszelle sekretiert. Dadurch kann es sowohl extrazellulär auf TLR5 als auch intrazellulär auf die NLRs Ipaf

(NLRC4) und NAIP5 wirken [281-283]. In mehreren Veröffentlichungen wurde es als starker Aktivator der Inflammation polarisierter Epithelzellen beschrieben [284, 285].

Inwiefern die Expression von Flagellin und die Ausbildung von Flagellen für *Salmonella* günstig sind, ist umstritten und dürfte auch stark von der Infektionsphase abhängen. So wurde beschrieben, dass Salmonellen SPI-2 abhängig eine Transzytose von Flagellin auf die basolaterale Seite epithelialer Zellen induzieren und somit eine Inflammation unabhängig von der Invasion stimulieren [286]. Zudem erfolgt nach einer Infektion von Makrophagen SPI-1 abhängig eine Sekretion von Flagellin in das Zytosol, um pyroptotische Vorgänge einzuleiten [283]. Auf der anderen Seite gibt es Bakterien wie *H. pylori* und *C. jejuni*, die der Erkennung von Flagellin durch PRRs entkommen, indem sie ein Flagellin ohne immunstimulatorische Eigenschaften bilden [287-290]. Mit einem ähnlichen Ziel reprimiert der systemische human-adaptierte Erreger *S. Typhi* nach einer Infektion von Epithelzellen seine Flagellin-Expression mit Hilfe des Regulators TviA [291]. Eines der wenigen Beispiele natürlich vorkommender nicht-motiler Serovare ist *S. Gallinarum*, das speziell in Geflügel sehr erfolgreich ist. Es besitzt zwar das Gen für das Phase I Flagellin, *fliC*, das sogar identisch mit dem von *S. Enteritidis* ist, exprimiert es jedoch nicht (kryptisches Gen). Im Gegensatz dazu besitzt sein Biovar *S. Pullorum* 3-4 Substitutionen im Gen, die eine Unterscheidung der beiden Biovare ermöglicht [292, 293]. Es gibt also sowohl Beobachtungen und Gründe für eine Flagellin-Expression und die damit verbundene Immunstimulation als auch dagegen. Inwiefern diese Beobachtungen Wirts- oder Serovar-spezifisch relevant sind, ist bislang ungeklärt.

I.4.6. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Für die Erkennung pathogener Mikroorganismen u.a. anhand der zuvor beschriebenen PAMPs und der Verknüpfung von angeborenen und adaptiven Immunreaktionen sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren essentiell. Da sie überlebenswichtige Funktionen übernehmen, kommen sie stark konserviert vor und werden auf Keimbahnebene vererbt. Ihre Entdeckung geht auf das Jahr 1991 zurück, als Gay *et al.* die Homologie des humanen IL-1 Rezeptors mit dem Transmembranprotein Toll der Fruchtfliege *Drosophila* beschrieben, das bislang nur für seine Rolle in der Embryogenese bekannt war [294]. TLRs sind danach Typ1 Transmembranproteine mit einer zytoplasmatischen und extrazellulären Domäne [295]. Da die zytoplasmatische Domäne der des IL-1R ähnelt, wird sie als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet. Die rund 200 Aminosäuren-große Domäne kann in drei Bereiche eingeteilt werden, wobei Box 1 die Sequenzsignatur der jeweiligen Rezeptorfamilie trägt und die Boxen 2 und 3 für die Signalübertragung verantwortlich sind [296]. Extrazellulär besitzen TLRs *leucine-rich*

repeats (LRRs), die aus 19 -25 Wiederholungssequenzen von je 20 – 30 Aminosäuren-Länge zusammengesetzt und für die PAMP-Erkennung verantwortlich sind [297, 298].

Bislang wurden 13 verschiedene TLRs in Säugern beschrieben, von denen zehn im Menschen vorkommen. TLR 7,8 und 10 kommen nicht in Mäusen vor, wohingegen TLR 11, 12 und 13 nicht im Menschen exprimiert werden [299]. Alle TLRs erkennen distinkte Faktoren von Pathogenen wie Viren, Pilzen, Protozoen und Bakterien (PAMPs), aber auch Stress-assoziierte Faktoren z.B. infolge von Gewebsschädigungen (*Damage-associated molecular patterns*, DAMPs) (siehe Tabelle 3). Die Liganden für die TLRs 10 – 13 sind bislang unbekannt. TLRs kommen ubiquitär im Organismus auf Epithelzellen, Makrophagen, DCs, Neutrophilen, T-Zellen und Endothelzellen vor, doch ist ihre Expression insbesondere im Epithelgewebe besonders in Hinsicht auf den ständigen Kontakt zu Mikroorganismen in der Umwelt stark reguliert [300]. So liegen bestimmte TLRs wie TLR5 nur auf der basolateralen Seite polarisierter intestinaler Epithelzellen, um eine Überstimulation infolge des starken mikrobiellen Kontakts beispielsweise im Darmlumen auf der apikalen Seite zu vermeiden und proinflammatorische Signale nur infolge einer Invasion oder Gewebsschädigung zu erzeugen [284, 301, 302]. Zudem können intestinale Epithelzellen unter Einfluss von LPS das *Toll-interacting protein* (TOLLIP) exprimieren, welches die Funktion der TLRs 2 und 4 inhibiert und so zum Phänomen der LPS Toleranz beiträgt [303, 304]. Hinzu kommt eine Kompartimentierung der TLRs, so dass z.B. TLRs 3, 7, 8, 9 und 13 meist ausschließlich intrazellulär z.B. in Endosomen vorkommen, wohingegen die übrigen TLRs in der Zytoplasmamembran eingelagert werden. Damit ermöglichen sie die Erkennung von viralen und bakteriellen Nukleinsäuren, die vor allem intrazellulär ein Problem darstellen [305-308].

TLRs kommen meist als Homo- oder Heterodimere vor. Bei Bindung von PAMPs oder DAMPs an die LRRs der TLRs kommt es zur Dimerisierung und zu einer Signaltransduktion, die über zwei Wege verlaufen kann – *myeloid differentiation factor 88* (MyD88)-abhängig oder unabhängig. Bis auf TLR3 können alle TLRs MyD88-abhängige Signalwege induzieren [309]. Außer MyD88 sind vier weitere Adaptormoleküle dabei von Bedeutung, die über eine eigene TIR-Domäne mit der der TLRs interagieren: das *TIR-associated protein* (TIRAP), das *TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β* (TRIF), das *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und SARM [296]. So führen Signalwege über MyD88 und TIRAP meist von TLR2 und TLR4 aus zur Phosphorylierung von Mitgliedern der *IL-1 receptor-associated kinase* (IRAK) Familie, die daraufhin mit dem *TNF-receptor-associated factor 6* (TRAF6) assoziieren. TRAF6 bildet einen Komplex mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen und aktiviert die TGF β -aktivierte Kinase 1 (TAK1), die über eine Aktivierung des

regulatorischen *NF- κ B essential modulator* (NEMO) letztlich eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und so u.a. die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-12p40 und IP-10 bewirken [309, 310]. Alternativ kann es jedoch auch von TAK1 aus zur Aktivierung weiterer *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), insbesondere p38 und der JUN N-terminalen Kinase (JNK) kommen, die dann den Transkriptionsfaktor *activator protein-1* (AP1) als Hetero- oder Homodimer aus Mitgliedern der Jun (c-Jun, JunB, JunD) und Fos Familie (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) aktivieren [311]. Im Gegensatz dazu führen TRIF und TRAM von TLR3 und TLR4 aus zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *IFN regulatory factor 3* (IRF3), der die Expression von Typ I Interferonen induziert [312-315]. SARM wurde als erster negativer Regulator der NF- κ B - und IRF3 - Aktivierung beschrieben, indem es TRIF bindet und so der Signaltransduktion entzieht [316].

Rezeptor	Liganden	Spezies	Referenz
TRL1/2, TLR2/6	Lipopeptide, Lipoteichonsäuren, Lipoarabinomannan, Peptidoglycan, Zymosan, Mannan	Bakterien, Pilze, Parasiten	[317, 318]
TLR3	dsRNA, Polyinosin- deoxycytidylsäure	Viren	[306]
TLR4 (LBP, CD14, MD2)	LPS, Mannan, Hsp60, β -Defensinen, env Proteine, Fibronectin, Heparansulfat, Hyaluronfragmente, Fibrin, GPI Anker	Bakterien, Viren, Parasiten, endogene Stressfaktoren	[318, 319]
TLR5	Monomeres Flagellin	Bakterien	[280]
TLR7	ssRNA, Imidazoquinolone	Viren	[307]
TLR8	ssRNA, Imidazoquinolone	Viren	[307]
TLR9	Unmethylierte CpG- Motive, Hämозoin	Bakterien, Viren, Parasiten	[318, 320, 321]

Tabelle 3: Humane Toll-like Rezeptoren mit den wichtigsten Liganden

Für eine Infektion mit *Salmonella* sind insbesondere die TLRs 2, 4, 5 und 9 von Bedeutung, wobei die Funktion von TLR4 die dominierende zu sein scheint [322]. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit *S. enterica* Mutanten mit Gendelektionen hergestellt, die einen Teil eben dieser Rezeptoren adressieren.

I.4.7. NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Die 23 (Menschen) bzw. 34 (Maus) Mitglieder der Familie der NOD-ähnlichen Rezeptoren fungieren als zytosolische mikrobielle Sensoren [323]. Strukturell bestehen sie aus N-terminalen Pyrin-Domänen (PYD) oder *caspase-activating and recruitment domains* (CARD), die für die Rezeptorbindung verantwortlich sind. Zudem besitzen sie eine zentrale *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD) zur Selbstoligomerisation bei Aktivierung sowie C-terminal LRRs ähnlich wie TLRs zur Ligandenbindung [324]. NLRs übernehmen durch Aktivierung von NF- κ B und MAPK spezifische Funktionen in der Immunantwort wie der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide, können jedoch auch in Kombination mit TLRs z.B. bei der Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 sowie der Pyroptoseinduktion wirken [325, 326]. Dabei kommt es zur Stimulation von NLR-Multiproteinkomplexen, sogenannten Inflammasomen, die mit Pro-Caspase-1 interagieren. Nach Proteolyse zu Caspase-1 kann diese die Zymogene pro-IL-1 β und pro-IL-18 in ihre aktive Form spalten. Die am besten beschriebenen NLRs sind NOD1 (CARD4) und NOD2 (CARD15), die bestimmte Motive des Peptidoglycans der bakteriellen Zellwand erkennen [327] (siehe I.4.5). So wurde für NOD1 eine wichtige Rolle in der Abwehr von Salmonellen durch DCs der Lamina Propria und der anschließenden systemischen Ausbreitung gefunden [328], für NOD2 u.a. eine antimikrobielle Rolle bei der Salmonelleninfektion von Epithelzellen nachgewiesen [329]. Zwei weitere NLRs, Ipaf (NLRC4) und NAIP5 erkennen u.a. bakterielles Flagellin und werden im Gegensatz zu NOD1 und NOD2 in Inflammasomen aktiv [281, 330]. Obwohl Ipaf-defiziente Makrophagen *in vitro* Defekte in der Aktivierung der Caspase-1 und Pyroptose zeigten [331], konnte *in vivo* in Mäusen keine erhöhte Suszeptibilität für *S. Typhimurium* gefunden werden [332]. Kombinierte Deletionen von Ipaf und NLRP3, das eine bislang unbekannte T3SS-unabhängige Komponente von *S. Typhimurium* erkennt, ergaben dagegen eine erhöhte Suszeptibilität von Mäusen, so dass Ipaf eher eine additive Wirkung zugeschrieben wird [333].

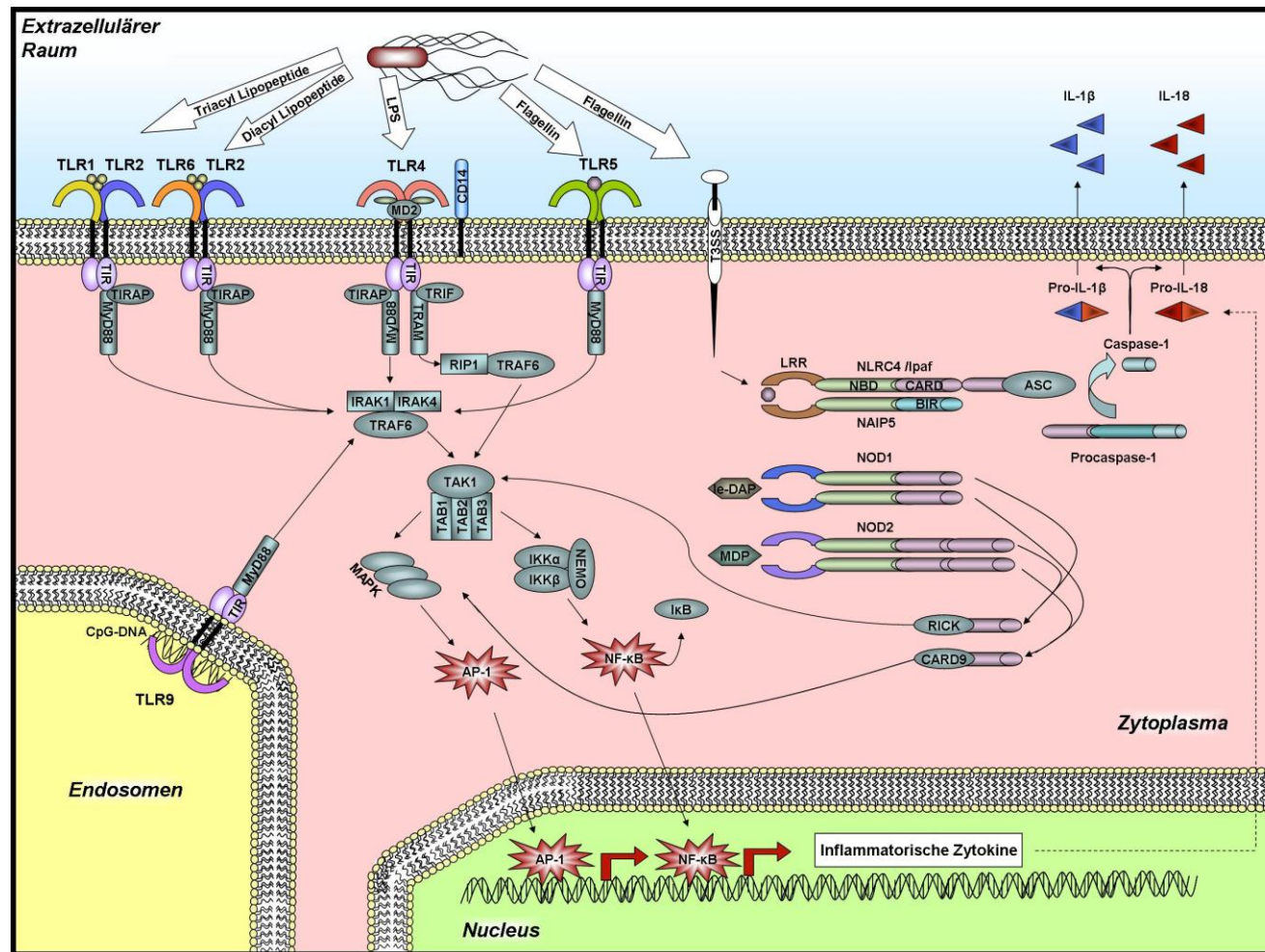


Abbildung 2: Erkennung von *Salmonella*-assoziierten molekularen Mustern durch Toll- und NOD-ähnliche Rezeptoren (TLR, NLR) mit den anschließenden Signalwegen. Die Aktivierung aller für die Salmonellenerkennung wichtigen TLRs sowie NOD-Rezeptoren kann über die Interaktion mit MyD88 und TRAF6 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 führen, die für die Expression inflammatorisch wichtiger Zytokin- und Chemokine entscheidend sind. Die intrazelluläre Ipaf / NAIP5-Erkennung von Flagellin trägt zur Prozessierung der Vorläufer für die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-18 bei.

I.4.8. Das NF- κ B Signalling

Sowohl die Aktivierung zahlreicher TLRs als auch für die Abwehr bakterieller Pathogene wichtiger NLRs wie NOD1 und NOD2 führen letztlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Aufgrund dieser zentralen Rolle in der Erkennung von Bakterien und der Einleitung diverser Maßnahmen zur Immunabwehr wurde NF- κ B in dieser Arbeit genutzt, um eine immunrelevante Aktivierung der Wirtszellen nachzuvollziehen.

Die Familie der NF- κ B Proteine besteht in Säugern aus fünf Mitgliedern: c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52). Letztere werden aus den Vorläufern p105 bzw. p100 gebildet. Alle besitzen eine konservierte *Rel-homology domain* (RHD), die eine Translokation in den Zellkern sowie eine DNA-Bindung vermittelt. Außerdem ist sie notwendig zur Bildung von Hetero- und Homodimeren aus den einzelnen Familienmitgliedern [334]. In dieser dimeren Form kommt NF- κ B ubiquitär vor und ist normalerweise durch die Bindung von I κ B im Zytosol inaktiviert. Bislang sind acht Mitglieder der I κ B-Familie bekannt (I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B ζ , Bcl-3, p105, p100), die als gemeinsames Merkmal über C-terminale *ankyrin repeats* verfügen [335]. Die Aktivierung von NF- κ B kann auf zwei Wegen erfolgen, dem klassischen (kanonischen) und dem alternativen Weg. Durch einen externen Stimulus wie der Aktivierung von PRRs, proinflammatorischer Zytokinrezeptoren usw. phosphoryliert klassischerweise ein Komplex aus den I κ B-Kinasen IKK α , IKK β und dem regulatorischen *NF- κ B essential modulator* (NEMO oder IKK γ) I κ B und markiert es damit für die folgende Ubiquitinylierung und Degradation [336]. Während des selteneren alternativen Weges führen Zytokine wie Lymphotoxin β oder CD40 zur C-terminalen Ubiquitinylierung von p100, das zu einem partiellen Abbau des Precursors in das aktive p52 führt [335]. Nach Dissoziation von I κ B bzw. Spaltung von p100 / p105 transloziert NF- κ B in den Zellkern und reguliert die Expression von mehr als 150 Genen mit sogenannten κ B-Bindungsstellen von 9-11 bp Länge, die in Inflammation, Apoptose, Zellwachstum und -differenzierung involviert sind [337, 338]. Diese Aktivierung von NF- κ B kann innerhalb von 10 min bis zur DNA-Bindung sehr schnell erfolgen und gewährleistet damit im Falle einer Infektion eine umgehende Reaktion [339]. Unter homeostatischen Bedingungen trägt NF- κ B der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion bei, indem es auf Epithelzellen antiapoptotisch wirkt [340-342]. So führte die Deletion von TLR5 in Mäusen bzw. die Deletion von Flagellinengen in *Salmonella* zu einer verzögerten intestinalen Inflammation und verstärkter Gewebszerstörung wahrscheinlich infolge der verringerten Aktivierung von NF- κ B [343]. Auf der anderen Seite bewirkt eine Aktivierung von NF- κ B die Expression proinflammatorischer Zytokine z.B. durch Makrophagen, die

wiederum proinflammatorisch und -apoptotisch auf Epithelzellen wirken.

Viele Pathogene greifen in den Mechanismus der NF- κ B Aktivierung insbesondere über dessen posttranslationale Modifikationen ein, um so die proinflammatorischen Funktionen zu blockieren. So inhibiert *Y. pseudotuberculosis* mit Hilfe des Virulenzfaktors YopJ mit NF- κ B, ERK, JNK und p38 gleich mehrere Wege zur Synthese proinflammatorischer Zytokine [344, 345]. Ein YopJ-ähnliches Protein wurde mit AvrA auch in *Salmonella* gefunden. Eine ähnliche NF- κ B-inhibitorische Aktivität ist jedoch umstritten und wird evtl. durch eine stärkere Blockade des JNK-Signalweges überschattet [346-348]. Ebenfalls deubiquitinylierend wirkt ein weiterer *Salmonella* Effektor, SseL (*Salmonella secreted effector L*). Entsprechende Mutanten führten in Mäusen zu erhöhter Inflammation und Gewebszerstörung, die dadurch erklärt wurde, dass die proinflammatorische Wirkung des NF- κ B die anti-apoptotische überwog [349]. NF- κ B kann also durchaus entgegengesetzte Wirkungen erzielen, die in Abhängigkeit der Stimuli und involvierten Zelltypen zu verschiedenen Krankheitsbildern führen.

I.4.9. Zytokine und Chemokine

Zytokine sind kleine sekretierte Peptide oder Glykoproteine mit einer kurzen Halbwertszeit und entsprechend geringer Reichweite im Gewebe [350]. Zu einer Expression und Sekretion kommt es ausschließlich bei Bedarf z.B. infolge einer TLR- und / oder NLR-Aktivierung während einer Salmonelleninfektion sowohl in Makrophagen als auch intestinalen Epithelzellen [351, 352]. Sie wirken als endogene Mediatoren autokrin, exokrin oder endokrin lokal begrenzt auf Inflammation und Hematopoese. Zu den Zielzellen von Zytokinen gehören vor allem Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, DCs, Granulozyten, aber auch Epithel- und Endothelzellen. Bei Bindung der Zytokine an die jeweiligen Zytokin-Rezeptoren der Zielzelle werden *second-messenger*, meist Tyrosinkinasen, aktiviert, die auf die Genexpression wirken. Dadurch können zahlreiche Vorgänge der Zelle wie Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation sowie Expression von Membranproteinen wie TLRs und Effektormolekülen wie Zytokinen beeinflusst werden.

Als Chemokine werden chemotaktisch wirkende Zytokine bezeichnet, die man entsprechend der Anordnung der Cysteine am N-Terminus in CC und CXC-Typen einteilt [353].

Vereinfacht ziehen CC-Chemokine vor allem mononukleäre Zellen an, wohingegen CXC Chemokine Neutrophile und Lymphozyten beeinflussen.

In Anlehnung an die Wirkung hinsichtlich der Polarisierung von T-Helferzellen läßt sich die durch Zytokine vermittelte Immunantwort in eine Th1- und Th2-Immunantwort einteilen. Die

bei einer Th1-Antwort beobachteten Zytokine wie IFN- γ , IL2, IL12 und IL18 führen im Rahmen einer Proinflammation zu einer Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und anderen T-Zellen sowie zu einer Vasodilatation und erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwände, so dass die Einwanderung weiterer Immunzellen und immunrelevante Faktoren in das entzündliche Gewebe erleichtert werden. Außerdem wird Fibrin gebildet, das zur lokalen Limitierung der Inflammation beiträgt.

So ist für eine Infektion von Epithelzellen z.B. die Induktion von CXC-Chemokinen wie IL-8, GRO α,β,γ und IP-10, CC Chemokinen wie MCP-1, MIP-1 β und RANTES, der Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF sowie der Zytokine IL-6 und TNF α beschrieben worden [352]. Makrophagen reagieren auf eine Infektion durch *Salmonella* in ähnlicher Weise überwiegend proinflammatorisch mit einer Expression der Chemokine MIP-1 α, β , KC und MIP-2 sowie einer Vielzahl von Zytokinen wie TNF α , IL-1 $\alpha, -1\beta$, IL-6, IL-12 und IL-18. Der Knockout der entsprechenden Gene in Mäusen resultierte in einer wesentlich höheren Suszeptibilität und begrenzten Möglichkeit zur Abwehr der Infektion [354].

Dagegen beinhaltet eine Th2-Antwort das Auftreten von Zytokinen wie IL-4, -5, -6, -10, -13 und TGF β , die zum einen der Proliferation von B-Zellen und damit der humoralen Immunantwort dienen, zum anderen auf Makrophagen und T-Zellen eine eher hemmende und damit antiinflammatorische Wirkung haben. Durch diese komplexe Regulation der verschiedenen an einer Inflammation beteiligten Zelltypen stellen Zytokine ein herausragendes koordinierendes Netzwerk von Signalen zur Bewältigung einer Infektion dar, das letztendlich zwischen Toleranz und völliger Zerstörung entscheidet.

Ein Übersichtsartikel zur Rolle der Ausprägung der Immunantwort nach einer Salmonelleninfektion weist darauf hin, dass eine proinflammatorische Th1-Antwort insbesondere in frühen Infektionsphasen dem schnellen Abtöten der Pathogene, eine antiinflammatorische Th2-Antwort eher der Ausbreitung und Persistenz von Bakterien zuträglich zu sein scheint [300]. So zeigen Defekte im IFN- γ / IL-12 Signalweg oft eine Assoziation mit der Persistenz und einem fatalen Ausgang bei Infektionen mit Mykobakterien und Salmonellen [300, 355]. Mit zunehmender Dauer der Persistenz scheint sich jedoch ein Wechsel zu vollziehen, so dass mehrere Studien von einer effektiveren Beseitigung der Infektion in einem Th2-Umfeld als unter Th1-Bedingungen berichten. Vermutlich führt eine Zunahme bakteriellen Wachstums in den Makrophagen unter Th2-Einfluss zu einem verstärkten Ausscheiden der Bakterien in den extrazellulären Raum, wo sie umgehend durch Antikörper und antimikrobielle Faktoren gebunden und abgetötet werden [356]. Demnach scheint die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Antwort abhängig von der intrazellulären Keimzahl zu sein. So werden

im frühen Infektionsstadium invasive Bakterien infolge des hohen proinflammatorischen Zytokinlevels und Aktivierungsstatus von Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen als Resultat der starken bakteriellen Belastung abgetötet. Sobald die Zahl intrazellulärer Bakterien deutlich reduziert wurde, wechselt die Immunantwort in Richtung Antiinflammation und trägt damit zur Limitierung der Infektion bei [300].

I.5. Pathogenese enterischer Salmonellosen

Salmonellen werden meist, wie zuvor beschrieben, über die Nahrung oder Wasser oral aufgenommen und müssen dann zuerst eine Reihe unspezifischer Wirtsabwehrmechanismen überwinden, um letztendlich in eine vermeintlich sichere intrazelluläre Umgebung zu gelangen. Die erste Barriere stellt der Magen dar, wo die Bakterien mit einem niedrigen pH-Wert zwischen 4 - 5 konfrontiert werden. Veränderungen in diesem Bereich z.B. durch eine Dysplasie, Gastritis, durch Magenkrebs oder Hypochlorhydrie, aber auch magensäurehemmende Medikationen erhöhen das Risiko einer gastrointestinalen Infektion [357-359]. Zudem führt der niedrige pH-Wert zur Anreicherung des Magensaftes mit reaktiven Stickstoffspezies (RNS), die auch bei der Bakterien-Abwehr durch aktivierte Makrophagen eine wichtige Rolle spielen [360, 361]. Salmonellen haben wie die meisten anderen Enterobakterien Mechanismen entwickelt, um diese sauren Bedingungen zu überleben. Dabei kommt es zur Aktivierung eines komplexen genetischen Programmes, das als *acid tolerance response* (ATR) bezeichnet wird. Das ATR ist assoziiert mit der Expression von mehr als 50 Säure-Shock Proteinen (ASPs), die ein kurzfristiges Überleben auch bei pH-Werten um 3,0 ermöglichen und in unterschiedlicher Zusammensetzung in Abhängigkeit der bakteriellen Wachstumsphase exprimiert werden [362, 363]. Die Regulation in logarithmisch wachsenden Bakterien zum Schutze vor organischen Säuren erfolgt über den alternativen Sigmafaktor σ^s (codiert durch *rpoS*) [364] sowie den Eisenaufnahme-Regulator Fur [365], wohingegen das Zweikomponentensystem PhoPQ den Schutz gegen anorganische Säuren gewährleistet [366]. Während der stationären Phase reguliert OmpR den Säureschutz [367]. Die RNS wiederum führen zu einer Inhibition des PhoPQ-abhängigen Säureschutzes [368], was die Komplexität der Wirts-Pathogen-Interaktionen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Infektion verdeutlicht.

Trotz derartiger Anpassungsmaßnahmen wird während der Magenpassage ein Großteil der Bakterien abgetötet. Studien in Mäusen zeigten, dass nur etwa 1% des Inokulums die Magenpassage überlebt [369]. Diese Zellen gelangen in den Dünndarm, wo sie weiteren unspezifischen Abwehrmaßnahmen des Wirts wie Verdauungsenzymen, Gallensalzen,

sekretorischer Antikörper (IgA) und antimikrobiellen Peptiden widerstehen müssen [370-373]. Zudem muss der durch Goblet- oder Becherzellen gebildete mukosale Schleim überwunden werden. Untersuchungen mit unterschiedlich wirtsadaptierten Serovaren zur Persistenz im Mucus ergaben keine Unterschiede, so dass dieser nicht über die Wirtsspezifität entscheidet [59]. Hinzu kommt die intensive Konkurrenz zwischen Pathogenen und Kommensalen, die z.T. selbst antimikrobielle Stoffe wie Bakteriozine sekretieren, hinsichtlich der verfügbaren freien Oberflächen und Nährstoffe [374, 375]. So werden 80% der Salmonellen direkt wieder ausgeschieden, 15% verbleiben etwas länger im Darmlumen und nur 5% invadieren letztendlich das intestinale Epithel im Bereich des Follikel-assoziierten Epithels (FAE), aber auch im Caecum und Jejunum [369]. Die Adhäsion wird dabei über nicht-fimbriäre Adhäsine wie SiiE und BapA [376, 377], Autotransporter Adhäsine wie ShdA, MisL und SadA oder Fimbrien vermittelt [378-380]. Fimbrien wie auch nicht-fimbriäre Adhäsine binden über das Lektin an ihrer Spitze Oligosaccharide von Glycolipiden und -proteinen wie Fibronectin oder Laminin als Bestandteil der extrazellulären Matrix [379, 381-383]. In *Salmonella* sind Stamm-abhängig mindestens 20 verschiedene Loci für Fimbrien bekannt [384], von denen die Typ 1 Fimbrien (Fim) für die Bindung an Enterozyten [385], die *long polar fimbriae* (Lpf) für die Bindung an *microfold* (M-) Zellen [386] und die *plasmid-encoded fimbriae* (Pef) sowie *thin aggregative* oder *curli fimbriae* (Tafi) für die Bindung an Epithelzellen *in vitro* beschrieben wurden [387, 388].

Die anschließende Invasion erfolgt zum einen durch die Phagozytose CD18⁺ dendritischer Zellen (DCs), die sich zusammen mit Makrophagen unterhalb des Epithels in der Lamina Propria befinden und Pseudopodien in das Lumen strecken [182, 389] (siehe I.4.1). Der zweite Weg erfolgt über die M-Zellen des Ileums [390]. Mit einer Dauer von nur 10 min ist die Transzytose über M-Zellen sehr schnell und effektiv und stellt damit die Haupteintrittspforte für Salmonellen dar [391]. Die dritte Möglichkeit erfolgt aktiv über eine Bakterien-vermittelte Makropinozytose in nicht-phagozytierende Enterozyten. Nachdem die Bakterien an die Wirtszelle adhärirt sind [380], werden Kontakt-induziert über ein Typ-3-Sekretionssystem (T3SS), das auf der 40 kb großen *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) codiert ist, Effektoren in die Zelle sekretiert [392-394]. Das T3SS ist evolutionär eng mit dem flagellären Exportsystem verwandt und bildet aus mehr als 20 verschiedenen Proteinen in ähnlicher Weise eine Nadel (*needle complex*, NC), die die Brücke zum Wirtszellzytosol bildet, sowie das Translokon, das in der Wirtszellmembran eine Pore zur Translokation der Effektoren formt [395, 396]. Die Effektoren besitzen häufig ein N-terminales Translokationssignal sowie Bindungssequenzen für spezifische Chaperone, die sie stabilisieren und zum NC

transportieren [397, 398]. Für eine erfolgreiche Invasion sind mindestens sechs verschiedene Effektoren notwendig. *Salmonella outer protein* SopB, SopE, SopE2 induzieren durch Aktivierung der Rho GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoG des Wirts ein Rearrangement des β -Aktin Zytoskeletts [399-401] während *Salmonella invasion protein* SipA und SipC die Aktin-Polymerisation und Stabilisierung der neugebildeten Filamente unterstützen [402, 403], so dass es zu einem Anrauen der Zellmembran, dem sogenannten *membrane ruffling*, und einem Umschliessen der Bakterien mit der Wirtszellmembran kommt [404]. Die Fission der Membranen und die daraus folgende Bildung von Phagosomen, sogenannter Makropinosomen, wird von SopD unterstützt [405]. Kurz nach der Aufnahme führt die Tyrosinphosphatase SptP in einem entgegengesetzten Prozess zu SopE und SopE2 zur Aktivierung der GTPase Aktivität von Cdc42 und Rac1 und stellt so den Urzustand des Zytoskeletts wieder her [406]. Da SptP im eukaryotischen Zytosol eine längere Halbwertszeit als SopE / E2 aufweist, lassen sich die konträren Prozesse temporal regulieren [407].

Neben der Invasion der DarmMukosa über den transzellulären Weg besitzt *Salmonella* die Fähigkeit, *tight junctions* zu zerstören und so auch über den parazellulären Weg in das Epithelgewebe zu gelangen. Diese Störung der Barrierefunktion der *tight junctions* bedeutet zudem eine unregelmäßige Durchlässigkeit für Wasser und Ionen, was zur Einleitung der Diarrhoe beiträgt [408]. Neben seiner Funktion für die Invasion spielt das Effektorprotein SopB in diesem Zusammenhang auch eine wichtige Rolle [409]. Durch seine Phosphatase-Aktivität führt es zu einem Konzentrationsanstieg von D-myo-Inositol-1,4,5,6-Tetrakisphosphat, welches die zelluläre Ca^{2+} -abhängige Chloridsekretion stimuliert, und zum Abbau von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat als Inhibitoren der Chloridsekretion. Die Folge ist ein Flüssigkeitsverlust, der zur Diarrhoe führt [401, 410, 411].

Nach Aufnahme der Salmonellen im Makropinosom verengt sich dieses so stark, dass die Bakterien direkt an der phagosomalen Membran anliegen. Durch ein zweites T3SS, das auf der 40kb großen *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) codiert wird, können nun weitere Effektoren über die Membran in die Wirtszelle sekretiert werden, die u.a. in die endozytischen Transportwege eingreifen [412, 413]. Das daraus resultierende Phagolysosom wird nunmehr als *Salmonella-containing vacuole* (SCV) bezeichnet. Als Hinweis auf eine dynamische Interaktion zwischen dem zellulären Recyclingmechanismus und dem SCV kommt es zu einer Anlagerung biochemischer Marker früher Endosomen wie EEA1 (*early endosomal antigen 1*), dem Transferrin-Rezeptor (TR), sowie der GTPasen Rab5 und Rab11 [414, 415] sowie zu späteren Zeitpunkten auch von Rab7, LAMP1 (*lysosomal associated membrane protein 1*), LAMP2, LAMP3 und der vakuolären ATPase als Marker später

Endosomen [413, 416, 417]. Im Gegensatz zu Infektionen mit anderen intrazellulären Pathogenen wie *M. tuberculosis*, die eine Azidifikation unterbinden [418], fällt in der SCV der pH auf 5 – 6 [419]. Die niedrigen pH-Werte, niedrige Mg^{2+} -Konzentrationen und eine veränderte Osmolarität in der SCV werden durch verschiedene regulatorische Sensormoleküle, meist Zweikomponentensysteme wie PhoP/PhoQ und OmpR/EnvZ, erkannt und induzieren eine Reihe SPI-2 codierter Gene [420-423]. Auch wenn die Rolle der Azidifikation für das intrazelluläre Überleben von *Salmonella* umstritten ist [424], so führen die Bedingungen in der SCV insgesamt zu einer veränderten Regulation von mindestens 919 Genen, die für die intrazelluläre Persistenz von Bedeutung sind [425]. Zum Beispiel bewirken diese bereits kurz nach Aufnahme der Salmonellen zahlreiche Veränderungen der bakteriellen Oberflächenstrukturen, die als Liganden für die zelluläre Immunabwehr fungieren und dementsprechend negative Auswirkungen für die Bakterien haben. So wird z.B. das O-Antigen des LPS gekürzt, das Lipid A des LPS modifiziert [426, 427], der Proteinanteil in der Zytoplasmamembran verändert [428] und das SPI1-T3SS sowie die Expression von Flagellin reprimiert [282, 291, 429].

Eine weitere wichtige Funktion dieser veränderten Genexpression ist der zuvor beschriebene Eingriff in den endozytischen Transport, der *Salmonella* ermöglicht, wichtige Nährstoffe wie Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren zu akquirieren. Der durch Eisen-bindende Proteine des Wirts wie Transferrin (TF) und NRAMP1 limitierte Zugang zu essentiell Eisen, wird durch die Expression zweier Proteine, Enterobactin und Salmochelin, überwunden [430]. Die Aufnahme von Mg^{2+} erfolgt durch drei verschiedene Aufnahmesysteme CorA, MgtA und MgtB [431, 432], die von Zn^{2+} über ZnuABC [433] und die von K^+ über das Trk System [434]. Durch diese Versorgung und die Minderung zellulärer Abwehrmechanismen kann *Salmonella* bis hin zu mehreren Tagen in der SCV persistieren [435].

Nach der Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen bewegt sich die SCV abhängig von den bakteriellen Proteinen SseG, SseF und SifA, die u.a. eine Anlagerung von Kinesin verhindern, durch verstärkte Dynein-Anlagerung entlang von Mikrotubuli vom Wirtszellrand in Richtung des *microtubule-organizing centre* (MTOC) zum Golgi-Apparat oder Nucleus [436-439]. Wahrscheinlich sind diese Nähe und die Akquisition exozytischer Vesikel vom Golgi-Apparat für ein optimales Wachstum notwendig [437]. Der Beginn intrazellulärer Replikation geht in einigen Zelltypen mit der Erscheinung dynamischer tubulärer Strukturen einher, die radiär von der SCV austreiben, den sogenannten *Salmonella-induced filaments* (SIF) [440, 441]. Diese sind SifA-vermittelt und nutzen die Mikrotubuli als Gerüst [442].

Vermutlich dient diese Formation der Erweiterung der SCV [435]. Zudem spielt SifA eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der SCV-Membran [443].

Abhängig vom infizierten Zelltyp würde die ungehinderte intrazelluläre Replikation irgendwann zum Bersten der Zelle und nekrotischen Abläufen führen, die einen proinflammatorischen Charakter haben. Es gibt Hinweise darauf, dass *Salmonella* diesen Prozess sogar forciert, um z.B. eine Ausbreitung auf neue Wirte durch die Diarrhoe zu erreichen. Aufgrund der Ansammlung und Exkretion größerer Flüssigkeitsvolumina bei einer *Salmonella*-assoziierten Diarrhoe wurde früh nach einem Cholera Toxin – ähnlichen Faktor gesucht und in den 70er und 80er Jahren in Form des *Salmonella* Enterotoxins Stn gefunden [444, 445]. Ein Großteil der *Salmonella enterica* Serovare besitzt das entsprechende Gen *stx*, es wird jedoch scheinbar nicht in allen Stämmen exprimiert oder biologisch aktiv [446, 447]. Die Regulation ist bislang ungeklärt, so dass auch die Frage nach der Rolle während klinisch asymptomatischer Infektionen offen bleibt. Zudem deutete eine Studie von Watson *et al.* an, dass zumindest in Kälbern Stn bei der Induktion der Diarrhoe keine Rolle spielt [448].

Neben der zytotoxischen Eigenschaft potentieller Toxine scheint der sogenannte programmierte Zelltod, die Apoptose, bei *Salmonella* Infektionen von Bedeutung zu sein. Im Gegensatz zur Nekrose läuft diese ohne starke proinflammatorische Folgereaktion ab und wird z.B. infolge einer Überlastung der Zelle durch einen veränderten ATP-Haushalt, wie er während einer Infektion auftreten könnte, induziert. Sowohl in Epithelzellen als auch in Makrophagen wurde die Induktion der Apoptose beobachtet [449-451], die durch Aktivierung einer Caspase-Kaskade letztendlich zum Abbau der Wirtszelle in membranumhüllte apoptotische Vesikel führt. Mittlerweile wird die Induktion des Zelltodes über eine Caspase-1 Aktivierung als Pyroptose bezeichnet, da sie im Gegensatz zur Apoptose unter Freisetzung inflammatorischer Vesikel und Zytokine wie IL-1 β abläuft und damit eher der Nekrose ähnelt [452, 453]. Sowohl für die Entwicklung apoptotischer als auch pyroptotischer Zellen sind Gene auf den Pathogenitätsinseln notwendig. So führten SPI2-Knockout Mutanten zu deutlich weniger apoptotischen Epithelzellen nach einer Infektion als der Wildtyp-Stamm [454]. In Makrophagen wurde gezeigt, dass der SPI1-codierte Effektor SipB die Caspase-1 bindet, aktiviert und somit eine Pyroptose in der Wirtszelle einleitet [451]. Zudem führt bakterielles Flagellin intrazellulär zur Aktivierung des Rezeptors Ipaf, der ebenfalls eine Aktivierung von Caspase-1 bewirkt [281, 282] (siehe I.4.7). Laut Fink *et al.* ist die Pyroptose in *Salmonella*-infizierten Makrophagen sogar der vorherrschende Mechanismus. Dass er nicht auf Makrophagen beschränkt ist, zeigten Dreher und Van der Velden 2002 bzw. 2003 in DCs [455, 456].

Welcher Mechanismus mit den entsprechenden mehr oder weniger starken inflammatorischen Auswirkungen letztendlich zum Zelltod führt, scheint also stark vom Wirtszelltyp abzuhängen. So treten pyroptotische Effekte bei Infektionen von Makrophagen bereits nach 1 - 2 Std. auf [457], wohingegen die Apoptose in Epithelzellen erst verhältnismäßig spät nach 12 - 18 Std. erscheint [450]. *Salmonella* bliebe also insbesondere in Epithelzellen genügend Zeit, um zu replizieren und die Infektion fortzusetzen.

In Abhängigkeit des Erregers und der resultierenden Immunantwort haben diese Infektionen unterschiedliche Auswirkungen auf den Wirtsorganismus. Infektionen durch nicht-typhoidale Salmonellen bleiben meist infolge erfolgreicher Abwehrmaßnahmen des Wirtsimmunsystems auf den Darm und das angrenzende darmassoziierte Lymphgewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) beschränkt und führen zur IL8-abhängigen Einwanderung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMNs) bereits 1 – 3 Std. nach der Infektion [458, 459]. Die Sekretion reaktiver und zytotoxischer Stoffe durch die Neutrophilen und der zunehmende Anteil nekrotischer, pyroptotischer und apoptotischer Zellen in der Epithelschicht haben die Zerstörung der Darmmukosa und einer resultierenden inflammatorischen Diarrhoe zur Folge. Diese wird zudem verstärkt durch die oben beschriebene *Salmonella*-induzierte Chloridsekretion infizierter epithelialer Zellen [460].

Systemische Erreger können dagegen im Bereich der Lamina Propria durch Induktion von Makropinozytose von Makrophagen aufgenommen werden. Vom GALT aus erfolgt die Ausbreitung über die daran angeschlossenen efferenten Lymphgefäße und den Ductus thoracicus in die Vena Cava. Durch das Blutssystem kommt es dann zu einer Infektion weiterer Organe insbesondere des retikuloendothelialen Systems (RES) wie Leber und Milz, die durch ihr stark verzweigtes Kapillarsystem eine filternde Funktion ausüben und häufig vergrößert während einer systemischen Infektion vorgefunden werden [461]. Es folgt eine Replikation der Bakterien im Blut und letztendlich der Eintritt des Todes.

I.6. Wechselwirkungen von *Salmonella* mit dem Wirt

Im Laufe der Zeit wurden diverse Vermutungen hinsichtlich der Adaptation einiger Serovare auf bestimmte Wirte aufgestellt, die Fortschritte markierten, bislang jedoch nicht zur endgültigen Klärung der Frage führten.

Auf bakterieller Seite wurde vor allem das Auftreten von Virulenzplasmiden untersucht, die einige wichtige Virulenzgene tragen und eine 8 kb große konservierte Region aufweisen, das *Salmonella plasmid virulence (spv)* Operon [462, 463]. Virulenzplasmide wurden bislang in *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Abortusovis* und *S. Gallinarum* /

Pullorum, nicht jedoch in *S. Typhi* gefunden [464] und treten meist Serovar-spezifisch auf [465]. Die Signale, die zur Transkription des *spv* führen, entsprechen typischen intravakuolären Bedingungen in der SCV wie die Eisenlimitierung, erhöhte Temperaturen, ein niedriger pH und Nährstoffmangel sowie eine stationäre Wachstumsphase [463, 466, 467]. Sie induzieren die Expression der Gene *spvABCD* durch Aktivierung des Regulators SpvR sowie des chromosomalen *rpoS*-kodierte Sigmafaktors σ^S [466]. Im Einzelnen beobachtete man durch die Plasmide vermittelte Funktionen in der systemischen Ausbreitung und Induktion einer Enteritis [468, 469], der intrazellulären Vermehrung [470] sowie Zytotoxizität gegenüber Makrophagen und der Abwehr von Immunreaktionen [471]. Zudem sind auf einigen Plasmiden Serovar-spezifisch zusätzliche Virulenzgene codiert. *rck* kommt nur in *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* vor und trägt zu einer verstärkten Serumresistenz bei [472]. Das Fimbrien-codierende Gen *pef* kommt in *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Choleraesuis*, nicht jedoch *S. Dublin* und *S. Gallinarum* vor [473, 474], wohingegen auf Plasmiden in *S. Gallinarum* Fimbrien codiert werden, die homolog zu den K88-Fimbrien aus *E. coli* sind [475]. Aufgrund dieser Serovar-spezifischen Ausstattung der Virulenzplasmide und ihrer nachgewiesenen Beteiligung an zahlreichen Prozessen während der Infektion, wurde über ihre Rolle in der Wirtsspezifität spekuliert [476]. Laut Helmuth *et al.* korreliert die Präsenz von Virulenzplasmiden deutlich mit der Virulenz in Mäusen und der Serumresistenz [465]. Dass diese Beobachtung jedoch nicht allgemein gültig zu sein scheint und bestimmte Serovare ihre Virulenz auch unabhängig von Plasmiden beibehalten, zeigten Koinfektionen in Kälbern mit Plasmid-losen und Plasmid-haltigen Stämmen [477]. Bislang wurde keine wirtsspezifisch unterschiedliche Funktion oder Relevanz der Plasmide beschrieben. Eine Studie von Barrow *et al.*, bei der sich die natürlicherweise Serovar-spezifischen Plasmide experimentell austauschen ließen, ohne dass sich etwas an der Virulenz der Stämme änderte, stellt zudem die Rolle der Plasmide bei der Wirtsadaptation in Frage [478].

Auf der Suche nach Faktoren, die gemeinsam und exklusiv durch human-adaptierte Serovare wie *S. Typhi* und *S. Paratyphi* nicht jedoch durch *S. Typhimurium* gebildet werden, ist die Gruppe um Galán auf ein sogenanntes Typhoid Toxin (CdtB/PltA/PltB) ähnlich dem Pertussis Toxin gestossen [479, 480]. Dieses wird ausschließlich intrazellulär exprimiert und führt para- und autokrin durch DNA-Degradation zu zytotoxischen Effekten. Bislang ist jedoch weder die Funktion hinsichtlich der systemischen Pathogenese von *S. Typhi* noch hinsichtlich der Wirtsadaptation bekannt.

Parallel untersuchte man auch wirtsseitige Faktoren für eine Adaptation. Z.B. gibt es ältere Untersuchungen, die nahelegen, dass die Serumresistenz von *Salmonella* wichtig für die

Wirtsadaptation sein könnte. Man fand früh Unterschiede in der Serumresistenz, die auf die Zusammensetzung des LPS zurückzuführen sind, da bestimmte O-Antigene Komplement eher binden als andere [481]. Danach widerstände ein adaptiertes Serovar der Komplement-vermittelten Lyse besser in seinem jeweiligen Wirt. Das Resultat wäre ein Vorteil im extrazellulären Raum und eine größere Wahrscheinlichkeit, systemische Erkrankungen zu verursachen [482]. Allerdings zeigten umfangreichere Studien, dass die Serumresistenz eher Stamm- als Serovar-spezifisch zu sein scheint [59].

Ein weiterer entscheidender Punkt bestünde in einer wirtsspezifischen Adhäsivität der Serovare am Darmepithel. Diese könnte über unterschiedliche wirtsspezifische Glykosylierungsmuster auf epithelialen Oberflächen vermittelt werden, die die Adhäsion verschiedener bakterieller Fimbrien und Adhäsine unterschiedlich effizient gewährleisten. So unterscheiden sich z.B. M-Zellen in Mäusen von denen im Kaninchen deutlich durch die Präsentation verschiedener Glykokonjugate [408]. Vergleichende Adhäsions- und Invasionsstudien zeigten jedoch bislang keinerlei Korrelation zwischen Wirtsspezifität und Adhärenz / Invasivität [483-485].

Nachdem *Salmonella* die intestinale Mukosa seines Wirts besiedelt hat, müssen die Erreger für eine systemische Infektion eine Barriere von Makrophagen im *Sinus lymphaticus* der Lymphknoten überwinden. Die Anatomie und Physiologie sekundärer intestinaler lymphatischer Organe unterscheidet sich z.T. deutlich zwischen verschiedenen Wirtsspezies. So besitzen Hühner beispielsweise Caecal-Tonsillen, die im Menschen und Schweinen gar nicht vorkommen. Da jedoch von hier aus meist die systemische Besiedlung weiterer Organe erfolgt, sind die Abläufe und beteiligten Zelltypen an dieser Stelle von besonderem Interesse hinsichtlich der Wirtsadaptation. Eine der umfangreichsten Studien deutete bereits 1994 auf eine entscheidende Rolle des reticuloendothelialen Systems für die Wirtsadaptation hin [142]. Systemische Salmonellen werden besonders häufig assoziiert mit Makrophagen gefunden. Für die Salmonellen können sie auf der einen Seite eine schützende, auf der anderen Seite eine zerstörende Funktion übernehmen (siehe I.4.3). Aktivierte Makrophagen sind in der Lage, Salmonellen abzutöten, wohingegen naive Makrophagen intrazellulär persistierende Salmonellen beherbergen, transportieren und vor einer feindlichen Umgebung mit Neutrophilen, Komplement und anderen bakteriziden Faktoren schützen. Somit scheinen speziell Makrophagen eine entscheidende Rolle für die Ausprägung einer Salmonellen-Infektion zu übernehmen.

I.7. Zielsetzung

Salmonella enterica ist in der Lage als klassischer Zoonoseerreger weltweit sowohl den Menschen als auch eine Vielzahl verschiedener Tiere zu infizieren und in diesen Krankheiten hervorzurufen, deren Erscheinung und Verlauf sehr unterschiedlich ausfallen kann. In Abhängigkeit des betrachteten Serovars verfügen Salmonellen über ein breites Wirtsspektrum, jedoch mit unterschiedlicher Pathogenese in verschiedenen Spezies, können jedoch auch streng auf eine Spezies begrenzt vorkommen und vermitteln dann meist systemische Erkrankungen mit hoher Mortalität. Neben *E. coli* ist *Salmonella* einer der am intensivsten untersuchten Darmpathogene, dessen jeweils verursachte Krankheitsverläufe und dazu notwendige Virulenzmechanismen mittlerweile gut verstanden sind. Nichtsdestotrotz ist bislang kaum geklärt, welche Mechanismen auf Seite der Bakterien sowie auf der Seite des Wirts dafür verantwortlich sind, dass bestimmte Serovare an bestimmte Spezies angepasst sind oder ein und dasselbe Serovar in einer Wirtsspezies eine lokal begrenzte Enteritis und in einer weiteren eng verwandten systemische Infektionen verursacht, die von der Pathologie her vollkommen verschieden erscheinen. Durch Vergleiche meist weniger Serovare (zwei bis vier) *in vitro* in Modellsystemen mit bis zu zwei Wirtsspezies oder *in vivo* nur in einer Spezies wurde in der Vergangenheit versucht, diese Lücke im Verständnis der Wirtsadaptation zu schließen. Die Ergebnisse waren jedoch meist nur für den jeweiligen Hintergrund aussagekräftig, ließen sich aufgrund unterschiedlicher Systematik nicht miteinander vergleichen, zielten zudem überwiegend auf bakterielle Faktoren und ergaben damit kaum Hinweise auf generelle Mechanismen etwa der Wirtsimmunabwehr.

Mit dem Ziel, in systematischer Weise Virulenzphänotypen verschiedener unterschiedlich adaptierter *Salmonella* Serovare in Zielzellen der frühen Infektionsphase der Salmonelleninfektion sowie in unterschiedlichen Wirtsspezies zu charakterisieren und infolge der Infektion, Unterschiede in der angeborenen Immunantwort der Spezies zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit intestinale Epithel- und Makrophagenzelllinien aus dem Schwein, dem Huhn und dem Menschen infiziert und hinsichtlich folgender Parameter analysiert:

1. Invasivität der Serovare in den jeweiligen Wirtsspezies; 2. Persistenz, d. h. Überleben und Vermehrung der Salmonellen in den Zellen; 3. Immunantwort der Wirtszellen auf eine Infektion. Für den letzten Punkt wurden Reporterzelllinien der oben genannten Zellen etabliert, die ermöglichten, die Aktivierung von NF- κ B als zentralem Regulator der Immunreaktion nachzuvollziehen. Zudem erfolgte die Herstellung von *Salmonella*-Mutanten mit Deletionen in wichtigen PAMP-Genen zur Untersuchung des Einflusses von PAMPs auf die Immunantwort in verschiedenen Spezies. Um die Aussagekraft der Ergebnisse hinsichtlich

der Relevanz *in vivo* zu erhöhen, wurden die Versuche zudem in humanen Primär-makrophagen durchgeführt und mit Hilfe von Microarray-Studien ein gesamtheitliches Bild zu Situation der Makrophagen infolge einer Infektion erstellt. Am Ende sollen mögliche Mechanismen und / oder relevante Faktoren für eine Wirtsadaptation von *Salmonella* aufgeklärt werden, die die Grundlage für weitere mechanistische Studien legen.

II. MATERIAL

II.1. Zelllinien

Die Infektionsversuche wurden mit insgesamt acht verschiedenen Zelllinien epithelialen bzw. monozytären Ursprungs aus dem Schwein, dem Huhn und dem Menschen durchgeführt.

Bezeichnung	ATCC Nummer	Spezies	Zelltyp	Herkunft
U937	CRL-1593.2	<i>H. sapiens</i>	Monozyten / Makrophagen	P. Dersch, HZI, Braunschweig
THP-1	TIB-202	<i>H. sapiens</i>	Monozyten / Makrophagen	DSMZ, Braunschweig
LoVo	CCL-229	<i>H. sapiens</i>	Epithelzellen	ATCC, Manassas, USA
Caco-2	HTB-37	<i>H. sapiens</i>	Epithelzellen	ATCC, Manassas, USA
3D4/31		<i>S. scrofa</i>	Monozyten / Makrophagen	L. Babiuk, Univ. of Saskatchewan, VIDO, CDN
PLN/C2		<i>S. scrofa</i>	Monozyten / Makrophagen	K. Tedin, FU Berlin
IPEC-J2		<i>S. scrofa</i>	Epithelzellen	A. Blikslager, NCSU, USA
HD-11		<i>G. gallus</i>	Monozyten / Makrophagen	B. Kaspers, LMU München
MQ-NCSU		<i>G. gallus</i>	Monozyten / Makrophagen	L. Rothwell, Inst. Animal Health, Compton, UK

Tabelle 4: Übersicht zur Herkunft der verwendeten Zelllinien

II.1.1. Humane Zelllinien

U937

Die humane hämatopoetische Zelllinie U937 wurde 1974 von S. Sundström und K. Nilsson aus einem 35-jährigen Mann mit generalisiertem histiozytischem Lymphom isoliert und lässt sich bei Behandlung z.B. mit TNF α , IFN γ und Phorbolestern zu terminalen Monozyten ausdifferenzieren [486].

THP-1

Die humane monozytäre Zelllinie THP-1 wurde aus peripherem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytischer Leukämie isoliert und in dieser Arbeitsgruppe auf Adhärenz hin selektiert, so dass die Zelllinie hier als adhärente Zelllinie betrachtet werden kann. Mit Hilfe von Phorbolestern lassen sich THP-1 Zellen zu reifen Makrophagen differenzieren [487].

LoVo

Die humane epitheliale Zelllinie LoVo wurde 1971 aus einem metastasierenden Tumor des Colon eines 56-jährigen Mannes mit colorektalem Adenokarzinom gewonnen [488].

Caco-2

Als zweite humane Epithelzelllinie wurden Caco-2 Zellen benutzt. Auch diese Zellen wurden aus dem Colon eines 72-jährigen Mannes mit colorektalem Adenokarzinom isoliert, unterscheiden sich morphologisch jedoch deutlich von den LoVo Zellen. Konfluent gewachsene Caco-2 Zellen zeigen zahlreiche enterozytische Merkmale und sind daher ein beliebtes Modell für intestinale Funktionen [489].

II.1.2. Porcine Zelllinien

3D4/31

Die porcine Makrophagen-ähnliche Zelllinie 3D4/31 wurde 1998 durch Transfektion primärer Alveolarmakrophagen aus einem 12-Wochen alten Schwein mit dem Plasmid pSV3-neo etabliert [490].

PLN/C2

Zur Unterstützung bestimmter Ergebnisse wurde neben den 3D4/31 Zellen eine zweite Makrophagen-ähnliche Zelllinie benutzt, die 2007 von C. Tölke (FU Berlin) durch Transformation von Blutmakrophagen aus den ilealen Peyerschen Plaques von Schweinen mit einem SV40 Plasmid (pSV3-neo) etabliert wurde, bislang jedoch nur ansatzweise charakterisiert und unveröffentlicht ist. So weist die Zelllinie diverse Oberflächenmarker wie CD14, CD45, MHC I und II sowie das für ausgereifte porcine Makrophagen charakteristische SWC9 auf.

IPEC-J2

Die porcine Epithelzelllinie IPEC-J2 (*Intestinal Porcine Epithelial Cell – Jejunum 2*) wurde aus dem Jejunum eines neonatalen Ferkels isoliert [491, 492] und besitzt damit allein aufgrund ihrer Herkunft gewisse Vorzüge in der Untersuchung von Vorgängen im Dünndarm-epithel im Gegensatz zu den bislang verfügbaren humanen Epithelzelllinien des Colons. Zudem weist sie zahlreiche intestinal - epitheliale Merkmale wie die Bildung von Mikrovilli auf. Sie ist in der Lage wichtige TLRs und NLRs, Zytokine und Chemokine wie IL-1 α , IL-6, IL12p40, TNF- α , GM-CSF und IL-8 etc. zu exprimieren und eignet sich daher zur Untersuchung der intestinalen Immunabwehr [492, 493].

II.1.3. Hühner-Zelllinien

HD-11

Die Hühner-Zelllinie HD-11 wurde durch Infektion von Knochenmarks – Makrophagen aus 1 - 4 Wochen alten SPAFAS -Hühnern mit dem MC29 Leukämie Virus etabliert [494].

MQ-NCSU

Als zweite Makrophagen-ähnliche Zelllinie wurden MQ-NCSU aus Dekalb XL Hühnern verwendet. Diese wurden nach Infektion der Milz mit dem Marek's Disease Virus JM/102W isoliert und anschließend durch Markierung mit Monozyten-spezifischen Antikörpern als Monozyten-ähnliche Zellen identifiziert [495]. Da diese Zelllinie sich als verhältnismäßig anspruchsvoll erwies und nur schwach adhärierte, war sie nur bedingt für die Infektionsversuche nutzbar.

Bezeichnung	Spezies	Zell-typ	Nachgewiesene Eigenschaften (eine Auswahl)	Quelle
U937	<i>H. sapiens</i>	Mo	TLRs 1 _R , 2 _{R,P} , 3 _R , 4 _{R,P} , 5 _R , 7 _R , 8 _R , 9 _R , NOD1 _R , NOD2 _R , CD11a _{R,bR,cR} , CD14 _{R,P} ; MHC I _P , MHC II (HLA-D) _{R,P} ; FcγRI _P , II _P , III _P ; CR3 _P , 4 _P ; TNFα _P , IL-1β _P , IL-8 _P , IL- 12p40 _P	[496-506]
THP-1	<i>H. sapiens</i>	Mo	TLRs 1 _{R,P} , 2 _{R,P} , 3 _{R,P} , 4 _{R,P} , 5 _{R,P} , 7 _{R,P} , 8 _{R,P} , 9 _{R,P} , 10 _{R,P} ; NOD1 _P , NOD2 _P , Ipaf _R ; MD2 _P , CD14 _{R,P} ; MHC I _P , MHC II (HLA-D) _P , FcγRI _P , II _P ; CR3 _P , 4 _P ; TNFα _P , IL-1β _P , IL-8 _P , IL-12p40 _P	[507-515]
LoVo	<i>H. sapiens</i>	IEC	TLRs 2 _R , 3 _R , 4 _{NN} , 5 _R , 6 _R , 8 _R , 9 _R ; IL-8 _{R,P} ; CD14 _R ; MHC I _P (schwach); IL-1β _P , IL-8 _P	[516-519]
Caco-2	<i>H. sapiens</i>	IEC	TLRs 1 _R , 2 _{R,P} , 3 _{R,P} , 4 _{R,P} , 5 _{R,P} , 6 _R , 9 _{R,P} ; NOD1 _R , NOD2 _± ; TNFα _R , IL-1β _R , IL-8 _{R,P}	[230, 329, 506, 513, 518]
3D4/31	<i>S. scrofa</i>	Mo	CD14 _P ; MHC II _P ; TNFα _R , IL-1β _R , IL-8 _R	[490, 520, 521]
PLN/C2	<i>S. scrofa</i>	Mo	CD14 _P , MHC I _P , MHC II _P , SWC3a _P , SWC9 _P	Siehe II.1.2
IPEC-J2	<i>S. scrofa</i>	IEC	TLRs 1 _R , 2 _{R,P} , 3 _{R,P} , 4 _{R,P} , 5 _{R,P} , 6 _{R,P} , 8 _R , 9 _{R,P} , 10 _R , NOD1 _R ; MHC I _P , MHC II _{NN} ; TNFα _R , IL-1α _R , IL-1β _± , IL-6 _R , IL-8 _{R,P} , IL-12p40 _R	[492, 493, 522-526]
HD-11	<i>G. gallus</i>	Mo	IL-1β _{R,P} , IL-6 _R , IL-8 _R , iNOS _R	[527-529]
MQ-NCSU	<i>G. gallus</i>	Mo	TLR 4 _P , CD14 _P ; IL-1β _{R,P} , IL-6 _{R,P} , iNOS _R	[530-533]

Tabelle 5: Charakteristika der verwendeten Zelllinien. Mo: Monozyten / Makrophagen-ähnliche Zellen, IEC: intestinale Epithelzellen; R: Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen, P: als Protein nachgewiesen, NN: nicht nachweisbar, ±: widersprüchliche Veröffentlichungen

II.2. Bakterienstämme

Es wurden folg. *Salmonella* Stämme in dieser Arbeit verwendet:

Bezeichnung	Interne Nummer	Beschreibung	Anmerkungen	Quelle
Wildtypstämme				
S. Typhimurium SL1344	2958	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Typhimurium SL1344	Serotyp 1,4,[5],12:i:1,2 ; Reisolation aus BALB/C Maus, His auxotroph, Str ^R	B.A.D. Stocker, Beckman Center, Stanford University
S. Typhimurium SL3201	5938	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Typhimurium SL3201	Serotyp 1,4,[5],12:i:1,2 ; Fim ⁻	Alison D. O'Brien, UHUS, Bethesda, USA [534]
S. Enteritidis 07-02760	4968	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Enteritidis 07-02760	Serotyp 9,12:g,m:- ; PT 4; humanes Isolat	Rabsch / Tietze, Robert Koch-Institut, Wernigerode
S. Choleraesuis SARB4	2950	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Choleraesuis var. Kunzendorf SARB4	Isolation 1986 aus Schwein, raue Isoform	M. Achtman, University Cork, GB
S. Choleraesuis A50	5530	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Choleraesuis A50	Serotyp 6,7:-:1,5	J. E. Olsen, University of Copenhagen, Denmark [483]
S. Dublin SARB12	4803	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Dublin SARB12	Serotyp 9,12:g,p:- ; Isolation 1986 aus Rind, Kan ^R	M. Achtman, University Cork, GB
S. Gallinarum G9	5534	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Gallinarum biovar Gallinarum G9	Serotyp 9,12:-:-	J. E. Olsen, University of Copenhagen, Denmark [483]
S. Pullorum K525/02	6114	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Gallinarum biovar Pullorum K525/02	Serotyp 9,12:-:-	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven

Mutanten				
ST $\Delta mppA$ $\Delta ampG$	6019	ST SL1344, $\Delta mppA$ $\Delta ampG::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST $\Delta mepA$	5006	ST SL1344, $\Delta mepA::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST $\Delta flhDC$	6768	ST SL1344, $\Delta flhDC::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST \DeltafliD	7132	ST SL1344, $\DeltafliD::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST \DeltafliC	5144	ST SL1344, $\DeltafliC::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST \DeltafljB	5146	ST SL1344, $\DeltafljB::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
ST $\DeltafliC \DeltafljB$	5214	ST SL1344, \DeltafliC $\DeltafljB::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
SE $\DeltafliC \DeltafljB$	6706	SE, \DeltafliC $\DeltafljB::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit
SD $\DeltafliC \DeltafljB$	6698	SD, \DeltafliC $\DeltafljB::kan$	Str ^R , Km ^R	Diese Arbeit

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme

Die Sero- und Phagentypisierungen erfolgten durch das BfR.

II.3. Plasmide & Vektoren

Für die Herstellung der *Salmonella* Mutanten nach Wanner [535] wurden folg. Plasmide und Bakteriophagen verwendet:

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pCP20	<i>bla cat repA101(ts) cI857(ts) λP_L-FLP⁺</i>	[536]
pKD4	pANTS γ , <i>kan</i> FRT-flankiert, Km ^R	[535]
pKD46	pINT-ts, <i>araC, bla, oriR101, repA101(ts), λ red (gam⁺ bet⁺ exo⁺)</i> , Amp ^R	[535]
P22 HT105/1 int-201		[537]

Tabelle 7: Für die Mutagenese nach Wanner [535] verwendete Plasmide und Bakteriophagen.

II.4. Oligonukleotide (primers)

Sämtliche Oligonukleotide wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt und im Rahmen früherer Arbeiten in der Arbeitsgruppe etabliert bzw. aus Veröffentlichungen entnommen.

Herkunft	Ziel	accession no.	Sequenz (3'→5')	Referenz
H. sapiens	GAPDH	NM_002046	s: GAGTCAACGGATTTGGTCGT as: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	[538]
	IL-1 β	NM_000576	s: TTGTTGCTCCATATCCTGTCC as: CACCTTCTTTCCCTTCATCTTTG	Diese Arbeit
	IL-6	NM_000600	s: TGAGGAGACTTGCCTGGTGA as: CTGCAGGAACTGGATCAGGA	mod. n. [539]
	IL-8	NM_000584	s: CAAAACTTCTCCACAACCCTC as: TCCAAACCTTTCCACCCCAA	mod. n. [540]
	IL-10	NM_000572	s: GAGAACCAAGACCCAGACATC as: GCATTCTTCACCTGCTCCAC	mod. n. [541]
	IL-12p40	NM_002187	s: CAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGAT as: ATGCCATTTCGCTCCAAGAT	mod. n. [542]
	TNF α	NM_000594	s: CTCAGCCTCTTCTCCTTCTGATCG as: TGGGCCAGAGGGCTGATTAGAGA	Diese Arbeit
G. gallus	GAPDH	NM_204305	s: CTGGGAAGCTGTGGAGAGAT as: CAGGTCAGGTCAACAACAGA	[543]
	IL-1 β	NM_204524	s: CTCACAGTCCTTCGACATCT as: GCAATGTTGAGCCTCACTTT	[543]
	IL-6	NM_204628	s: GCTTCGACGAGGAGAAATGC as: GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA	AG Kaspers
	IL-8	NM_205018	s: CTGGCCCTCCTCCTGGTTTC as: TGGCGTCAGCTTCACATCTTG	AG Kaspers
	IL-10	NM_0010044 14	s: CGGGAGCTGAGGGTGAAGT as: CAGCCAAAGGTCCCCTTAAAC	AG Kaspers
	IL-12p40	NM_213571	s: AAAGACTGGGCCAAAAGACAAG as: GCAAAGCGTGGACCACTCA	AG Kaspers

Tabelle 8: Oligonukleotide, die zum Nachweis der mRNA bestimmter Zytokine in der qRT-PCR genutzt wurden.

Ziel	Bezeichnung	Sequenz (3'→5')	Referenz
<i>kan</i> (pKD4)	k1	s: CAGTCATAGCCGAATAGCCT	AG Tedin
	k2	as: CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>fliC</i>	FLICH3P1	s: AGCCCAATAACATCAAGTTGTAATTGATAAGG AAAAGATCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	
	FLICH4P2	as: CCTTGATTGTGTACCACGTGTCGGTGAATCAA TCGCCGATTACATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>fliC</i>	FLICF	s: GGTGAGAAACCGTGGGCAAC	
	FLICR	as: TAAAAAAGGCAGCTTTCGCTG	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>fliB</i>	FLJBH3P1	s: GAGGATTGCTTTATCAAAAACCTTCCAAAAGG AAAATTTTATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	
	FLJBH4P2	as: GAAAAAGCCCCGAATTCACGGGGCTGAATAAA ACGAAATAAATTACATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>fliB</i>	FLJBF	s: GAATTTTAGTCGCTTTTCTCATG	
	FLJBR	as: CATTTACAGCCATACATTC	

<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>flhDC</i>	FLHDH1P1	s: GTGCGGCTACGTCGCACAAAAATAAAGTTGGT TATTCTGGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	FLHCH2P2	as: ACCGCTGCTGGAGTGTTTGTCCACACCGTTTC GGTTAAACAGCCATATGAATATCCTCCTTA
<i>flhDC</i>	FLHDF	s: AGCGCTGCTATGCATTTGAC
	FLHCR	as: GATTAACGCGAAGGCAAGGC
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>fliD</i>	FLIDH1P1	s: ACGCGCTTAACTACTGTTTGAATCAAAAAGGA AGAAGGCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	FLIDH2P2	as: GCTTTGATACCGCTCGCGGTGTACATGGTGA CCTCTGTTATCACATATGAATATCCTCCTTAG
<i>fliD</i>	FLIDF	s: TTGCCTCCAGATTGCCGATA
	FLIDR	as: CCACGCTGACTTGCGCATAA
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>ampG</i>	AMPGH1P1	s: GCAGAAGCCGGTCTGTAGATGCCTATGTCA AGTCAATATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	AMPGH2P2	as: GGTGCTTATTACAACGGCAAATAATGTTTTAC AGCAGGCGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>ampG</i>	AMPGF	s: AGCAAAACGCCCGTTAATAG
	AMPGR	as: CAATTGATGGTTATTAGCC
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>mppA</i>	MPPAH1P1	s: ATTACGTTGTCATTTAACTCATCTTTGAGGAA CTTCTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	MPPAH2P2	as: TGGCTACCTTGCCTTAACAAGAAACAGTA CGCATCAGTGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>mppA</i>	MPPAF	s: ATTTCTTTCTGCTGAAACAA
	MPPAR	as: CTTCTGCCAGCATCAGGCGG
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>mepA</i>	MEPAH1P1	s: GATGTAAAGACAGAGATTCCACGCTGGTA AGAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	MEPAH3P2	as: GTAAAGGTTGATCTTCGCACTCCAGGCTG TCGGCAGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>mepA</i>	MEPAF2	s: CTGCTGCGCCATCGGGCACA
	MEPAR2	as: CAAAAACAGCACCACCAGC

Tabelle 9: Oligonukleotide, die zur Herstellung und Überprüfung der *Salmonella* Mutanten im Rahmen der Mutagenese nach Wanner & Datsenko [535] genutzt wurden.

II.5. Chemikalien, Enzyme, Nukleinsäuren

Agar-Agar, Kobe I	Roth, Karlsruhe, D
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Biotherm™ Taq DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin, D
Borsäure	Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	Roth, Karlsruhe, D
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

dNTP-Mix (2 mM)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
EGTA	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/ ml)	Roth, Karlsruhe, D
Flagellin (FLA-ST Ultrapure, aufgereinigt, <i>S.</i> Typhimurium)	InvivoGen, San Diego, USA
Fötales Kälberserum (FKS) HyClone	Perbio Science, Bonn, D
Glycerin ≥ 98 %, wasserfrei	Roth, Karlsruhe, D
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, recombinant)	Biochrom, Berlin, D
Hefeextrakt, pulv.	Roth, Karlsruhe, D
Histopaque [®] -1077	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kanamycin	Biochrom, Berlin, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe, D
MG-132 (InSolution [™] , Proteasom Inhibitor)	Calbiochem, Bad Soden, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (Plätzchen, NaOH)	Roth, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin / Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin, D
Puromycin	Biochrom, Berlin, D
ProLong [®] Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNasin [®] RNase Inhibitor (40 u/μl)	Promega, Madison, USA
Salzsäure (HCl, 37%)	Roth, Karlsruhe, D
TRIS PUFFERAN [®] Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin / EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%)	Biochrom, Berlin, D
Trypton / Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe, D
Tumor Necrosis Factor α (TNF α , rekombinant, porzin oder human)	Biochrom, Berlin, D
Wasser Rotisolv [®] (H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, D

II.6. Lösungen & Medien

Wasser

Grundsätzlich wurde zur Herstellung von Lösungen bidestilliertes Wasser benutzt. Für Arbeiten mit RNA wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Dazu wurde bidestilliertes Wasser mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (v/v, DEPC) versetzt, geschüttelt, über Nacht inkubiert

und autoklaviert, wobei das DEPC zu Ethanol und Wasser zerfällt.

PCR-Reaktionen wurden mit Rotisolv[®] - Wasser (HPLC Gradient Grade, Roth) erstellt.

Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 20 min bei 121°C, 2 bar im Autoklaven.

Hitzelabile Lösungen wurden durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 bzw. 0,22 µm filtriert.

Allgemeine Lösungen

PBS	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 aus einer 10x PBS-Lösung (Roth)
TBE	108 g/l TRIS, 55 g/l Borsäure, 20 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0)
5x Probenladepuffer	50% Glycerin, 100 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0), 1 mM TRIS-HCl (10 mM Stammlösung, pH 8,0), 0,025 % Bromphenolblau
20x SSC	175,39 g/l NaCl, 88,2 g/l Natriumcitrat, pH7,0
Waschpuffer I	3,5l ddH ₂ O, 1,5l 20x SSC, 2,5ml 10% Triton X-102
Waschpuffer II	4975ml ddH ₂ O, 25ml 20x SSC, 2,5ml 10% Triton X-102

Zellkulturmedien

DMEM / Ham's F12	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)/HAM'S F-12 Salts (1:1) (Biochrom, Berlin, D)
Basal Iscove's	Biochrom, Berlin, D

Nährmedien für die Bakteriologie

Für *S. enterica* wurde LB, Lennox, für Arbeiten mit *E. coli* wurde LB, Miller verwendet.

LB – Medium (nach Miller)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB – Medium (nach Lennox, 1955)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
LB – Agar (nach Lennox, 1955)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar
LB – Topagar (nach Lennox, 1955)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 7 g/l Agar-Agar
LB – Weichagar (nach Lennox, 1955)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Agar-Agar

Der pH-Wert von Lösungen wurde mit Hilfe einer pH-Sonde durch Zugabe von 5 M NaOH oder 37% HCl eingestellt.

II.7. Kits

ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Promega, Madison, USA
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Madison, USA
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent, Böblingen, D
One Color RNA Spike-In Kit	Agilent, Böblingen, D
<i>Power</i> SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent, Böblingen, D
RNase-freies DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

II.8. Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten (2 mm)	PeqLab, Erlangen, D
Glasdeckgläser (Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Halbmikroküvetten	Theodor Karow, Berlin, D
Objektträger (76x26 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen (PP, 50 ml oder 15 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (klar oder braun, 1,5 ml oder 2 ml)	
Serologische Pipetten (Stripette, 10 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Spritzenfilter (0,22 µm oder 0,45 µm Porengröße)	Roth, Karlsruhe, D
Verschlussfolie (RT qPCR) MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Zellkulturflaschen (25 cm ² - oder 75 cm ² - Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Zellschaber	Corning, Schiphol-Rijk, NL
24-well Zellkulturplatten (CellBIND®)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-well Mikrottestplatten (CellBIND® Surface, schwarz / weiß, klarer Boden)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-well Reaktionsplatte (RT qPCR) MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, D

II.9. Geräte

Absauger Vacuboy	neolab, Heidelberg, D
halbautomatisches Absaugesystem	Integra Biosciences, Fernwald, D
Absaugpumpe N735 AN18	KNF Neuberger, Freiburg, D
Agarosegelelektrophoresekammer B1A oder GE-B2	AGS, Heidelberg, D
Autoklav Varioklav 500 EP-Z-MT-FA	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Elektroporator EasyjecT Prima	peqLab, Erlangen, D
Epifluoreszenzmikroskop LEICA CTR6000, DMI6000B	Leica Microsystems, Heerbrugg, CH
Feinwaage BP210S	Sartorius, Göttingen, D
Fotodrucker Geldokumentation P93E	Mitsubishi Electric, Ratingen, D
Geldokumentation UV-Transilluminator UVT 28 MP, Kamera E.A.S.Y. 429 K, Dokumentationssystem RM6	Herolab, Wiesloch, D
Grobwaage BL3100 440-47N	Sartorius, Göttingen, D Kern & Sohn, Balingen, D
Inkubationsschränke CB150	Binder, Tuttlingen, D
Koloniezählgerät 50971	Fisher Scientific, Schwerte, D
Luminometer Synergy™ HT	Bio-Tek, Bad Friedrichshall, D
Magnetrührer Variomag Monotherm	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Mehrkanalpipette mLINe	Biohit, Rosbach, D
NanoDrop 1000	peqLab, Erlangen, D
Netzgerät (Elektrophorese) PS 250	Hybaid, Lexington, USA
pH-Meter 740	Knick, Berlin, D
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Real-Time PCR System StepOnePlus™	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Reinraumwerkbank LaminAir HB 2448 und LB-48-C	Heraeus, Hanau, D
Reinstwassersystem Millipore Simplicity	Millipore, Schwalbach, D
Scanner (Microarray) High-Resolution C	Agilent, Böblingen, D
Schüttelinkubator GFL3031	GFL, Burgwedel, D
Spektrophotometer Ultrospec 3000 pro	Amersham, Freiburg, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, D
Umkehrmikroskop Telaval 31	Zeiss, Jena, D
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Wasserbäder Grant OLS 200 D3006 E-5	CLF Laborgeräte, Emersacker, D GFL, Burgwedel, D Julabo, Seelbach, D
Wippe Roto-Shake Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zählkammer (Neubauer)	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifugen Rotina 46 R 3K30 5415D Avanti J-25	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf, D Beckmann Coulter, Krefeld, D

II.10. Software

EndNote® 7.0	Thomson Reuters, New York, USA
Feature Extraction Software 10.5	Agilent, Böblingen, D
KC4™ Data Analysis Software Vers. 3.6	Bio-Tek, Bad Friedrichshall, D
Microsoft® Office Excel 2003	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft® Office Powerpoint 2003	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft® Office Word 2003	Microsoft, Redmont, USA
ND-1000 Vers.3.6 (Nanodrop)	peqLab, Erlangen, D
Rosetta Resolver®	Rosetta Biosoftware, Cambridge, USA
Pathway-Express	Intelligent Systems and Bioinformatics Laboratory, Computer Science Department, Wayne State University, USA
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Erkrath, D
SPSS 20.0	IBM, München, D
StepOne™ Software Vers. 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt, D

III. METHODEN

III.1. Mikrobiologische Methoden

III.1.1. Bakterienkultur

Die Bakterienstämme wurden für jeden Versuch direkt aus dem Kryostock (-80°C) auf LB-Agarplatten überimpft und über Nacht (ca. 16 Std.) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Je 2 – 4 Kolonien wurden dann zur Inokulation der LB-Bouillon benutzt und ggfs. zur selektiven Anzucht der Mutanten 50 µg/ml Kanamycin zugefügt. Die Inkubation erfolgte im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm bis zu einer optischen Dichte von 2,0 – 2,4 bei $\lambda = 600$ nm (OD_{600}). Das Volumen der Flüssigkultur wurde entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen *Salmonella* – Stämme variiert, um zu gewährleisten, dass die Kulturen nach Ende der Inkubation eine ähnliche OD_{600} aufwiesen.

III.1.2. Bakterienzahlbestimmung

Um näherungsweise die Bakteriendichte in einer Flüssigkultur z.B. für Infektionsversuche schnell zu bestimmen, wurde 1 ml der Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß überführt, die Bakterien bei 16100 x g und Raumtemperatur (RT) pelletiert, in 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums (DMEM / Ham´s oder Iscove´s in Abhängigkeit der verwendeten Wirtszellen) resuspendiert und die optische Dichte einer 1:20 Verdünnung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm photometrisch bestimmt.

Da zuvor ermittelt wurde, dass eine Flüssigkultur von *Salmonella enterica enterica* bei einer OD_{600} von 1,0 in etwa 1×10^9 Bakterien / ml enthielt, ließ sich die Bakteriendichte n, wie folgt, bestimmen:

$$n = 1 \times 10^9 \text{ Bakterien / ml} / OD_{600} \times OD_{600} \times 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Zur genauen Ermittlung der Bakterienzahl / ml wurden parallel Verdünnungen der Ausgangssuspension in 150 mM NaCl erstellt und fünffach je 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden die Koloniebildenden Einheiten (KbE) gezählt, gemittelt und nach Multiplikation mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor die Bakterienzahl / ml in der Ausgangssuspension ermittelt.

III.1.3. Bakterielle Wachstumskurven

Um Wachstumskurven verschiedener *Salmonella* Stämme zu erstellen und daraus Generationszeiten zu berechnen, zog man die Stämme entsprechend III.1.1 bis zu einer OD_{600}

~ 2,0 an. Nach Bestimmung der optischen Dichte für jeden Stamm wurde eine Verdünnung von 1×10^7 Bakterien / ml in PBS erstellt und mit je 10 μ l dieser Suspension ein well einer 96-well Platte mit 120 μ l LB-Medium oder Zellkulturmedium (entspricht 10000 Bakterien / well) beimpft. Mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT wurde die optische Dichte der wells über 24 Std. bei 37°C unter ständigem Schütteln alle 18 min gemessen und Wachstumskurven erstellt.

III.1.4. Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Zur längerfristigen Lagerung wurde 1 ml Flüssigkultur der Bakterien in einer spät-exponentiellen Phase ($OD_{600} > 2,5$) mit 300 μ l 80% Glycerol gemischt, mit Hilfe eines Aluminium-Blocks schnell auf -80°C gekühlt und bei dieser Temperatur aufbewahrt.

III.1.5. Mutagenese nach Wanner [535]

Um in *Salmonella* bestimmte Gene zu deletieren, wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese nach Wanner & Datsenko [535] entsprechend des Protokolls angewandt und soll hier nur kurz beschrieben werden. Dabei wird mit Hilfe der Red-Rekombinase des Phagen λ , das auf dem Helferplasmid pKD46 codiert ist, das zu deletierende Gen in den Bakterien mittels homologer Rekombination durch eine Kanamycin-Resistenzkassette, die von homologen Sequenzen des zu deletierenden Gens flankiert wird, ersetzt.

Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde per PCR aus dem Plasmid pKD4 mittels Primer – Paaren amplifiziert, die 3' bzw. 5'-Überhänge besaßen, die komplementär zu Sequenzen des zu deletierenden Gens waren (z.B. *fliC*; Primer-Bezeichnung: FLICH3P1, FLICH4P2). Das PCR-Produkt wurde dann mittels Agarosegelelektrophorese (siehe III.3.1) hinsichtlich der erwarteten Länge hin überprüft und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend elektroporierte man das PCR-Produkt in elektrokompente Bakterien des Empfängerstamms *S. enterica enterica* Typhimurium LT2 SGSC 1412 (siehe III.1.7), wo mit Hilfe der λ Red Rekombinase aus pKD46 eine homologe Rekombination zwischen dem eingebrachten PCR-Produkt und der partiell homologen Sequenz des zu deletierenden Gens stattfand.

Die elektroporierten Bakterien wurden zu je 100 μ l auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Kanamycin-resistente Kolonien wurden dann per Verdünnungsausstrich aufgereinigt, wieder über Nacht bebrütet und von den Einzelkolonien Kochlysate hergestellt (siehe III.1.10). Mittels anschließender PCR mit einem Primer komplementär zur Kanamycin-Resistenzkassette (bezeichnet als K1 (vordere Flanke) bzw. K2 (rückwärtige Flanke)) und einem zur angrenzenden Region des zu deletierenden

Zielgens (z.B. für *fliC*: FLICF (vordere Flanke), FLICR (rückwärtige Flanke)) ließ sich die Insertion in der DNA des Kochlysats nachweisen. Durch Transduktion mit dem Phagen P22 HT105/1 int-201 (siehe III.1.9) wurde die Mutation dann wieder in den ursprünglichen Wildtyp-Stamm *S. enterica enterica* Typhimurium SL1344 überführt, um Sekundärmutationen zu vermeiden. Im Falle der Einführung einer zweiten Mutation transformierte man die Stämme mit dem Plasmid pCP20 [536], um die Kanamycin-Resistenzkassette durch eine FLP-Rekombinase wieder zu entfernen. Durch Selektion bei 37°C wurde die FLP-Rekombinase erst induziert und im Laufe des weiteren Wachstums wieder dank der Temperatur-sensiblen Replikation aus den Bakterien entfernt.

III.1.6. Herstellung elektrokompenter Bakterien

Als Empfängerstamm für die Mutagenese nach Wanner wurde eine Vorkultur von *S. enterica enterica* Typhimurium LT2 SGSC 1412, das das Temperatur-sensible Helferplasmid pKD46 enthält, in 6 ml LB-Medium über Nacht bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Von dieser Vorkultur aus impfte man im Verhältnis 1:100 eine 90 ml Hauptkultur in LB-Medium an und ließ diese bei 30°C, 200 rpm schüttelnd bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ wachsen. Nach Zugabe von 5 mM Arabinose (Endkonzentration) zur Induktion der λ Red Rekombinase zog man die Kultur unter gleichen Bedingungen weiter bis zu einer $OD_{600} > 2,0$. Je 45 ml wurden in zwei 50 ml – Röhren überführt und die Bakterien für 10 min bei 8000 x g und 4°C pelletiert. Von diesem Punkt an wurde auf Eis gearbeitet.

Man dekantierte den Überstand und resuspendierte die Bakterienpellets in 2 x 40 ml eiskaltem 10% Glycerol in Wasser. Dann zentrifugierte man die Bakterien erneut bei 8000 x g, 4°C für 10 min und wiederholte den Waschschrift ein weiteres Mal. Danach wurden die Bakterien abwechselnd in 10% Glycerol resuspendiert und, wie folgt, mit abnehmender Drehzahl für je 10 min bei 4°C pelletiert: 1. 6000 x g, 2. 3000 x g, 3. 1500 x g.

Im Anschluss dekantierte man wieder den Überstand und resuspendierte die Bakterienpellets in insgesamt 2 ml 10% Glycerol. Die Suspension wurde in Aliquots zu je 100 μ l in vorgekühlten Eppendorfgefäßen im vorgekühlten Aluminiumblock schnell bei -80°C eingefroren und gelagert.

III.1.7. Elektroporation

Die elektrokompenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und zu je 100 μ l Bakterien-suspension 200 – 500 ng des PCR-Produkts bzw. der DNA pipettiert. Den Mix überführte man dann, ohne Luftblasen zu erzeugen, in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette, die man in den Elektroporator EasyjecT Prima (PeqLab) einsetzte. Die Elektroporation

erfolgte dann entsprechend den Anweisungen des Herstellers bei 2,5 kV, 25 μ F, 400 Ω . Direkt danach ergänzte man das Volumen in der Küvette auf 1 ml mit LB-Medium und überführte die Suspension in ein Eppendorfgefäß, das man für 1 Std. bei RT inkubierte. Zur Selektion der Transformanten wurden je 100 μ l auf Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank bebrütet.

III.1.8. Herstellung von Lysaten des Bakteriophagen P22

Um eine Kanamycin-Resistenzkassette mit flankierenden Sequenzen zu einem zu deletierenden Gen von einer durch die Wanner-Mutagenese bereits hergestellten *Salmonella* Mutante als Donorstamm in einen neuen Akzeptorstamm zu übertragen und durch ortsspezifische homologe Rekombination die entsprechenden Gene *fliC*, *fljB*, *ampG*, *mppA* oder *mepA* dabei zu deletieren, wurde der Bakteriophage P22 HT105/1 int-201 genutzt [537]. Dieser Phage ist unfähig zu integrieren und kommt daher nur im lytischen Zyklus vor. Zur Herstellung der Phagen wurde eine Kolonie des *Salmonella* Donorstamms mit der entsprechenden Deletion zur Inokulation von 6 ml L-Broth (mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$) benutzt und bei 37°C, 200 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer $OD_{600} = 0,1 - 0,3$ angezogen. Nacheinander wurden je 60 μ l einer 1 M $MgSO_4$ und 0,5 M $CaCl_2$ – Lösung sowie 25 μ l der Bakteriensuspension in 6 ml verflüssigten Top-Agar pipettiert und sofort auf eine LB-Agarplatte gegossen. 95 μ l L-Broth (10 mM $MgSO_4$, 5 mM $CaCl_2$) wurden mit 5 μ l P22 HT105/1 int-201 Phagenlysat gemischt und auf dem erhärteten Top Agar gleichmäßig verteilt. Die Oberfläche der Platte trocknete man dann bei 37°C im Brutschrank und bebrütete sie geschlossen weiter über Nacht.

Top-Agar, der Zonen lysierter Bakterien zeigte, wurde von der Agarplatte abgelöst, in ein 15 ml – Röhrchen überführt und 2 ml L-Broth (10 mM $MgSO_4$, 5 mM $CaCl_2$) sowie 50 μ l Chloroform hinzugefügt. Die Diffusion der Phagen aus dem Agar erfolge dann über Nacht bei 4°C. Um den Phagen-haltigen Überstand vom Agar zu trennen, wurde das Röhrchen für 15 min bei 6000 x g, RT zentrifugiert. 750 μ l des Lysats überführte man in ein Eppendorfgefäß, fügte 10 μ l Chloroform zu und lagerte das Phagen-haltige Lysat bei 4°C.

III.1.9. Generalisierte Transduktion von Bakterien

Zur Transduktion des *Salmonella* Empfängerstammes, in dem ein bestimmtes Gen deletiert werden soll, mit dem Phagen P22 wurden 6 ml LB-Bouillon (mit 10 mM $MgSO_4$ und 5 mM $CaCl_2$) mit einer Kolonie des über Nacht auf einer Agarplatte angezogenen *Salmonella* Stammes inokuliert und bei 37°C und 200rpm in einem Schüttelinkubator bis zu einer $OD_{600} > 2,0$ wachsen gelassen. 100 μ l der Flüssigkultur wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 1

- 2 µl des Phagenlysats hinzugefügt. Die Transduktion erfolgte dann während einer 15 - 20-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Um weitere Infektionen zu verhindern, wurde der Kultur 12 µl 200 mM EGTA in Wasser zugefügt und so das für die Phagenadsorption notwendige Ca²⁺ gebunden. Das Volumen wurde auf 1 ml mit 20 mM EGTA in LB-Bouillon aufgefüllt und je 100 µl auf LB-Agarplatten plattiert, das zur Selektion von transduzierten Bakterien 50 µg/ml Kanamycin enthielt. Die Kolonien wurden über Nacht bei 30°C im Brutschrank bebrütet.

Am folgenden Tag wurden mindestens 2 Kolonien mit runder, glatter Morphologie zum Ausschluss infizierter Zellen jeweils auf einer Grünplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C im Brutschrank bebrütet. Infizierte und absterbende Zellen verändern in ihrer Umgebung den pH-Wert und führen damit zu einem Farbumschlag von grün-gelblich zu blau, so dass sie sich von transduzierten aber uninfizierten Bakterien abheben. Von jeder Platte wurde eine Kolonie ohne Blaufärbung in 6 ml LB-Bouillon (50 µg/ml Kanamycin) überimpft und bei 37°C, 200 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD > 2,0 angezogen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen zielgerichteten Insertion der Kanamycin-Kassette wurden Kochlysate des Stammes (siehe III.1.10) und eine Kryokultur zur Lagerung bei -80°C hergestellt (siehe III.1.4).

III.1.10. Herstellung bakterieller Lysate (Kochlysate)

Um schnell Lysate von Bakterien für genetische Untersuchungen mittels PCR herzustellen, wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ > 2,0 für 5 min bei 16100 x g, RT zentrifugiert, das Bakterienpellet in 100 µl dest. Wasser resuspendiert und für 5 min bei 99°C erhitzt. Das Lysat wurde danach bei -20°C gelagert.

III.1.11. Motilitätstest

Um neben der genotypischen Überprüfung mittels PCR auch phänotypisch die Wirkung der Deletion von *fliC* und/oder *fljB* auf die Motilität der Mutanten zu ermitteln, wurden Flüssigkulturen bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ = 1,0 angezogen bzw. gegebenenfalls darauf eingestellt und mit Hilfe einer Impfnadel in LB-Weichagarplatten überimpft. Die Platten wurden für 16 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert und der Durchmesser des Schwärmhofs um die Einstichstelle zwischen Mutante und Wildtyp verglichen.

III.2. Zellbiologische Methoden

III.2.1. Kultur eukaryotischer Zellen

Monocyten- / Makrophagen – ähnliche Zellen (3D4/31, PLN/C2, HD-11, THP-1, U937) wurden in Basal Iscove´s mit 10% FKS, Epithelzellen (IPEC-J2, LoVo, Caco-2) in DMEM / Ham´s F12 mit 10% FKS in 25 cm²- oder 75 cm² - Flaschen im Brutschrank bei 37°C, einem CO₂ - Gehalt von 5% sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Humane Primär-makrophagen kultivierte man abweichend in Basal Iscove´s mit 5% FKS sowie 5% humanem Serum. Das Serum wurde vor der Zugabe für mindestens 30 min bei 56°C inaktiviert und damit z.B. jegliche Komplement-Reaktionen unterbunden.

III.2.2. Subkultivierung eukaryotischer Zellen

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen mindestens alle 7 Tage, in der Regel jedoch alle 3 – 4 Tage passagiert. Bei adhärenen Zelllinien sog man dazu das Kulturmedium ab und wusch die Zellschicht mit 5 ml PBS. Nach Zugabe von 5 ml 0,05% Trypsin 0,02 % EDTA (in PBS, pH 7,2) zur proteolytischen Spaltung von Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Kontakten inkubierte man die Zellen für 3 – 10 min bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank. Um die zellschädigende Wirkung des Trypsin / EDTA zu mindern, wurde sofort nach dem Ablösen 5 ml Medium (Iscove´s bzw. DMEM) zugefügt und die Zellsuspension in 15 ml - Röhren überführt. Für 75 cm² - Flaschen wurden 10 ml Trypsin / EDTA und 10 ml Medium benutzt. Die Zellen wurden dann für 5 min bei 155 x g, RT abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Medium (Iscove´s bzw. DMEM mit 10% FKS, ggfs. Antibiotikum) resuspendiert. Anschließend säte man sie 1:10 bis 1:100 verdünnt in eine neue Flasche mit 5 ml Medium (Iscove´s bzw. DMEM mit 10% FKS, ggfs. Antibiotikum) ein, so dass sie nach der gewünschten Zeit wieder eine konfluente Zellschicht bildeten.

Abweichend von diesem Protokoll wurden Suspensionszellen wie U937 direkt in 15 ml - Röhren überführt, wie oben abzentrifugiert, in Iscove´s (mit 10% FKS) resuspendiert und 1:20 für eine Kultur von 7 Tagen bzw. 1:10 für eine 3 – 4 tägige Kultur in eine neue Flasche eingesät.

Für Infektionsversuche (siehe III.2.7) wurden die Zellen in 12-, 24- oder 96-well Platten eingesät und U937 zusätzlich zur Adhärenz-Induktion für 24 Std. mit 50 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) aktiviert. Anschließend wurde das PMA - haltige Medium gegen Iscove´s mit 10% FKS ersetzt.

Für mikroskopische Untersuchungen wurden vor dem Zusatz der Zellen, die Vertiefungen der 24-well Platte mit Deckgläsern (d = 12 mm) ausgestattet.

III.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zelldichte in einer Zellsuspension zu ermitteln, wurden je nach zu erwartender Zellzahl eine 1:10 oder 1:100 Verdünnung der Suspension in Medium erstellt, 15 µl dieser Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellen in den vier großen Eckquadraten gezählt. Die mittleren Zellzahlen pro Großquadrat wurden mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen / ml) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zellzahl / ml in der Ausgangszellsuspension zu bestimmen.

III.2.4. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Um die Zellen für längere Zeit zu lagern, wurden am Ende einer Subkultivierung je 1 ml Zellsuspension mit 5 – 10% DMSO in einem Nunc – Kryoröhrchen gemischt und über Nacht schnell bei -80°C in einem vorgekühlten Aluminiumblock eingefroren. Am nächsten Tag überführte man die Röhrchen in flüssigen Stickstoff und lagerte sie bei -196°C .

Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in eine 25 cm² - Flasche mit angewärmtem Medium (5 ml Iscove´s oder DMEM mit 10% FKS und 1:100 Penicillin / Streptomycin) überführt. Nach 24 Std. im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, um das DMSO und Zellreste zu entfernen.

III.2.5. Untersuchung auf Mykoplasmen

Um sicher zu stellen, dass die Zellkulturen frei von Mykoplasmen waren, die insbesondere Experimente im Bereich der Immunantwort auf eine *Salmonella* – Infektion beeinträchtigt hätten, wurden die Zelllinien in regelmäßigen Abständen in einem institutsinternen, mikrobiologischen Diagnostiklabor auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dazu wurde ein Aliquot des Zellkulturüberstandes mit einigen Zellen in einer PCR auf das Vorhandensein von Mykoplasmen-DNA analysiert.

III.2.6. Isolation und Kultur humaner Primärmakrophagen

Humane Primärmakrophagen wurden aus humanem Spenderblut vom Deutschen Roten Kreuz (DRK) gewonnen. Zuvor wurde bereits beim DRK aus Vollblut durch die sogenannte „Inline-Filtration“ ein Konzentrat aus Leukozyten und Thrombozyten mit einem Volumen von 60 – 80 ml abgetrennt (*Quelle: DRK*), das immer noch einen gewissen Anteil an Plasma und Erythrozyten enthielt. Dieses Konzentrat wurde 1:1 mit PBS versetzt und für die folgende

Gradienten-Dichtezentrifugation 15 ml Histopaque[®]-1077 (analog zu Ficoll) in 50 ml Röhren mit 30 ml der Blut / PBS – Lösung überschichtet. Die Auftrennung der Komponenten erfolgte während einer 25-minütigen Zentrifugation bei 700 x g, RT ohne aktive Bremse und mit geringer Beschleunigung der Zentrifuge. Vom Gradienten wurden etwa 2/3 des Plasmas verworfen und der sogenannte *buffy coat* bestehend aus Leukozyten in neue 50 ml Röhren auf Eis überführt. Zur Abtrennung verbliebenen Plasmas und restlicher Thrombozyten wurden 5 ml des *buffy coats* auf 30 ml mit eiskaltem PBS aufgefüllt und bei 225 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift der Zellpellets in 30 ml eiskaltem PBS. Anschließend wurden die Pellets in 40 ml Iscove´s (mit 10% FKS) resuspendiert, vereint und die Zellzahl entsprechend III.2.3 bestimmt. Aus einem „*buffy coat*“ – Blutbeutel konnten in der Regel etwa 1×10^9 Leukozyten isoliert werden. Zur weiteren Trennung primärer Monozyten und Makrophagen von Lymphozyten etc. wurden je 1 ml der Zellsuspension in ein well einer 12-well Platte (ohne CellBIND[®] Beschichtung) pipettiert und für 90 min im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wie Lymphozyten wurden mit 37°C - warmen Iscove´s von der adhärennten Zellschicht der Monozyten / Makrophagen gespült und verworfen. Die Monozyten kultivierte man für 6 Tage in Iscove´s mit 5% FKS / 5% humanem AB-Serum. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Plattenoberfläche gelöst, gesammelt und erneut gezählt. Dann säte man 1×10^6 Zellen / well in 24-well Platten ein und differenzierte sie für 6 - 7 Tage in Iscove´s mit 5% FKS / 5% humanem AB-Serum und 5 µg/ml GM-CSF aus. Anschließend wechselte man das Medium erneut und kultivierte die Zellen in Wachstumsfaktor-freiem Medium für weitere 1 - 2 Tage im Brutschrank bis zum Infektionsversuch.

III.2.7. Infektionsversuch oder Gentamicin - Protection - Assay

Der Infektionsversuch stellte neben der Bestimmung von Invasionsraten und intrazellulärer Persistenz der *Salmonella* Serovare in den verschiedenen Wirtszelllinien auch die Grundlage für eine Reihe weiterführender Versuche wie dem NF-κB – Aktivierungsassay, dem Zytotoxizitätsassay, Zytokinexpressionsuntersuchungen und genomweiter Genexpressionsanalysen dar.

Die für die Infektion vorgesehenen Bakterienstämme wurden am Vortag auf Agarplatten (ggfs. mit Antibiotikum zur Selektion) ausgestrichen, über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und wie in III.1.1 geschildert als Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ ~ 2,0 angezogen. Parallel dazu wurde bei den eukaryotischen Zellen das Kulturmedium mindestens 1 Std. vor der Infektion gegen 500 µl / well (24-well Platten) bzw. 50 µl / well (96-well Platten) frisches

37°C warmes Medium (Iscove´s bzw. DMEM mit 10% FKS) gewechselt.

Wie unter III.1.2 beschrieben, ermittelte man grob die Bakterienzahl / ml Medium in der Ausgangssuspension und stellte diese auf 1×10^9 Bakterien / ml ein. Von dieser Suspension ausgehend wurden in Verdünnungsschritten von 1:10 die für die jeweilige Anwendung notwendige Bakteriendichte erstellt, um ein bestimmtes Bakterien / Wirtszellverhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) zu gewährleisten (siehe Tabelle 10).

Anwendung	Eingesetzte Platte	MOI	Eingesetzte Bakteriendichte
Infektionsversuch	24-well	0,2 - 1	1×10^6 / ml
Zytotoxizitätsassay	96-well	2 – 10 und 20 – 100	1×10^6 /ml, 1×10^7 / ml
NF-κB Aktivierungsassay	96-well	2 – 10 und 20 – 100	1×10^6 /ml, 1×10^7 / ml
Zytokinexpression / Genomweite Genexpression	24-well	2 – 10	1×10^7 / ml

Tabelle 10: Auflistung der eingesetzten Zellkulturplatten, Bakterienkonzentrationen und daraus folgender MOIs für bestimmte Anwendungen

Von diesen Lösungen wurden je 100 µl / well pipettiert, für die uninfizierte Probe entsprechend 100 µl / well Medium (Iscove´s oder DMEM mit 10% FKS) eingesetzt. Weitere Verdünnungen erfolgten, wie unter III.1.2 geschildert, um am Folgetag die für die Infektion tatsächlich eingesetzte Bakterienzahl zu bestimmen.

Um eine gleichzeitige Infektion zu gewährleisten, wurden die Bakterien für 10 min bei 250 x g, RT auf die Wirtszellen zentrifugiert und die Platten anschließend bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach 60 min wurde bei Epithelzellen, nach 30 min bei Makrophagen das Medium gegen 37°C - warmes Medium (Iscove´s bzw. DMEM mit 10% FKS) mit 50 µg/ml Gentamicin gewechselt, um extrazellulär verbliebene Bakterien abzutöten. Dieses wiederum wechselte man nach weiteren 60 min gegen Medium mit 10 µg/ml Gentamicin, das ein Abtöten über Nacht zwischenzeitlich wieder freigesetzter Bakterien zu sicherstellt.

1,5 bzw. 2 (bei Makrophagen bzw. Epithelzellen), 4 und 24 Std. nach der Infektion wurde die intrazelluläre Keimzahl bestimmt, indem die entsprechenden wells mit 500 µl PBS (24-well Platten) bzw. 100 µl PBS (96-well Platten) gewaschen und die Wirtszellen nach Zugabe von 500 µl (24-well Platten) bzw. 100 µl (96-well Platten) 0,1% Triton X-100 (in Wasser) für etwa 2 min lysiert wurden. Das Lysat wurde entsprechend der zu erwartenden Keimzahl in 150 mM NaCl 1:10 bis 1:10.000 verdünnt und je 100 µl der Verdünnung fünffach auf LB-Agarplatten ausplattiert. Nachdem die Platten über Nacht bei 30°C inkubiert wurden, konnte

die Zahl koloniebildender Einheiten bestimmt und unter Einbezug des Verdünnungsfaktors die Zahl intrazellulärer Bakterien pro ml Lysat berechnet werden.

III.2.8. Transduktion eukaryotischer Zellen mit lentiviralen NF- κ B

Reporterkonstrukten

Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B als Schlüsselfaktor für eine Immunantwort der Wirtszelle auf eine Infektion zu untersuchen, wurden mit Hilfe des Cignal™ Lenti NF κ B Reporter Systems von S.A. Biosciences stabile NF- κ B Reporterzelllinien auf Grundlage der für die übrigen Versuche verwendeten Epithel- und Makrophagenzelllinien erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Reporterzelllinien von IPEC-J2, 3D4/31, THP-1, LoVo und HD-11 hergestellt.

Dazu wurden die Zellen in 96-well Platten eingesät und bis zu einer Konfluenz von 40 – 80% (umso höher die Wachstumsrate, desto niedriger die Konfluenz) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Zur Bestimmung der einzusetzenden lentiviralen Partikel bestimmte man die Zellzahl pro well, indem 2 wells pro Zelllinie mit 100 μ l / well PBS gewaschen und die Zellen mit 100 μ l / well 0,05% Trypsin 0,02 % EDTA (in PBS, pH 7,2) abgelöst und vereinzelt wurden. Die Zellen zählte man entsprechend III.2.3 mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und ermittelte so die Zellzahl pro well. Anhand dieser Zahl konnte die einzusetzende Virenmenge und unter Berücksichtigung des Virustiters das einzusetzende Volumen der Virusstocklösung berechnet werden, so dass sich eine MOI von 10 und 25 (Viren pro Wirtszelle) ergab. Das alte Kulturmedium wurde verworfen und die ermittelten Volumina der Virensuspension in die jeweiligen wells pipettiert. Dann füllte man die wells auf 50 μ l mit Medium (Iscove´s oder DMEM mit 10% FKS) auf und fügte zur Steigerung der Transduktionseffizienz das SureENTRY Transduktionsreagenz zu einer Endkonzentration von 4 bzw. 8 μ g/ml hinzu. Während einer 20-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte die Transduktion der Zielzellen. Anschließend wechselte man das Transduktionsmedium gegen 100 μ l/well Iscove´s oder DMEM mit 10% FKS und kultivierte die Zellen wieder im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit.

Nach 2 – 4 Tagen wurde das Medium erneut gegen Medium mit 10% FKS und 5 μ g/ml Puromycin zur Selektion transduzierter Zellen ersetzt. Nachdem die transduzierten Zellen unter Puromycin-Selektion wieder konfluent angewachsen waren, wurden sie in 25 cm² - Flaschen passagiert. Die wiederum konfluent angezogenen Zellen wurden erneut subkultiviert (siehe III.2.2) und als Kryokultur eingefroren (siehe III.2.4). Zudem pipettierte man je 20 μ l Zellsuspension in zehn wells einer 96-well Platte und füllte bis zu 100 μ l mit Medium

(Iscove´s oder DMEM mit 10% FKS, 5 µg/ml Puromycin) auf. Um daraus zehn Einzelzellklone zu erhalten, wurden diese Zellen desweiteren siebenmal in Schritten von 1:20 verdünnt und eingesät. Die Zellen wurden wiederum solange kultiviert, bis im letzten well der Verdünnungsreihe mit Zellen diese annähernd konfluent angewachsen waren. Klone, die ein langsames Wachstum aufwiesen, wurden verworfen. Die restlichen Klone wurden in 25 cm² - Flaschen überführt und fortan in Medium mit 5 µg/ml Puromycin kultiviert.

Neben der Selektion auf Wachstumsdefizite wurden die Klone hinsichtlich ihrer Reporterfunktion untersucht und selektiert. Dazu wurden die Zellen wie unter III.2.7 geschildert mit *S. Typhimurium* SL1344 infiziert und die NF-κB Aktivierung der infizierten im Verhältnis zu den uninfizierten Zellen ermittelt (siehe III.2.9). Die 2 – 3 Klone mit der größten Differenz zwischen infizierten und uninfizierten Zellen wurden für weitere Versuche mit *Salmonella* Serovaren und Mutanten weiter kultiviert und als Kryokultur gelagert, die restlichen Klone verworfen.

III.2.9. Bestimmung der NF-κB Aktivierung

Die Aktivierung von NF-κB als Transkriptionsregulator wichtiger immunrelevanter Gene für z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurde mit Hilfe der nach III.2.8 hergestellten Reporterzelllinien infolge einer Infektion mit den verschiedenen *Salmonella* Serovaren und Mutanten untersucht. Hierbei nutzt man das in das Wirtszellgenom integrierte sogenannte *NF-κB responsive element*, das Bindungsstellen für NF-κB besitzt, und als Folge der Bindung die Transkription einer Firefly – Luziferase induziert, deren Aktivität sich bei Zugabe eines entsprechenden Luziferin-Substrats nach der Lyse der Zellen mittels eines Luminometers quantifizieren lässt.

Die Infektion der Zellen erfolgte im 96-well Format entsprechend der Beschreibung unter III.2.7. Parallel wurden Zellen einer Platte mit 4 wells pro Serovar / Mutante und Zeitpunkt zur NF-κB Aktivierung und einer weiteren Platte mit 2 wells pro Serovar / Mutante und Zeitpunkt zur intrazellulären Keimzahlbestimmung infiziert. Die Probennahme (Keimzahlbestimmung sowie Messung der Luziferase-Aktivität) erfolgte 2, 4 und 24 Std. *post infectionem* (p.i.). Die Keimzahlbestimmung erfolgte wie unter III.2.7 beschrieben.

Zur Messung der Luziferase-Aktivität und damit indirekt zur Bestimmung der Aktivierung von NF-κB wurde das Volumen in den zu untersuchenden wells auf 25 µl / well gebracht und entsprechend der Herstelleranweisungen des Bright-Glo™ Luciferase Assay System 25 µl / well Bright-Glo™ Luciferase Reagenz mit einer Mehrkanalpipette hinzugefügt, für 10 s auf einem Plattenschüttler gemischt, etwaige Luftblasen entfernt und für 2 min bei RT inkubiert.

Zuerst erfolgte eine Testmessung zur Feststellung der optimalen Verstärkung des Signals im Luminometer Synergy™ HT. 5 min nach Zugabe des Reagenzes erfolgte dann die eigentliche Messung der Chemolumineszenz, die als *relative light units* (RLU) ausgegeben wurde.

III.2.10. Zytotoxizitätsmessung

Um zu untersuchen, inwiefern die verschiedenen *Salmonella* Serovare zytotoxische Effekte in ihren Wirtszellen auslösen oder induzieren, wurde mit Hilfe des CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assays (Promega) die Membranintegrität infizierter und uninfizierter Zellen untersucht.

Wiederum wurden die Zellen wie unter III.2.7 beschrieben mit den verschiedenen *Salmonella* Serovaren und Mutanten infiziert und 24 Std. p.i. die Akkumulation der Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand als Nachweis zerstörter und permeabler Zellmembranen bestimmt.

Zuerst wurde hierzu als Positivkontrolle 2 µl Lysepuffer pro 100 µl Medium in 3 wells mit uninfizierten Zellen pipettiert und die Platte für 10 s auf einem Plattenschüttler gerüttelt. Die Platte wurde für 20 – 30 min auf Raumtemperatur gebracht und dann das Volumen in den wells auf 50 µl / well reduziert. Mit einer Mehrkanalpipette wurden 50 µl / well CytoTox-ONE™ Reagenzes hinzugefügt, die Platte für 30 s geschüttelt und für 10 min bei RT, dunkel inkubiert. Anschließend fügte man 25 µl / well einer Stop-Lösung hinzu, um den reduktiven Umsatz des Farbstoffs Resazurin in Anwesenheit von NADH, das bei der Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die LDH aus NAD⁺ gebildet wird, zum fluoreszierenden Resorufin zu unterbrechen. Etwaige Luftblasen wurden entfernt.

Die Messung der Fluoreszenz (in RLU) erfolgte mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 530$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 590$ nm. Nach Abzug der Fluoreszenz der nicht-infizierten Proben von den infizierten konnte die prozentuale Zahl abgestorbener Zellen bezogen auf die Positivkontrollen (lysierte Zellen) berechnet werden.

III.3. Molekularbiologische Methoden

III.3.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Prüfung von PCR-Produkten und aufgereinigter RNA wurden die Nukleinsäureproben elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurde der prozentuale Anteil an Agarose in 1 x Tris-Borat (TBE)- Laufpuffer entsprechend der Empfehlungen in Sambrook *et al.* (2001) gewählt [544]. In der Regel wurden 0,8 – 2,0 % Agarosegele verwendet; die Auftrennung von Gesamt-RNA Extrakten

erfolgte in 1,2% Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 100 ml TBE-Puffer erhitzt und gelöst. Zu der auf etwa 60°C abgekühlten Lösung pipettierte man 5 µl 1% Ethidiumbromid, um die Nukleinsäuren später im Gel zu markieren. Die Agaroselösung wurde in die Gelträger gefüllt, die Kämme eingesetzt und nach Erhärten des Gels dieses in eine horizontale Gelkammer mit TBE-Puffer eingelegt.

Die Proben (in der Regel bei PCR-Produkten 1:10 Volumen der Probe, bei RNA 2 – 5 µl des RNA-Extraktes) wurden mit 1 – 2 µl 6x Probenladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurden 5 µl des Größenstandards *100 bp-DNA-Leiter, extended* (Roth) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von $U = 100 - 120 \text{ V}$ oder 10 V/cm Gellänge.

Die Visualisierung der Nukleinsäurebanden anhand des interkalierenden Ethidiumbromids erfolgte am UV-Transilluminator.

III.3.2. Extraktion von RNA (inkl. DNase Verdau)

Um die Genexpression bestimmter immunrelevanter Gene bei einer Infektion zu untersuchen oder Microarray-basierte genomweite Genexpressionsanalysen durchzuführen, wurde RNA aus infizierten und uninfizierten Zellen infolge eines Infektionsversuches (siehe III.2.7) in 24-well Platten 4 Std. p.i. extrahiert. Dabei wurden die Infektionen als Triplikate (d.h. 3 wells pro Ansatz) durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte säulenbasiert mit Hilfe des RNeasy Qiagen-Kits entsprechend der Angaben des Herstellers.

Grobgefasst wurden die Zellen lysiert, das Lysat mit 70% Ethanol und Chloroform versetzt und auf eine Säule geladen. Nachdem die an das Säulenmaterial gebundene RNA gewaschen wurde, fügte man eine DNase (Qiagen) hinzu und verdaute für 30 min bei RT die ebenfalls an die Säule gebundene DNA. Die DNA-Fragmente wurden ebenfalls von der Säule gewaschen und die RNA mit 30 µl DEPC-Wasser von der Säule eluiert. Die RNA wurde bis zu einem Tag bei 4°C, ansonsten längerfristig bei -80°C gelagert.

Zur Untersuchung auf Degradation und Fragmentation wurde die RNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe III.3.1) und hinsichtlich der 18S- und 26S- rRNA Banden sowie Abbauprodukten nahe der Lauffront überprüft.

III.3.3. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentrationen in RNA- und DNA-Proben wurde mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen. Die Nukleinsäurebasen absorbieren Licht bei 260nm, so dass eine $OD_{260} = 1$ etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA), 37 µg/ml einzelsträngiger DNA (ssDNS, z.B. cDNA) oder 40 µg/ml RNA

entspricht. 2 µl der Probe wurde in das Spektrophotometer geladen, die Absorption bei 260, 280 und 230 nm gemessen und anhand des Extinktionskoeffizienten die Nukleinsäurekonzentration berechnet. Die E_{260} / E_{280} Quotienten ermöglichten eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Phenol, der E_{260} / E_{230} Quotient über Verunreinigungen mit Kohlenhydraten, Peptiden, Phenol oder aromatischen Verbindungen [544]. Als Richtwert wurden DNA-Lösungen mit $E_{260}/E_{280} > 1,8$ sowie $E_{260}/E_{230} > 2,0$ und RNA-Lösungen mit $E_{260}/E_{280} > 2,0$ sowie $E_{260}/E_{230} > 2,0$ als hinreichend rein betrachtet.

III.3.4. Reverse Transkription

Um die extrahierte Gesamt-RNA in cDNA revers zu transkribieren, wurden je 2 µg RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 µl gebracht und 2 µl random primer (500 µg/ml, Promega) hinzugefügt. RNA und primer denaturierte man dann für 5 min bei 70°C.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze auf Eis nach folg. Schema pipettiert:

Reagenz	Eingesetztes Volumen pro Ansatz
M-MLV RT 5xPuffer (Promega)	5 µl
dNTP-Mix (2 mM, Roth)	6,75 µl
RNasin® RNase Inhibitor (40 u/µl, Promega)	0,625 µl
M-MLV RT (200 u/µl, Promega)	1 µl

Die Reverse Transkription erfolgte für 1 Std. bei 37°C im Wasserbad oder PCR-Cycler. Die cDNA wurde bis zur qPCR bei -20°C gelagert.

III.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die erfolgreiche zielgerichtete Insertion der Kanamycin-Resistenzkassette während der Mutagenese nach Wanner & Datsenko bzw. nach einer Transduktion mit dem Phagen P22 zu überprüfen, sollte mit Hilfe der PCR die Übergänge zwischen dem Kanamycin-Gen und den angrenzenden genomischen Regionen amplifiziert werden. Nur bei korrekter Insertion des Kanamycin-Gens an der gewünschten Stelle im bakteriellen Genom war die Bildung eines PCR-Produkts möglich. Das Pipettierschema für eine PCR Reaktion sowie das verwendete Programm für den anschließenden Lauf im Cycler sind im Folgenden beschrieben:

PCR Ansatz (50µl / Reaktion):		Programm:		
5 µl	10x GenTherm Puffer (Rapidozym)	Schritt	Temp.	Zeit
5 µl	dNTP-Mix (2 mM, Roth)	Initiale Denaturierung	94°C	2 min
1,5 µl	MgCl ₂ (50 mM, Rapidozym)	Denaturierung	94°C	1 min
2 µl	Je Primer (10 pmol/µl)	Annealing	50°C	1 min
0,2 µl	BioTherm™ Taq DNA-Polymerase (5 u/µl)	Elongation	72°C	1 min
1 µl	DNA-Template	Endelongation	72°C	5 min
ad 50 µl	Wasser Rotisolv™			

Die PCR-Produkte wurden bis zur gelelektrophoretischen Untersuchung bei -20°C oder 4°C gelagert.

III.3.6. Real-Time (quantitative) Reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Die auf der herkömmlichen PCR basierende Echtzeit-PCR wurde genutzt, um die cDNA als Kopie der RNA eines Gens zu quantifizieren und somit Aussagen über die Expression von Genen bestimmter Zytokine bei einer *Salmonella* – Infektion zu ermöglichen.

Der Reaktionsansatz setzte sich, wie folgt, zusammen und wurde zu 18 µl / well in 96-well Reaktionsplatten (Applied Biosystems) vorgelegt.

Real-Time PCR Ansatz (20µl / Reaktion):		Programm:		
10 µl	2x Power SYBR® Green Master Mix	Schritt	Temp.	Zeit
1,8 µl	Je Primer (10 pmol/µl)	Initiale Denaturierung	95°C	10 min
4,4 µl	Wasser Rotisolv™	Denaturierung	95°C	15 s
		Annealing	55°C	30 s
		Elongation	72°C	30 s
		Denaturierung	95°C	15 s
		Annealing	55°C	1 min
		Schmelzpunktbestimmung	0,5°C/s auf 95°C	

Für jede Probe wurden mindestens zwei technische Replikate eingesetzt. Pro Reaktion pipettierte man 2 µl der Template – cDNA bzw. Wasser als Negativkontrolle an den oberen Rand des wells, verschloss die Platte durch eine adhäsive Folie und zentrifugierte sie für 1 min bei 1000 x g.

Der Real-Time PCR – Lauf erfolgte im StepOnePlus™ System (Applied Biosystems) unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die Fluoreszenz des SYBR® Green I Farbstoffes, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, wurde jeweils am Ende der Elongationsphase in jedem Zyklus gemessen, die Schmelzpunktbestimmung erfolgte am Ende der PCR während einer

schrittweisen Erhöhung der Temperatur von 55°C auf 94°C um 0,5°C/s.

Zur Auswertung der PCR-Läufe wurde ein Schwellenwert festgelegt, der den Beginn der exponentiellen Phase der sigmoiden Amplifikationskurven für die Proben markierte und anhand dessen jeder Probe ein sogenannter „Cycle Threshold“ (C_t) zugeordnet werden konnte. Umso kleiner der C_t -Wert und umso früher der gesetzte Schwellenwert erreicht wurde, umso größer war die jeweilige Ausgangsmenge der cDNA in der Probe. Die C_t -Werte der beiden technischen Replikate wurden jeweils gemittelt. Eine Normalisierung der Werte erfolgte durch Subtraktion der mittleren C_t -Werte des endogenen Referenzgens (GAPDH) von den C_t -Werten der Zielgene für jede Probe, woraus sich jeweils ein ΔC_t -Wert ergab. Um die Werte der infizierten zu den uninfizierten Proben (Referenz) ins Verhältnis zu setzen, wurden die ΔC_t -Werte der uninfizierten Proben für das jeweilige Zielgen von den ΔC_t -Werten der infizierten Proben subtrahiert, wodurch man den sogenannten $\Delta\Delta C_t$ -Wert erhielt, der zur Berechnung der relativen Genexpression (Expression eines Zielgens in den infizierten relativ zu den uninfizierten Proben) nach $2^{-\Delta\Delta C_t}$ diente.

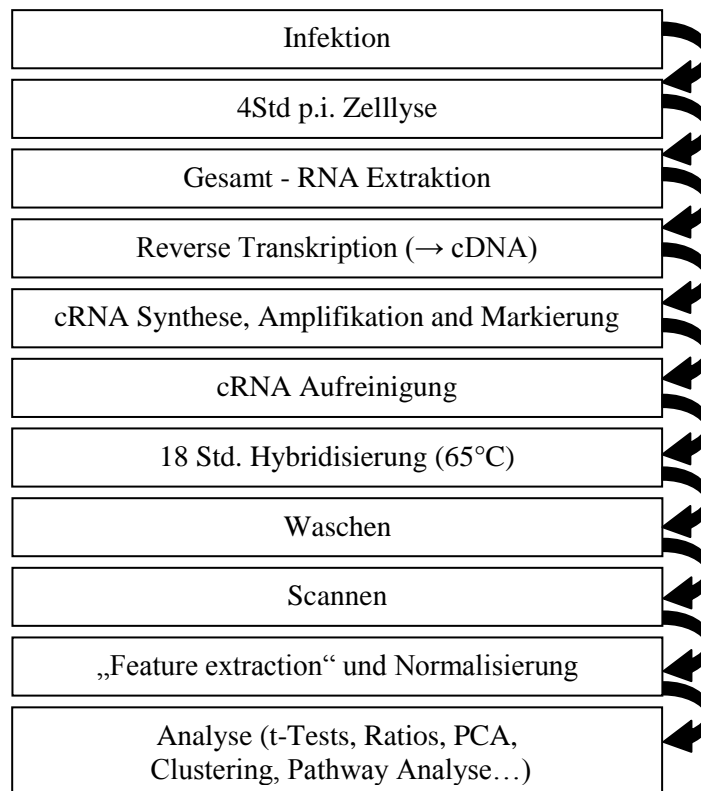
III.3.7. Microarray-basierte genomweite Genexpressionsanalysen

Um eine möglichst umfassende Übersicht über die Genexpression infizierter humaner Makrophagen nach einer Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren zu erhalten und ggfs. Unterschiede zu identifizieren, wurden Microarray-Studien durchgeführt.

Dazu wurden humane Primärmakrophagen aus Blut von acht verschiedenen Spendern isoliert (siehe III.2.6), um entsprechend acht voneinander unabhängige Infektionsversuche durchzuführen, bei denen je 3 wells einer 24-well Platte mit *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* A50 oder *S. Gallinarum* infiziert wurden (siehe III.2.7). Die Lyse der Zellen mit anschließender RNA-Extraktion erfolgte 4 Std. p.i. entsprechend III.3.2. Die RNA der drei gleichbehandelten Ansätze wurde am Ende der Aufbereitung vereint. Die Qualität der RNA kontrollierte man über Agarosegelelektrophorese (siehe III.3.1), Extinktionsmessungen mittels NanoDrop (siehe III.3.3) und einer Bioanalyzer – Untersuchung bei IMG/M Laboratories (Martinsried, D).

Die Genexpressionsanalysen erfolgten mit dem System von Agilent Technologies auf Grundlage des Protokolls „Agilent One Color Microarray-Based Gene Expression Analysis“ (Version 5.7, 2008).

Eine Übersicht der erfolgten Schritte ist im folgenden Schema gegeben.



Zusammenfassend erfolgte die Weiterverarbeitung der extrahierten Gesamt-RNA folgendermaßen. Zur späteren Normalisierung der einzelnen Arrays wurde zuerst ein Spike-In Mix aus dem One-Color Spike-In Kit (Agilent) entsprechend der Anweisung verdünnt und zu den RNA-Proben hinzugefügt. Pro Ansatz wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Anschließend pipettierte man aus dem One-Color Quick Amp Kit (Agilent) einen T7 Promotor primer hinzu und denaturierte die Nukleinsäuren bei 65°C. Mittels einer MMLV - Reversen Transkriptase wurde die RNA dann während einer 2-stündigen Reaktion bei 40°C in cDNA umgeschrieben. Nach einer Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 65°C wurde die cDNA wiederum bei 40°C für 2 Std. mit Hilfe einer T7 RNA-Polymerase in eine sogenannte cRNA übersetzt, amplifiziert und zur Fluoreszenzmarkierung gleichzeitig die in der Lösung befindlichen Cyanin 3 – markierten Cytidintriphosphate (Cy3-CTP) eingebaut. Die Aufreinigung der markierten cRNA erfolgte mit Hilfe des säulenbasierten RNeasy Kits (Qiagen) entsprechend dem Agilent Protokoll bei 4°C bzw. auf Eis. Die Elution der cRNA von der Säule wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierte cRNA lagerte man stets dunkel auf Eis bzw. längerfristig bei -80°C. Mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers wurde zum einen die Konzentration der cRNA in Lösung und zum anderen die spezifische Aktivität des Cy3 Farbstoffs ermittelt. Die gesamte RNA-Menge pro Ansatz (berechnet aus dem Produkt von RNA-Konzentration und 30 µl Elutionsvolumen) sollte >1,65 µg sein. Als Grenzwert für die spezifische Cy3 Aktivität

(berechnet aus $(\text{Cy3 Konzentration in pmol}/\mu\text{l}) / (\text{cRNA Konzentration in ng}/\mu\text{l}) \times 1000$) galten 9,0 pmol Cy3/ μg cRNA.

Die nun folgende Hybridisierung der cRNA mit den 60-meren Oligonukleotiden auf dem „Human GE 4x44K v2 Microarray“ erfolgte mit dem Gene Expression Hybridization Kit (Agilent). Die Fragmentierungsansätze zur Stückelung der cRNA-Stränge wurden entsprechend dem Protokoll für 4x44k Microarrays angesetzt. Dazu wurden 1,65 μg cRNA mit Fragmentierungspuffer und einem Blocking Reagenz für exakt 30 min bei 60°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Hybridisierungspuffer gestoppt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf Eis gelegt. Ein sogenanntes gasket slide mit Dichtringen wurde in die SureHyb Hybridisierungskammer eingelegt und 100 μl der jeweiligen Probe mittig und ohne Luftblasen in das vom Dichtring umrandete Feld pipettiert. Dann wurde der Microarray-slide mit der Array-Seite zur Probe hin auf das gasket slide gelegt und die Kammer verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte rotierend im Hybridisierungssofen für etwa 18 Std. bei 65°C und 10 rpm.

Das Waschen der Arrays erfolgte etwas abweichend vom Agilent - Protokoll mit selbst hergestellten Waschpuffern ohne Acetonitril in vier Schritten. Ohne die Arrays trocknen zu lassen, wurden die Hybridisierungskammern auseinandergelöst, der Microarray-slide im 60°C-warmen Waschpuffer I vom gasket slide gelöst und mit der Array-Seite nach innen in einem Gestell in eine schwarze Box mit 37°C-warmen Waschpuffer I überführt. Die Box platzierte man auf einem Magnetrührer und wusch die Arrays für 10 min und 1000 rpm. Der zweite Waschschrift erfolgte für 10 min bei RT in einer 2.Box mit Waschpuffer I. Im dritten Schritt wurden die Arrays für 5 min bei RT in Waschpuffer II gewaschen und dieser Schritt in einer neuen Box mit Waschpuffer II wiederholt.

Dann wurden die Microarray-slides schnell mit Druckluft getrocknet, in einen Träger eingelegt und zum Scannen in den High-Resolution C Scanner von Agilent eingesetzt. Der Scan erfolgte entsprechend der Agilent Anweisung mit einer Auflösung von 5 μm und nur im grünen Fluoreszenzkanal.

Ausgehend von den erstellten Bildern der Arrays wurden nun mit Hilfe der Agilent Feature Extraction Software (Version 9.5.3) die Signale auf dem Array über das Grid Template (Q26652_D_F_20100430) entsprechend dem aktuellen Protokoll für einfarbige Experimente (GE1_105_Jan09) bestimmten RNA-Sequenzen sowie Kontrollen (z.B. Spike-In Proben) zugeordnet, Signalintensitäten ermittelt, Korrekturen (z.B. des lokalen Hintergrundes) sowie eine Normalisierung der Signale nach dem LOWESS Algorithmus durchgeführt und ein QC Report zur Qualitätskontrolle erstellt. Die weitere Datenauswertung (Berechnung der

Verhältnisse zwischen uninfizierten und infizierten Proben, das Mitteln der acht Replikate / Ansatz, Signifikanz-, Cluster-, Pathwayanalysen) erfolgte mit Hilfe der Software Rosetta Resolver[®], Microsoft[®] Office Excel 2007 und dem Pathway Express von Intelligent Systems and Bioinformatics Laboratory, Wayne State University, Detoit. Letztere ist ein frei zu nutzendes Online-Programm, das zur Ermittlung der Signalwege, in die die eingespeisten Gene involviert sind, die Datenbank der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) nutzt.

III.3.8. Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten ergaben sich, sofern nicht anders angegeben, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je einfach (Wachstumskurven), zweifach (Gentamicin-Protection Assays), dreifach (qRT-PCR), vier- oder fünffach (NF- κ B -, Zytotoxizitäts - Assays) Ansätzen. Aus diesen Versuchen wurden mit Hilfe von Microsoft[®] Office Excel 2003 die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet und entsprechende Balken- und Kurvendiagramme mit Microsoft[®] Office Excel 2003 oder SigmaPlot 10.0 (SYSTAT Software) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft[®] Office Excel 2003 und SPSS 20 (IBM). Normalverteilte Werte wurden hinsichtlich homogener Varianzen mittels F-Test (Excel) bzw. nach dem Levene-Verfahren getestet. Darauf folgte die Signifikanzanalyse mittels Students T-Test für zwei ungepaarte Stichproben jeweils in Bezug auf *S. Typhimurium* SL1344 bzw. den Wildtyp-Stamm. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ (*) bzw. 0,01 (**) wurden als signifikant bzw. hoch-signifikant betrachtet.

IV. ERGEBNISSE

Zur Aufklärung und Untersuchung *Salmonella* Serovar- und Wirtsspezies-spezifischer Faktoren bei *Salmonella* Infektionen und der daraus resultierenden Entwicklung verschiedener Krankheitsverläufe, die *in vivo* von apparenten Infektionen über eine lokal und temporal begrenzte Gastroenteritis bis hin zu schweren systemischen Erkrankungen unter Beeinträchtigung der Funktion diverser Organe reichen, wurde für diese Arbeit ein vergleichender Ansatz gewählt, in dessen Rahmen die Infektion von Epithel- und Makrophagen-ähnlichen Zelllinien aus dem Huhn, dem Schwein und dem Menschen mit je zwei *Salmonella enterica* Vertretern unterschiedlichen Wirtsspektrums (Breitspektrum, wirtsadaptiert, -beschränkt) auf verschiedene Parameter hin analysiert wurde. So erfolgte zuerst eine Untersuchung des Verhaltens der Serovare in Kultur unter unterschiedlichen Spezies-abgeleiteten Temperaturen. Anschließend fand ein Vergleich der Invasion und intrazellulären Persistenz der Serovare in den verschiedenen Zelllinien und in humanen Primärmakrophagen statt. Es folgte die Analyse der daraus resultierenden Zytotoxizität und Immunreaktion anhand der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der Expression wichtiger Zytokin- und Chemokingene sowie bzgl. der humanen Primärmakrophagen auch anhand einer Microarray-basierten genomweiten Genexpressionsanalyse. Zur Untersuchung der NF- κ B Aktivierung wurden NF- κ B – abhängige Luziferase-Reporterzelllinien etabliert, die aus den zuvor benutzten Zelllinien hervorgingen. Diese wurden neben den Serovar-Vergleichen auch hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit durch verschiedene synthetische *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und entsprechende *Salmonella* Mutanten charakterisiert und die Ergebnisse mit den Resultaten der Serovar-Vergleiche in Beziehung gesetzt.

IV.1. Wachstum von *Salmonella* bei 37°C und 42°C

Da sich die Körpertemperatur von Säugern und Hühnern unterscheidet, wurden als Grundlage für die folgenden Infektionsstudien Wachstumskurven der in der Arbeit verwendeten *Salmonella* Stämme bei einer Temperatur von 37°C (Körpertemperatur Mensch) sowie 42°C (Körpertemperatur Huhn) aufgezeichnet und für jeden Stamm die Generationszeit nach $N(t) = N_0 \times e^{(t \times \ln(2)/k)}$ berechnet. Hierbei ist $N(t)$ die Bakterienzahl zum Zeitpunkt t , N_0 die Anfangsbakterienzahl und k die Wachstumsrate, die sich aus der Steigung der Geraden in der Exponentialphase ergibt. Setzt man für die Verdopplung $N(t) = 2 \times N_0$, so lässt sich die Generationszeit t_D nach Berechnung von k einfach nach $t_D = \ln(2) / k$ ermitteln.

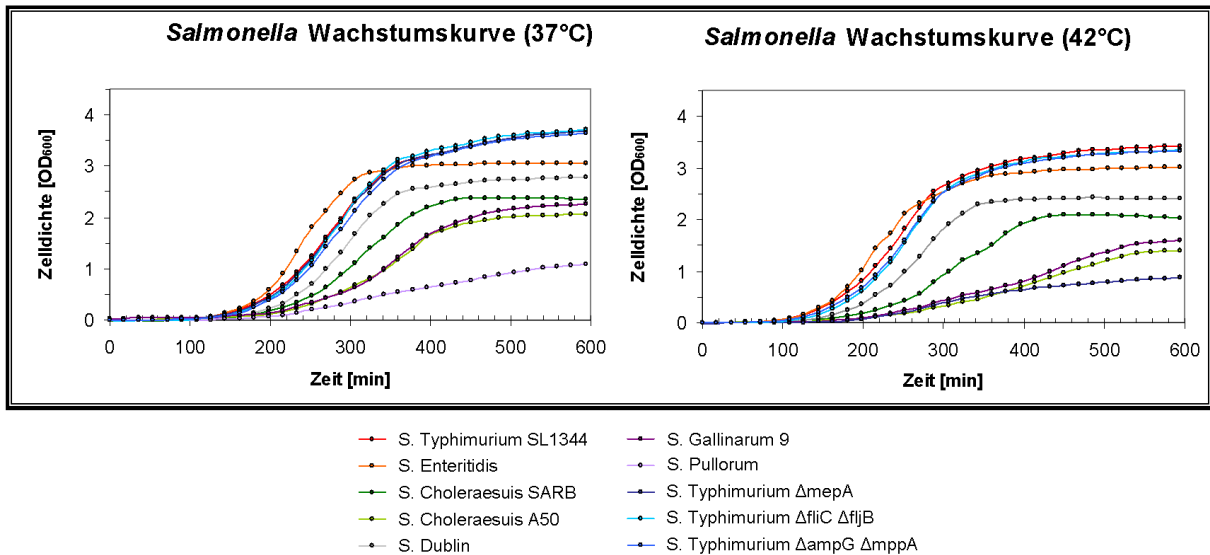


Abbildung 3: Wachstumskurven verschiedener *Salmonella* Stämme bei 37°C (links) bzw. 42°C (rechts) in LB-Medium (dargestellt ist je ein repräsentativer Versuch)

S. Enteritidis und *S. Typhimurium* inklusive seiner Mutanten wiesen demnach mit einer Verdopplungszeit von etwa einer halben Stunde sowohl bei 37°C als auch bei 42°C das schnellste Wachstum unter Kulturbedingungen auf (siehe Abbildung 4). Es folgten *S. Dublin*, die beiden *S. Choleraesuis* Stämme sowie *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* mit der größten Verdopplungszeit (189 bzw. 206 min). Damit hat die Deletion bestimmter Gene in *S. Typhimurium* SL1344 nicht zu einer Veränderung des Wachstums unter diesen Bedingungen geführt.

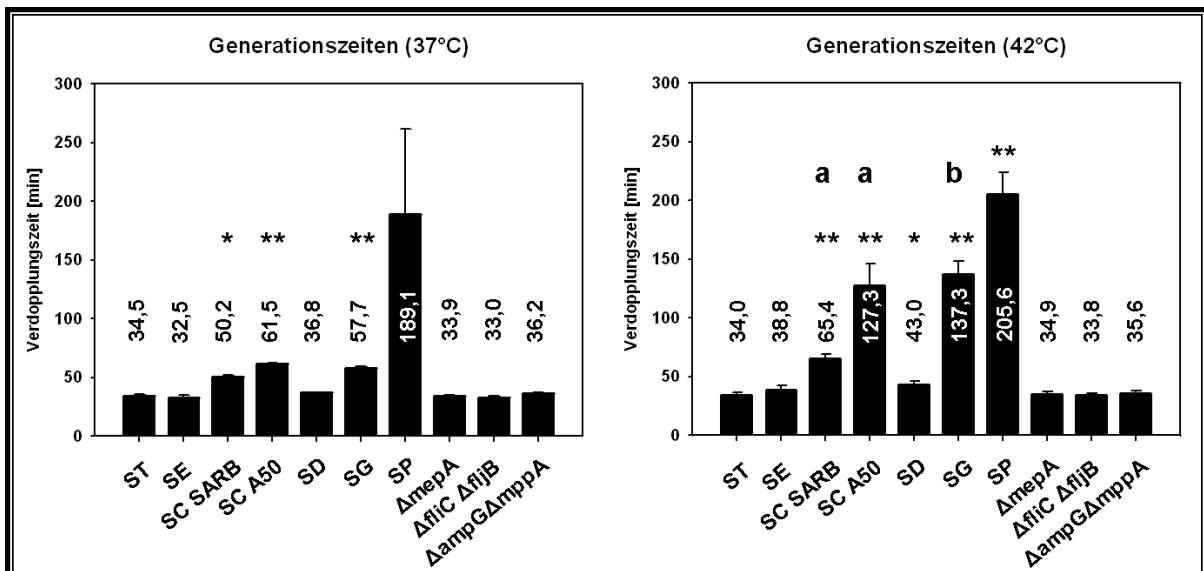


Abbildung 4: Generationszeiten verschiedener *Salmonella* Stämme bei 37°C (links) bzw. 42°C (rechts). Die mittleren Generationszeiten sind neben der Balkendarstellung auch numerisch in schwarz bzw. weiß vermerkt. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344; a: $p \leq 0,05$, b: $p \leq 0,01$ für eine signifikante Generationszeiterhöhung von 37°C zu 42°C.

Bemerkenswert ist darüber hinaus der drastische Anstieg der Generationszeiten bei Erhöhung der Temperatur vor allem bei den wirtsadaptierten und -beschränkten Serovaren *S. Choleraesuis* A50, *S. Gallinarum* und *S. Pullorum*. Die Generationszeiten von *S. Choleraesuis* SARB4 und *S. Dublin* veränderten sich nur moderat, die der Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* (inkl. Mutanten) und *S. Enteritidis* kaum bis gar nicht. Damit vermögen vor allem diese Serovare, auch bei höheren Temperaturen etwa im Huhn schnell zu wachsen. Zudem treten die Serovare bei unterschiedlichen optischen Dichten in die stationäre Phase ein. Da während der spät-exponentiellen Phase die Induktion verschiedener Virulenzgene beobachtet wurde und diese damit für die Infektion von Zellen entscheidend ist, wurden die Bakterien vor einem Infektionsversuch bis zu einer OD ~ 2,0 angezogen, so dass alle Stämme zumindest eine spät-exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten [467, 545, 546]. Da die Stämme diesen Punkt unterschiedlich schnell erreichen, wurde vor der Inokulation ein unterschiedliches Volumen an LB-Medium für die Anzucht zugrunde gelegt und damit gleiche Ausgangsbedingungen für die Infektionsversuche gewährleistet

IV.2. Invasion und intrazelluläre Persistenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben Stämme entsprechend sechs verschiedenen *Salmonella enterica* Serovaren mit unterschiedlicher Wirtsadaptation zur Infektion von intestinalen Epithel- und Makrophagen / Monozyten-ähnlichen Zellen aus dem Menschen, dem Schwein und dem Huhn genutzt. Zusätzlich zu den acht verschiedenen Zelllinien wurden auch humane Primärmakrophagen aus dem Blut infiziert. Beide Zelltypen (Monozyten / Makrophagen und Epithelzellen) unterscheiden sich deutlich hinsichtlich des Eindringens der Salmonellen. Während bei den Epithelzellen allein die Bakterien ihre Aufnahme in die Zelle aktiv durch Adhäsion über Adhäsine und darauffolgende SPI1-T3SS – vermittelte Injektion von Effektoren für das *membrane-ruffling* und die Aufnahme der Bakterien per Makropinozytose induzieren, spielt bei den Makrophagen zusätzlich der Prozess der Phagozytose eine entscheidende Rolle, so dass neben den Bakterien auch die Makrophagen aktiv an einer Aufnahme beteiligt sein können. Während bei den Epithelzellen die Bakterien - vermittelte Erkennung von und Adhäsion an Oberflächenfaktoren der Wirtszelle entscheidend ist, spielt bei den Makrophagen zudem die eigene Erkennung der verschiedenen Serovare etwa anhand von PAMPs durch wirtseigene Faktoren eine Rolle. Um neben der Invasion die Phagozytose als zusätzlichen Mechanismus zu berücksichtigen, wurde die Infektionsdauer für Makrophagen im Gegensatz zu den Epithelzellinfektionen halbiert. Die jeweilige Invasivität der Serovare sowie die anschließende Persistenz in den Wirtszellen über einen Zeitraum von 24

Std., d.h. intrazellulär zu überleben oder sich sogar zu vermehren, werden für jede Spezies im Folgenden beschrieben.

IV.2.1. Schwein

Stellvertretend für das Schwein wurden die intestinale Epithelzelllinie IPEC-J2 sowie die alveolare Makrophagenzelllinie 3D4/31 mit *Salmonella* infiziert.

Die Invasionsraten waren bei den Epithelzellen IPEC-J2 mit $11 \pm 4\%$ der Infektionsdosis für *S. Typhimurium* SL1344 im Verhältnis zu den anderen Zelllinien niedrig. Noch deutlich niedrigere Invasionsraten wiesen vor allem die Schweine-adaptierten Isolate von *S.*

Choleraesuis, aber auch *S. Pullorum* auf (siehe Abbildung 5). Über 24 Std. nahm die Zahl der intrazellulären *S. Typhimurium* SL1344 etwa um das 64-fache zu. Einen noch stärkeren Anstieg verzeichnete man für das zweite Breitspektrum-Serovar *S. Enteritidis*. Die anderen Huhn- bzw. Rinder-adaptierten Serovare wiesen ein geringeres intrazelluläres Wachstum auf.

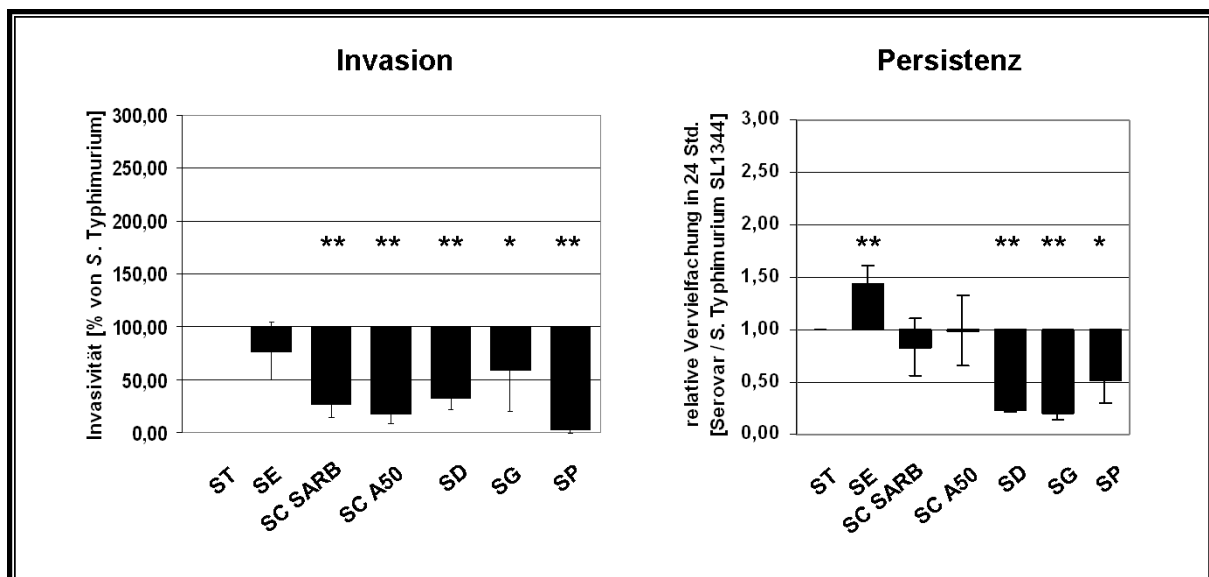


Abbildung 5: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der porcinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Bzgl. der Makrophagen 3D4/31 waren die Invasionsraten insgesamt deutlich höher, was auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen zurückzuführen sein könnte. So lag die Invasivität von *S. Typhimurium* SL1344 bei $54 \pm 19\%$. Relativ zu dieser Invasivität verhielten sich die übrigen Serovare jedoch wie zuvor für die Epithelzellen beschrieben (siehe Abbildung 6).

Auch hinsichtlich der Persistenz zeigten, wie zuvor in den Epithelzellen, lediglich *S. Enteritidis* und das SARB-Isolat von *S. Choleraesuis* ein größeres Vermögen als *S.*

Typhimurium (Vermehrung um den Faktor 35), sich intrazellulär zu vermehren. Somit verhielten sich die Serovare unabhängig vom Wirtszelltyp sehr ähnlich.

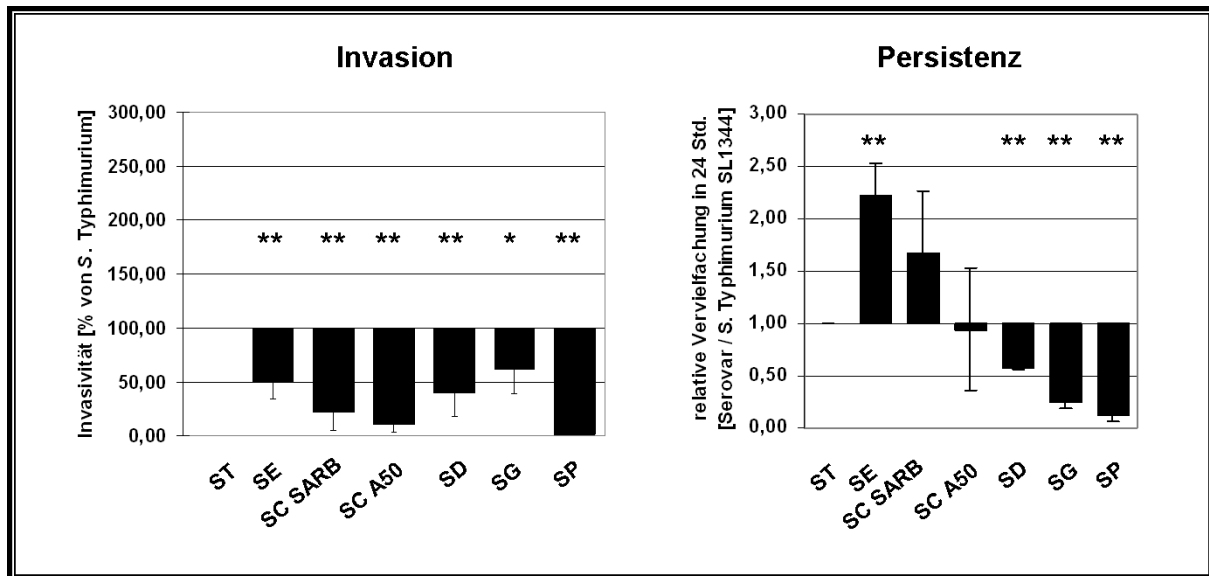


Abbildung 6: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der porcinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

IV.2.2. Huhn

Da bis zum Ende dieser Arbeit keine veröffentlichte intestinale Epithelzelllinie des Huhns zu finden war, beschränkten sich die Untersuchungen im Modellsystem des Huhns auf die Makrophagen-ähnlichen Zelllinien HD-11 und MQ-NCSU.

Die Invasionsraten lagen für *S. Typhimurium* SL1344 bei $36 \pm 5\%$ (HD-11) und $30 \pm 10\%$ (MQ-NCSU) der Infektionsdosis. In HD-11 Zellen zeigte lediglich *S. Dublin* in MQ-NCSU zudem *S. Choleraesuis* SARB4 eine höhere Invasivität, insbesondere die Huhn-adaptierten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum*, aber auch *S. Choleraesuis* A50 waren zumindest in HD-11 Zellen nur schwach invasiv. Die intrazelluläre Vermehrung war im Verhältnis zu den bereits beschriebenen Zellen porcinen Ursprungs insgesamt deutlich niedriger. So lag sie für *S. Typhimurium* SL1344 in HD-11 Zellen lediglich bei dem Dreifachen, in MQ-NCSU Zellen bei etwa 18-fach. Wie zuvor für die porcinen Zellen beschrieben, vermochte einzig *S. Enteritidis* besser als *S. Typhimurium* intrazellulär sowohl in HD-11 als auch in MQ-NCSU Makrophagen zu persistieren.

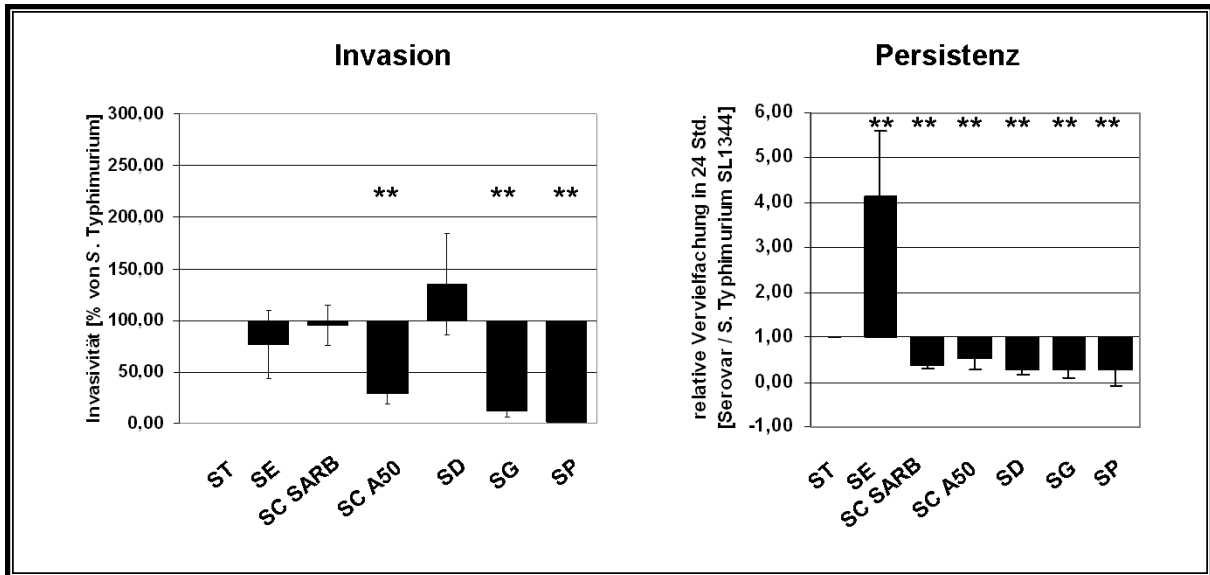


Abbildung 7: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie HD-11 des Huhns. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

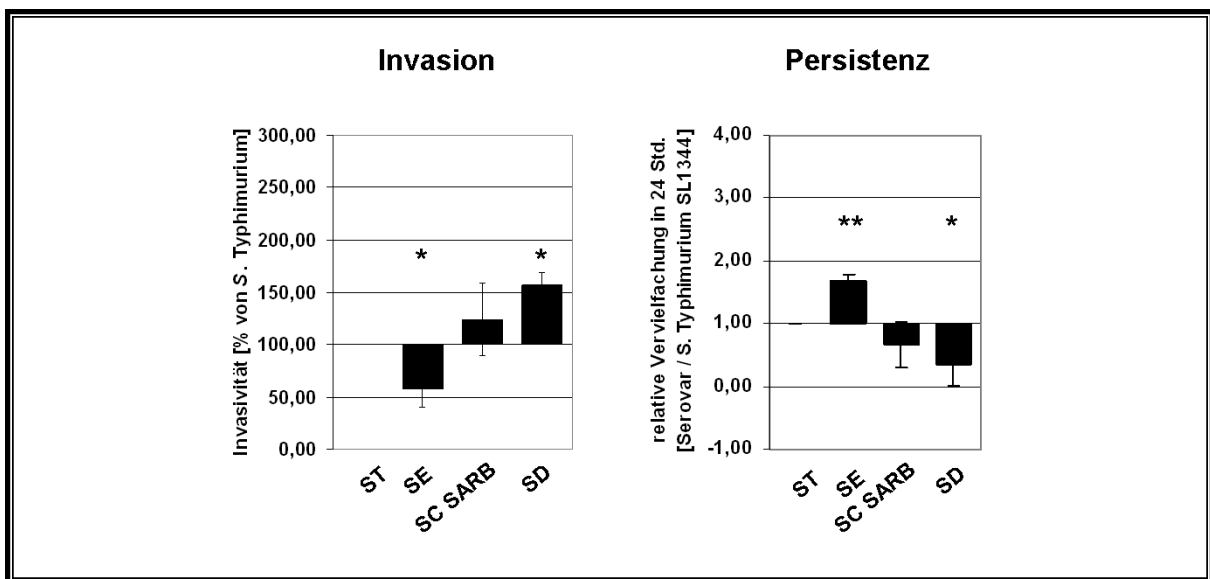


Abbildung 8: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie MQ-NCSU des Huhns. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SD: *S. Dublin*.

IV.2.3. Mensch

Humanen Ursprungs wurden die intestinalen Epithelzelllinien LoVo und Caco-2 sowie die Makrophagen-ähnlichen Zelllinien U937 und THP-1 mit *Salmonella* infiziert. Im Gegensatz

zu den adhärenen THP-1 Zellen wurden die U937 Makrophagen vor der Infektion mit PMA behandelt und sind somit als aktiviert anzusehen. Als Brücke zu Situation *in vivo* infizierte man desweiteren auch Primärmakrophagen, die zuvor aus humanem Blut extrahiert und mittels *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) ausdifferenziert wurden.

Die Invasivitäten der verschiedenen Serovare verhielten sich in beiden betrachteten intestinalen Epithelzelllinien sehr ähnlich. So lag die Invasionsrate von *S. Typhimurium* SL1344 bei $43 \pm 12\%$ (LoVo) bzw. bei $16 \pm 3\%$ (Caco-2) der Infektionsdosis. Im Verhältnis zu diesen Werten zeigte vor allem das Rinder-adaptierte Serovar *S. Dublin* eine höhere Invasivität, *S. Choleraesuis* A50 und die beiden Huhn-adaptierten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* deutlich niedrigere Invasivitäten. Damit spiegelten diese Ergebnisse die zuvor in den Hühner-Makrophagen beobachteten relativen Invasionsraten wider.

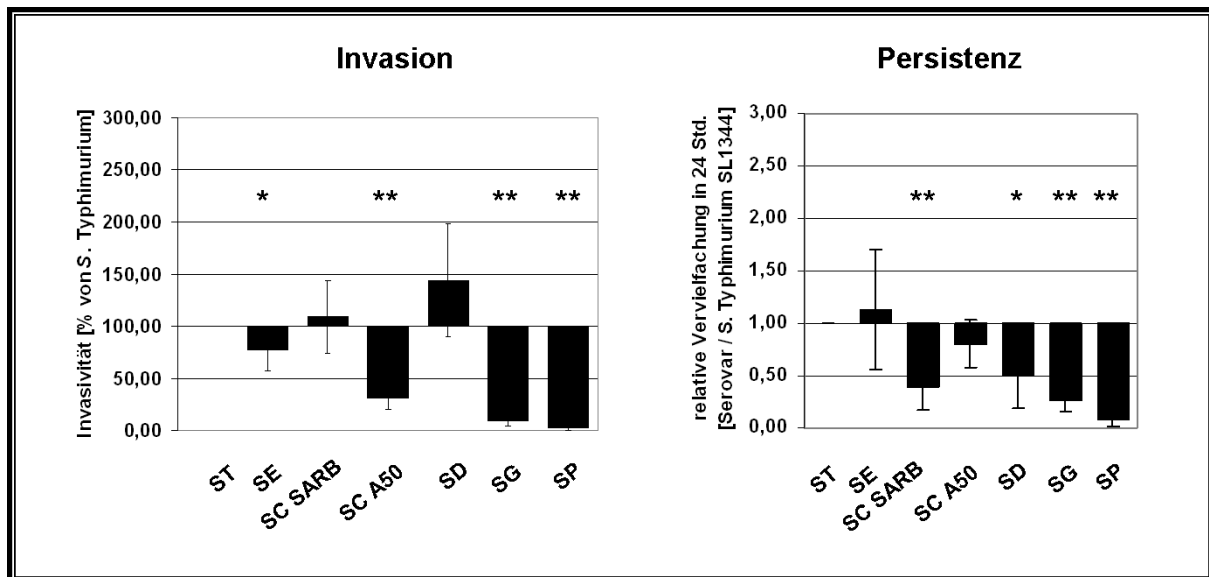


Abbildung 9: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der humanen intestinalen Epithelzelllinie LoVo. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Auch hinsichtlich der intrazellulären Persistenz lassen sich Ähnlichkeiten zwischen den Hühner-Makrophagen und den humanen Epithelzellen finden. So vermag lediglich *S. Enteritidis* in beiden Epithelzellen ähnlich gut wie *S. Typhimurium* zu persistieren. Im Gegensatz zu den LoVo-Zellen weist *S. Choleraesuis* A50 in Caco-2 Zellen die stärkste intrazelluläre Vermehrung auf. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zeigte lediglich *S. Gallinarum* eine geringe intrazelluläre Vermehrung in beiden Zelllinien. Die

Vervielfachung über 24 Std. betrug für *S. Typhimurium* SL1344 das 28-fache (LoVo) bzw. das 16-fache (Caco-2).

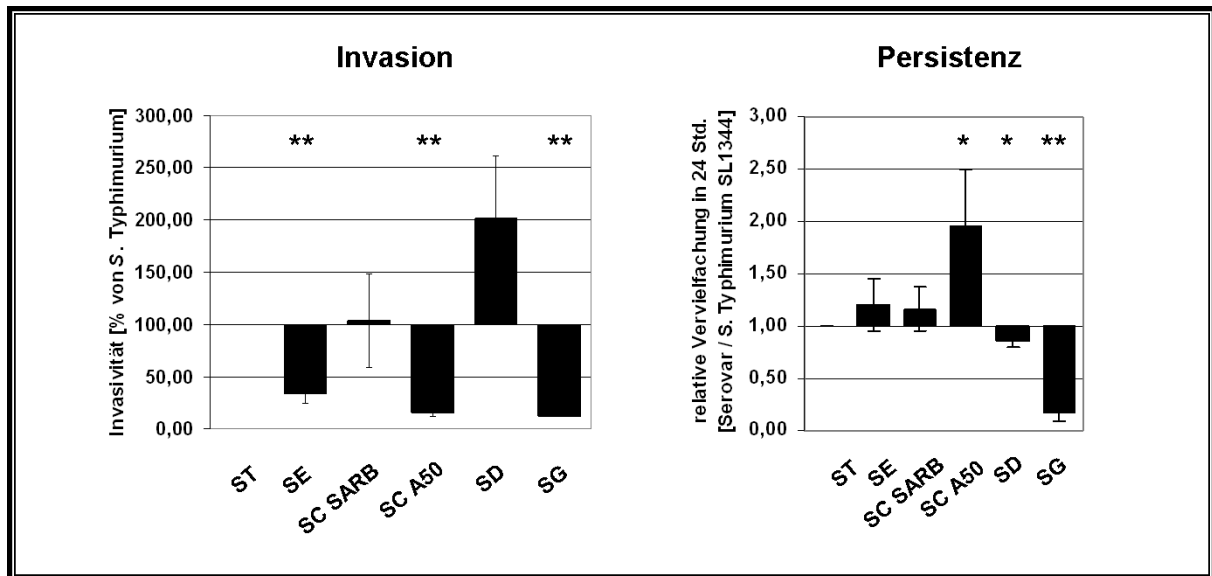


Abbildung 10: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der humanen intestinalen Epithelzelllinie Caco-2. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen gab es zwischen den humanen Makrophagen deutlich größere Unterschiede sowohl in der Invasivität als auch der Persistenz der Serovare. Die Invasivität von *S. Typhimurium* SL1344 lag in THP-1 Makrophagen bei $42 \pm 14\%$, bei den U937 Makrophagen bei $30 \pm 15\%$. Bereits die häufig recht großen Standardabweichungen deuten auf eine größere Variabilität der einzelnen Infektionsversuche hin. So fand man sowohl bei den THP-1 als auch bei den U937 Zellen, ähnlich wie zuvor für die humanen Epithel- und Hühnermakrophagen beschrieben, die höchsten Invasionsraten bei *S. Dublin*, zumindest bei den U937 Makrophagen wiesen jedoch zudem *S. Choleraesuis* SARB4 und *S. Gallinarum* eine höhere Invasivität als *S. Typhimurium* auf. Hinsichtlich der Persistenz von *Salmonella* gab es nur einen recht deutlichen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien. So ähnelte das Muster der Invasionsraten in den U937 denen der Hühnermakrophagen und humanen Epithelzelllinie LoVo, da auch hier lediglich *S. Enteritidis* zu einer besseren Persistenz als *S. Typhimurium* (12-fache Zunahme der Bakterienzahl) in der Lage war, wohingegen in THP-1 Zellen daneben auch *S. Choleraesuis* A50 eine deutlich stärkere intrazelluläre Vermehrung relativ zu *S. Typhimurium* (14-fach Zunahme) ähnlich der Caco-2 Epithelzellen zeigte.

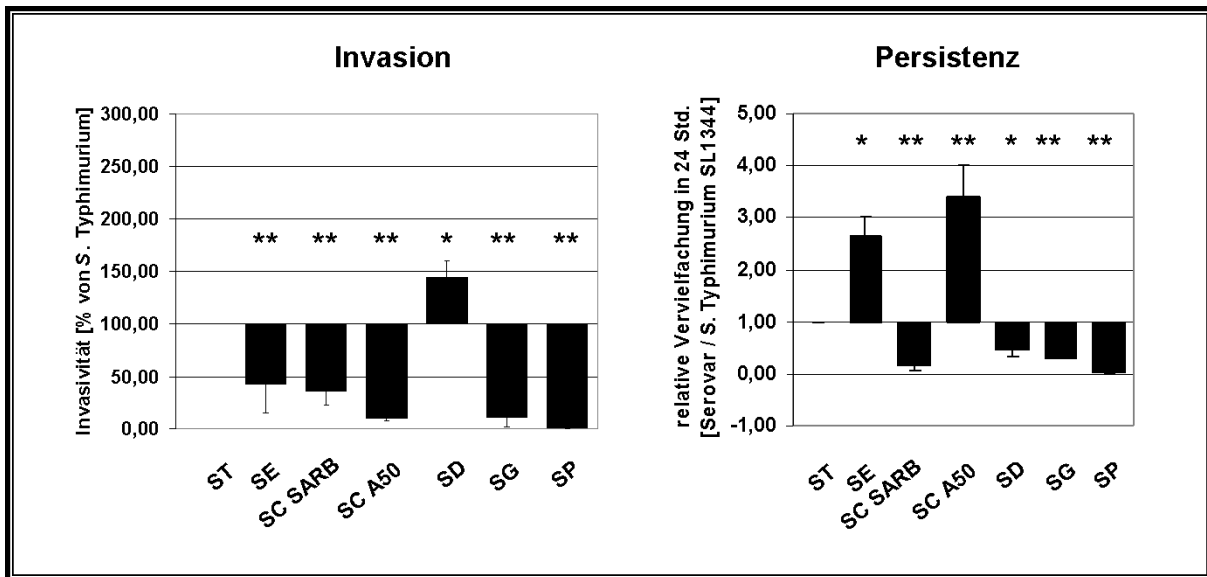


Abbildung 11: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

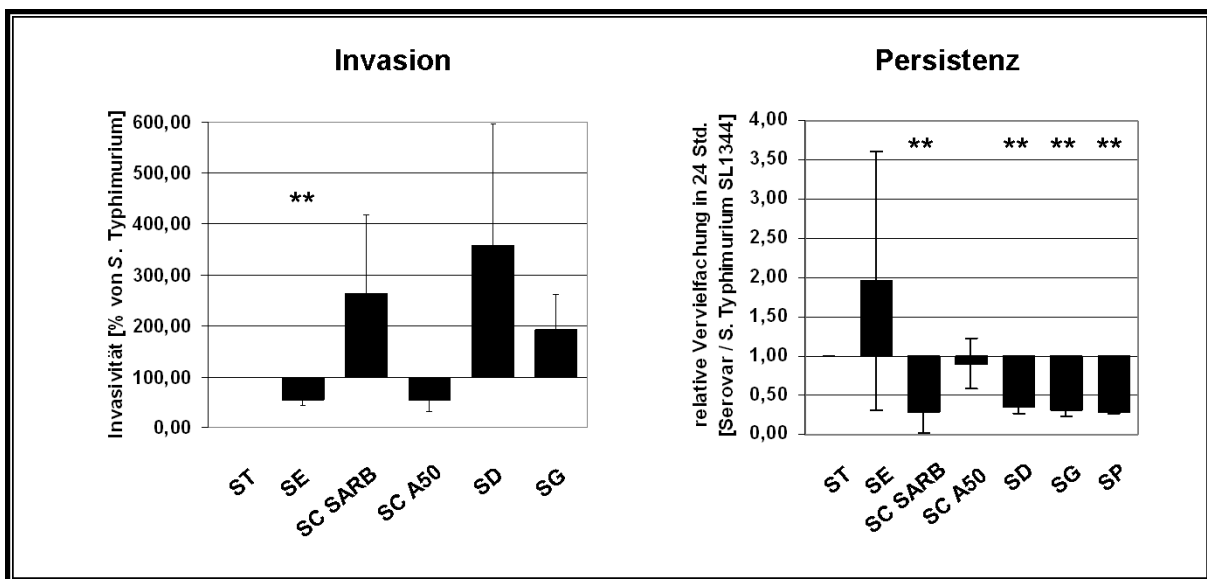


Abbildung 12: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 nach Aktivierung mit PMA. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

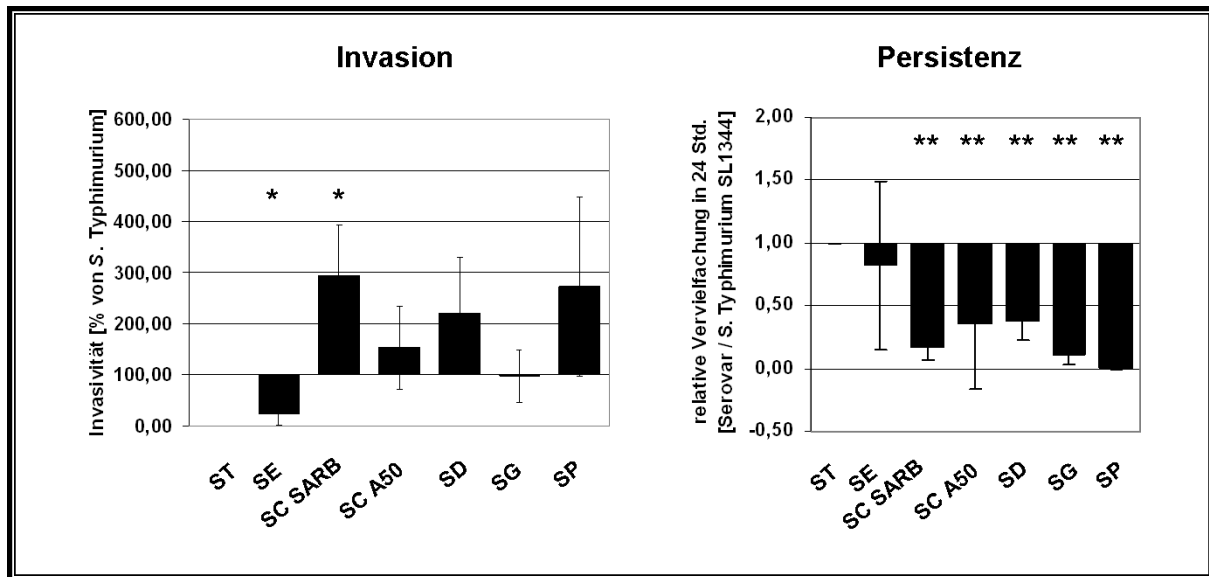


Abbildung 13: Invasivität und Persistenz der *Salmonella* Serovare in humanen Primärblutmakrophagen. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 (links) sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl (cfu) eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. (rechts). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung und Signifikanz (** $p \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Die Ergebnisse für die humanen Primärmakrophagen sind in Abbildung 13 zu sehen.

Die Invasionsraten waren hier insgesamt sehr niedrig und lagen für *S. Typhimurium* SL1344 bei nur $4 \pm 2\%$ der Infektionsdosis. Höhere Raten waren für beide *S. Choleraesuis* Stämme, für *S. Dublin* und *S. Pullorum* zu beobachten. Lediglich *S. Enteritidis* wies eine noch geringere Invasivität auf. Hinsichtlich der Persistenz war das Muster jedoch wieder ähnlich der zuvorbeschriebenen Ergebnisse für die humanen Zellen U937 und LoVo, die Hühnermakrophagen sowie die porcine Epithelzellen IPEC-J2. Aufgrund der großen Standardabweichung bei *S. Enteritidis* lässt sich diesbezüglich keine klare Aussage tätigen. Insgesamt war auch die intrazelluläre Vervielfachung mit gerade einmal einer Verdopplung über 24 Std. bei *S. Typhimurium* deutlich niedriger als bei allen zuvor beschriebenen Zelllinien. Mit Ausnahme von *S. Enteritidis* (wies ebenfalls eine Verdopplung auf) nahm die Bakterienzellzahl für die übrigen Serovare sogar über 24 Std. ab.

Eine Übersicht der Invasionsraten und der Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl in einem Zeitraum von 24 Stunden aller Serovare und Zelllinien (mit Ausnahme von U937) ist in Abbildung 14 dargestellt.

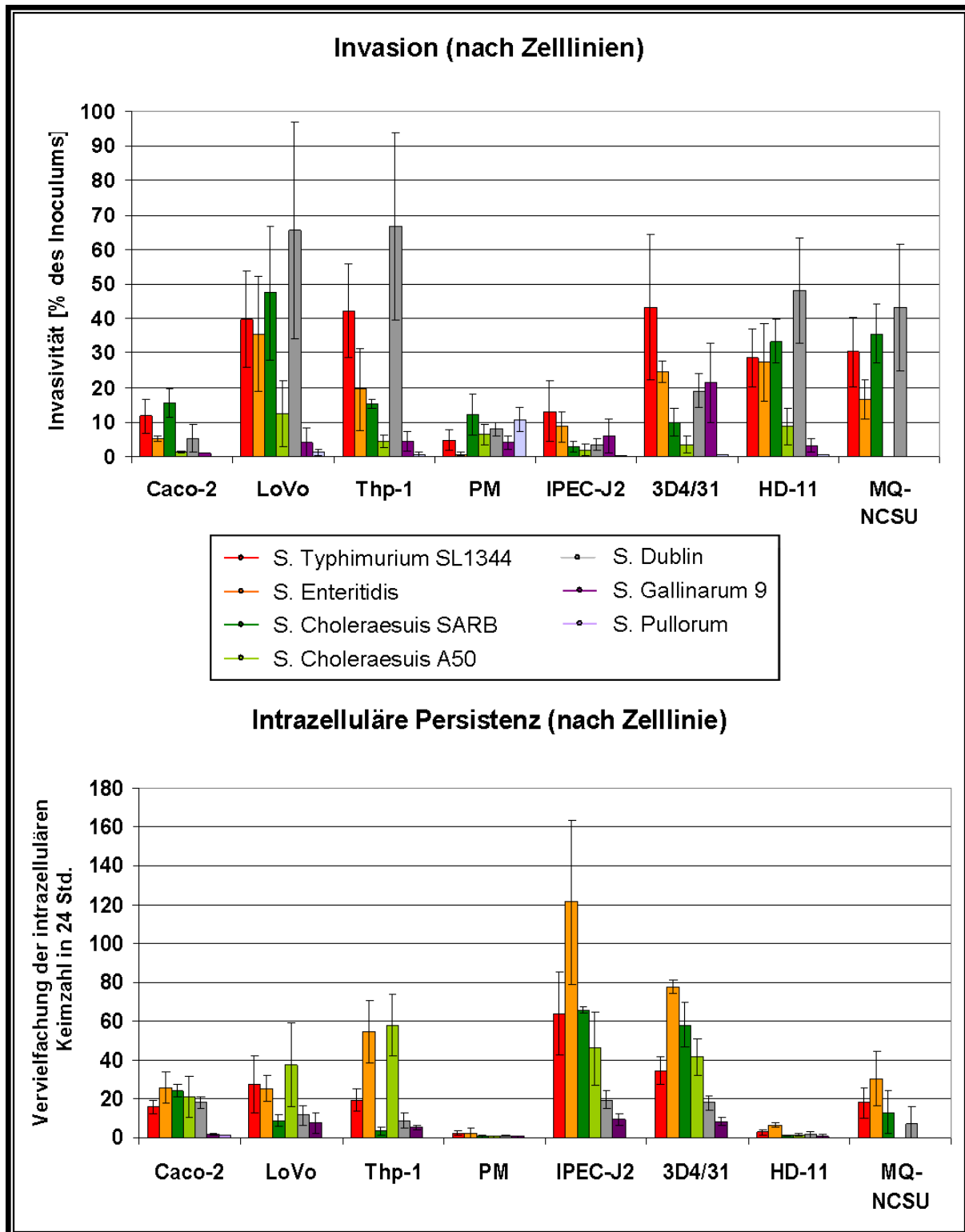


Abbildung 14: Invasion und intrazelluläre Persistenz verschiedener Salmonella Serovare in Epithel- und Makrophagenzelllinien aus dem Menschen (Caco-2, LoVo, THP-1, PM (Primärmakrophagen)), dem Schwein (IPEC-J2, 3D4/31) und dem Huhn (HD-11, MQ-NCSU). Dargestellt ist der prozentuale Anteil reisolierter Salmonellen 2 Std. p.i. in Bezug auf die eingesetzte Bakterienzellzahl während der Infektion als Invasivität (oben) sowie die Vervielfachung der intrazellulären Bakterien über einen Zeitraum von 24 Std. als intrazelluläre Persistenz (unten). Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Dabei fällt auf, dass erwartungsgemäß die höchsten Invasionsraten im Durchschnitt bei den Makrophagen zu beobachten sind. Ausnahmen bilden die humanen THP-1 Makrophagen und

Primärmakrophagen, die ähnliche Invasionsraten wie die Epithelzelllinien aufweisen, sowie die humanen LoVo Epithelzellen mit, im Durchschnitt, den höchsten Invasionsraten. Zu beachten ist diesbezüglich jedoch die unterschiedliche Infektionsdauer (für Epithelzelle 60 min, für Makrophagen 30 min).

Von diesen generellen Beobachtungen stechen einige Ausnahmen auch hinsichtlich der Serovare hervor. So weist das eine Hühner-adaptierte Serovar *S. Gallinarum* in den Schweine-Makrophagen 3D4/31, das andere *S. Pullorum* in humanen Primärmakrophagen die größten Invasivitäten auf. Während man bzgl. der Invasionsraten ein sehr diverses Muster im Vergleich aller Zelllinien findet, dass weder mit der Wirtsspezifität noch mit der Pathogenese *in vivo* korreliert, ist das Bild bzgl. der Persistenz einheitlicher. So wurde durchschnittlich die größte Vermehrung in den porcinen IPEC-J2 und 3D4/31 Zellen unabhängig vom Zelltyp gefunden, während viele Serovare in den Hühnermakrophagen HD-11 und MQ-NCSU und insbesondere den humanen Primärmakrophagen kein bzw. kaum Wachstum aufwiesen (siehe auch Abbildung 15).

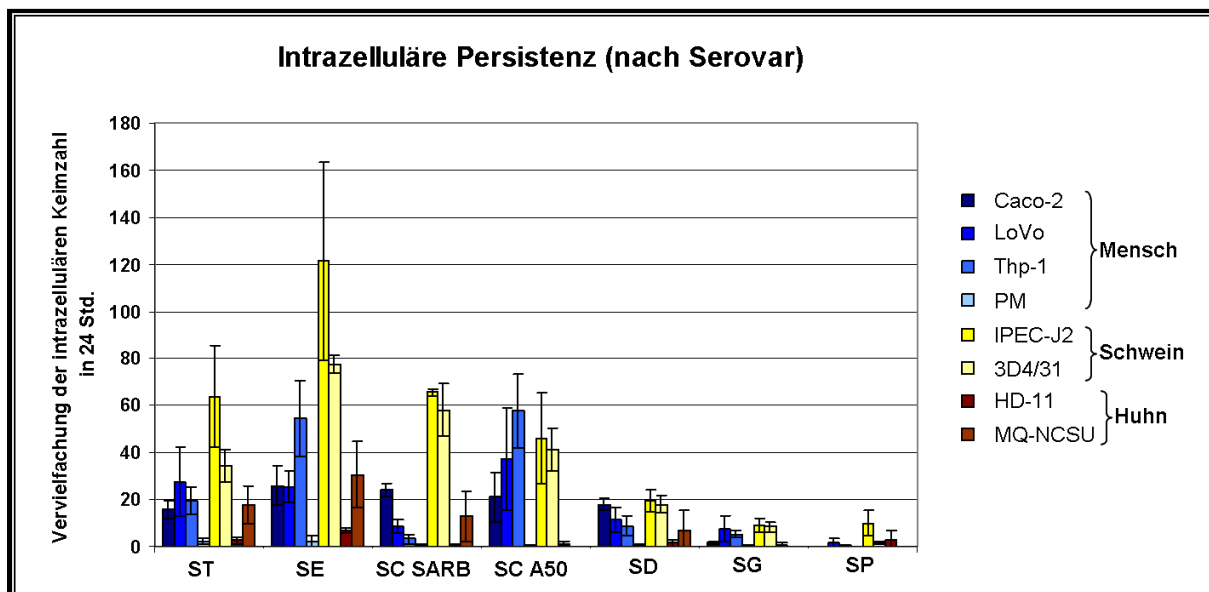


Abbildung 15: Intrazelluläre Persistenz verschiedener Salmonella Serovare in Epithel- und Makrophagenzelllinien aus dem Menschen (Caco-2, LoVo, THP-1, PM (Primärmakrophagen)), dem Schwein (IPEC-J2, 3D4/31) und dem Huhn (HD-11, MQ-NCSU). Dargestellt ist die Vervielfachung der intrazellulären Bakterien über einen Zeitraum von 24 Std. als intrazelluläre Persistenz. Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

In allen Zelllinien gehören vor allem die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* zu den am stärksten wachsenden. Zudem gehören sie zu den einzigen Serovaren, die in beiden Hühner-Makrophagen-Zelllinien ein nennenswertes Wachstum vollziehen. Unterschiede zwischen diesen beiden Serovaren finden wir nur in den porcinen Zelllinien, in denen *S. Enteritidis* *S. Typhimurium* in der Vermehrung deutlich übersteigt (siehe auch

Abbildung 5 & Abbildung 6). Diesen Serovaren folgend vermehren sich die Schweine-adaptierten *S. Choleraesuis* insbesondere in den Schweine-Zelllinien verhältnismäßig gut. Das Rinder-adaptierte Serovar *S. Dublin* zeigt im Gegensatz zu den teils sehr hohen Invasionsraten hinsichtlich der Persistenz eine verhältnismäßig geringe Effektivität. Die wirtsbeschränkten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* weisen im Durchschnitt die geringsten intrazellulären Vermehrungsraten auf.

IV.2.4. Persistenz bei 37°C und 42°C

Entsprechend der Körpertemperatur des Huhns von 42°C und den Unterschieden in der Generationszeit einiger Serovare zwischen 37°C und 42°C (siehe Abbildung 4) sollte auch das intrazelluläre Verhalten zweier Breitspektrum Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* sowie zweier wirtsadaptierter Serovare *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* in den Hühnermakrophagen HD-11 und MQ-NCSU untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

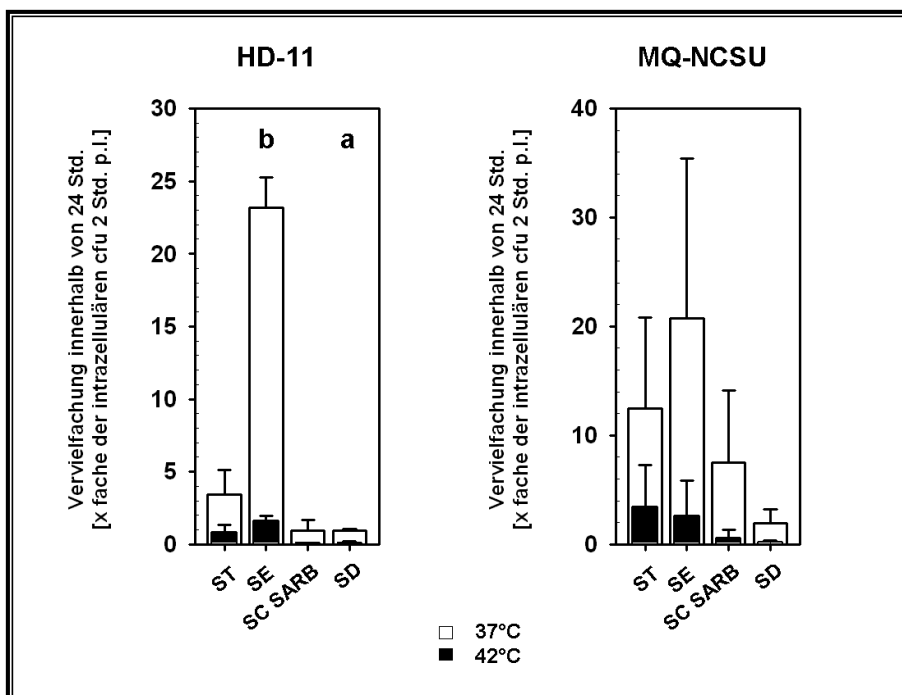


Abbildung 16: Intrazelluläre Persistenz von *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Choleraesuis* SARB4 (SC SARB) und *S. Dublin* (SD) über 24 Std. in HD-11 (links) und MQ-NCSU Makrophagen (rechts) bei 37°C (weiße Balken) und 42°C (schwarze Balken). Dargestellt sind das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. a: $p \leq 0,05$, b: $p \leq 0,01$ für eine signifikante Reduktion der Persistenz von 37°C zu 42°C.

Demnach sank die Fähigkeit, intrazellulär in Hühnermakrophagen zu persistieren, bei allen Serovaren deutlich, wenn die Inkubationstemperatur bei 42°C statt bei 37°C lag. Allein die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* wiesen noch eine intrazelluläre Vermehrung auf, während die Vervielfachung von *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* unter 1 lag

und die Bakterienzahl damit sank. Es ist also davon auszugehen, dass nur *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* in der Lage sind, auch bei erhöhten Körpertemperaturen für längere Zeit in Makrophagen zu persistieren und zu überleben.

IV.3. Zytotoxische Effekte

In der Literatur wird vielfach auf Toxine hingewiesen, die durch *Salmonella* gebildet werden und sowohl auf die Wirtszelle als auch das umliegende Gewebe wirken [479, 547, 548]. Zudem ist ausgiebig beschrieben worden, dass infolge einer *Salmonella* Infektion durch eigene Effektoren, aber auch die induzierte Expression von Zytokinen der Zelltod in Form von Apoptose und Pyroptose sowohl in Epithelzellen als auch Makrophagen induziert wird [449, 450, 457, 549]. Unbekannt ist bislang jedoch die Rolle dieser zytotoxischen Effekte in der Wirtsadaptation und ob es überhaupt serovar- oder wirtsspezifische Unterschiede gibt. Zur Klärung dieser Frage wurde mit Hilfe eines Assays zur Messung der Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) als zytosolisches Wirtsenzym, das infolge einer Zellmembranpermeabilisierung bei nekrotischen und pyroptischen Vorgängen in den Überstand freigesetzt wird, das Absterben von Wirtszellen nach einer Infektion untersucht. Primär lässt sich mit Hilfe dieses Ansatzes der Zelltod auf Grundlage der Nekrose, der Pyroptose sowie der sekundären Nekrose bei apoptotischen Zellen nachvollziehen. Apoptotische Zellen werden dementsprechend nur begrenzt erfasst. Diesbezüglich ist zu berücksichtigen, dass die hier dargestellten Versuche mit immortalisierten Zelllinien erfolgten, die größtenteils von Tumorzellen stammen. Wichtige Tumorsuppressorgene wie *p53* oder Protoonkogene wie *c-myc* oder *Bcl-2* sind für die Einleitung bzw. Repression apoptotischer Vorgänge notwendig und häufig in Tumorzellen fehlreguliert, so dass der programmierte Zelltod nicht eingeleitet werden kann [550, 551]. Damit ist die Beobachtung apoptotischer Vorgänge mit Hilfe von immortalisierten Zelllinien *per se* fragwürdig und erfordert Kenntnisse zu den jeweils eingeschränkten Apoptose-Signalwegen. Somit ist es durchaus sinnvoll, die Untersuchungen auf nekrotische und pyroptische Vorgänge zu beschränken. Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte jeweils 24 Std. p.i. Die einzelnen Werte wurden dann ins Verhältnis zu vollständig lysierten Ansätzen der Positivkontrolle gesetzt und als solche in % davon ausgedrückt. Eine Übersicht der Ergebnisse mit allen verwendeten Zelllinien und Serovaren in Abbildung 17 zeigt deutlich, dass bei einer *multiplicity of infection* (MOI) von 5, wie sie für die NF- κ B Assays, die Expressionsuntersuchungen und die Microarray-Studien genutzt wurde, ein Absterben der Wirtszellen vor allem in infizierten HD-11 Makrophagen, aber auch in humanen LoVo Epithelzellen gefunden wurde. Bei allen anderen Zelllinien und insbesondere

den porcinen Zelllinien 3D4/31 und IPEC-J2 lag der Anteil abgestorbener Zellen bei unter 20%. Ausgenommen davon führte *S. Enteritidis* in 3D4/31 Makrophagen zu einer verhältnismäßig hohen Zytotoxizität von etwa 30%.

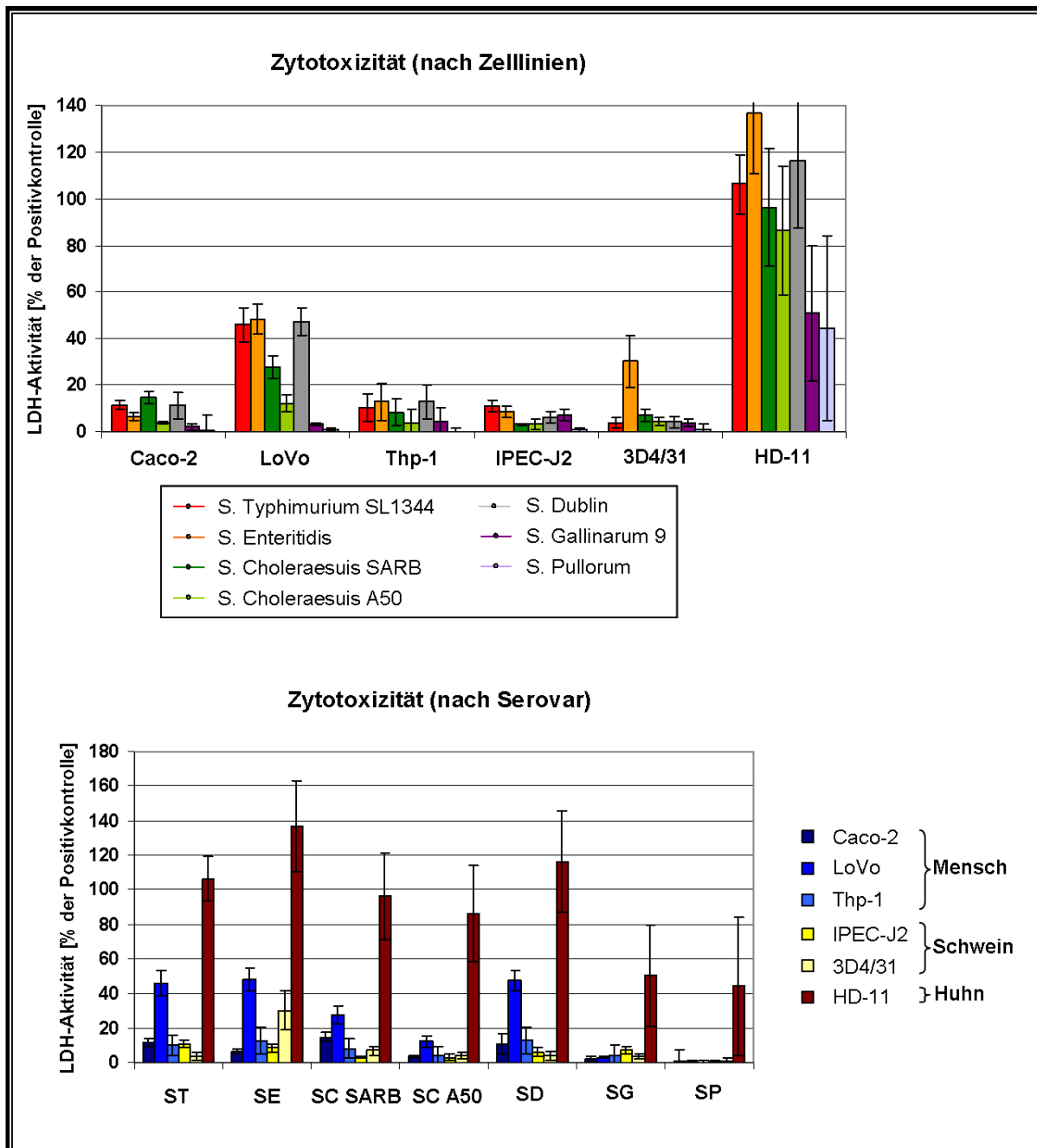


Abbildung 17: Durch *Salmonella* verursachte zytotoxische Effekte sortiert nach den verwendeten Zelllinien (oben) bzw. den verwendeten *Salmonella* Serovaren (unten). Dargestellt ist jeweils die Aktivität der in den Überstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß abgestorbener Zellen in Prozent der Positivkontrolle. Die Werte sind jeweils um den Wert der Negativkontrolle (uninfizierte Zellen) bereinigt. Berechnet wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Vergleicht man die Serovare miteinander, so führten vor allem die Breitspektrum Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*, aber auch *S. Dublin* im Durchschnitt zu den höchsten Zelltod-Raten (siehe Abbildung 17 unten), die auf Hühner beschränkten Serovare *S.*

Gallinarum und *S. Pullorum* zu den niedrigsten.

Eine Erhöhung der MOI führte in den meisten Fällen auch zu einer erhöhten Rate absterbender Zellen (siehe Abbildung 18). Diese Erhöhung fiel jedoch in Abhängigkeit der Zelllinie sehr unterschiedlich aus. Während eine MOI von 50 von den porcinen IPEC-J2 ähnlich gut toleriert wurde wie eine MOI von 5, führte die Erhöhung in den humanen LoVo Zellen bei vielen Serovaren zur vollständigen Lyse des Monolayers (entsprechend einer LDH-Aktivität von 100% der Positivkontrolle; siehe Abbildung 18). Es ist davon auszugehen, dass eine Erniedrigung der MOI auf 0,5, wie sie für die *Gentamicin-Protection Assays* verwendet wurde, auch zu einer niedrigeren Zahl absterbender Zellen führte, so dass der Prozess der Zytotoxizität in diesen Fällen für die meisten Zelllinien vernachlässigbar gering einzuschätzen ist und keine relevanten Auswirkungen auf die Ergebnisse der *Gentamicin-Protection Assays* hat.

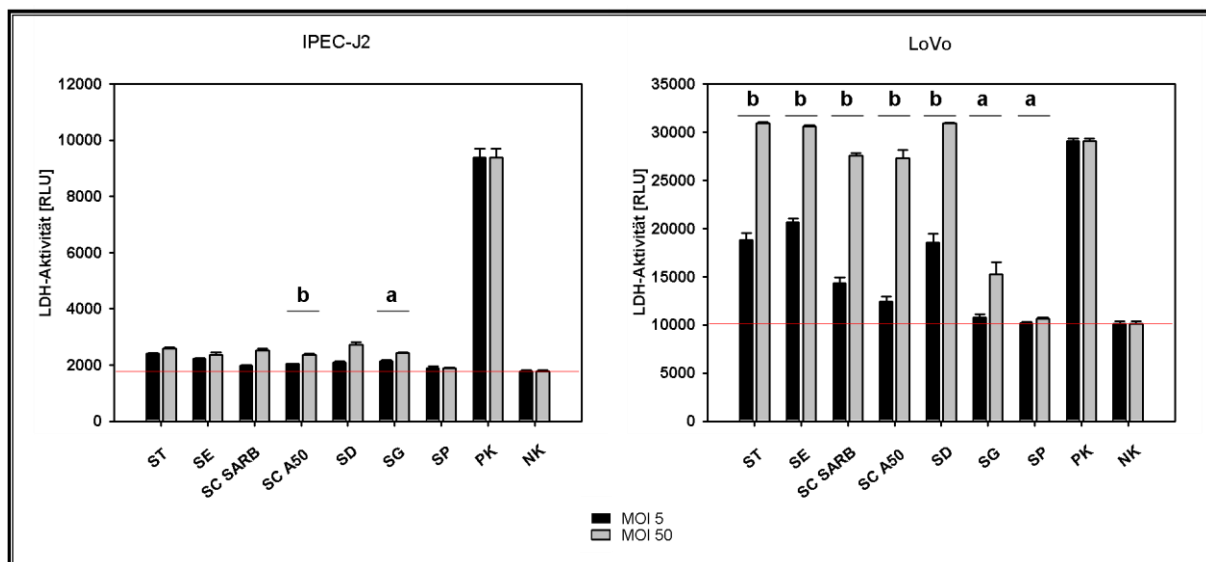


Abbildung 18: Durch *Salmonella* verursachte zytotoxische Effekte in porcinen (links) und humanen Epithel-Zelllinien (rechts) bei einer MOI von 5 (schwarze Balken) bzw. von 50 (graue Balken). Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel der Aktivität der in den Überstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß abgestorbener Zellen in *relative light units* (RLU) eines Vierfachansatzes für je ein repräsentatives Experiment. a: $p \leq 0,05$, b: $p \leq 0,01$ für eine signifikant erhöhte Zytotoxizität bei einer MOI 50 gegenüber MOI 5. Die Signifikanzanalyse erfolgte auf Grundlage von je drei Experimenten. Die rote Markierung spiegelt die LDH-Aktivität nicht-infizierter Zellen (NK) wider. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*, NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle.

Zudem führten diese grundsätzlichen Beobachtungen zu der Frage, inwiefern diese zytotoxischen Effekte lediglich von der intrazellulären Bakterienzellzahl abhängen und damit weniger von Serovar-spezifischen Faktoren als vielmehr von der Invasivität und Wachstumsrate eines Serovars bestimmt werden. Zur Klärung dieser Hypothese wurde in den folgenden Abbildungen die intrazelluläre Keimzahl 24 Std. p.i. zusammen mit der Zytotoxizität für jede Zelllinie dargestellt.

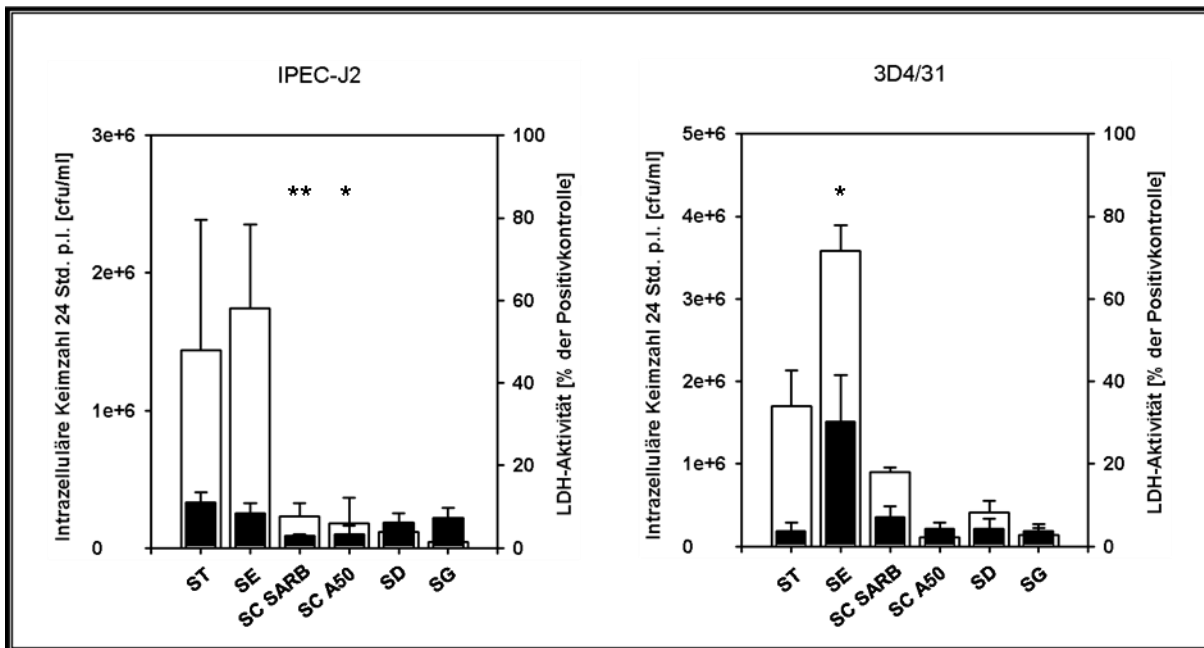


Abbildung 19: Durch *Salmonella* verursachte zytotoxische Effekte in porcinen Epithel- (IPEC-J2, links) und Makrophagen-Zelllinien (3D4/31, rechts). Dargestellt ist jeweils die Aktivität der in den Überstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß abgestorbener Zellen in Prozent der Positivkontrolle (schwarze Balken) sowie die intrazelluläre Keimzahl 24 Std. p.i. in cfu/ml (weiße Balken) eines repräsentativen Experiments. Die LDH-Werte sind jeweils um den Wert der Negativkontrolle (uninfizierte Zellen) bereinigt. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*.

Wie bereits erwähnt, waren die porcinen Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 relativ robust gegenüber einer Infektion, so dass in den meisten Fällen der Anteil toter Zellen die 10% Marke kaum überschritt (siehe Abbildung 19). Die erhöhte Zahl toter 3D4/31-Makrophagen nach einer *S. Enteritidis* Infektion geht dabei einher mit einer besonders hohen intrazellulären Keimzahl. Bei den IPEC-J2 Zellen schlug sich dagegen die hohe Zahl intrazellulärer *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* kaum in der Zytotoxizität nieder und korreliert damit stark mit den Ergebnissen zur Erhöhung der MOI aus Abbildung 18.

Im Gegensatz zu der Robustheit der porcinen Zellen reagierten die Hühnermakrophagen äußerst sensibel auf eine Infektion, so dass bereits bei einer MOI von 5 ein Totalverlust der Wirtszellen innerhalb von 24 Std. nach einer Infektion mit *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin* oder *S. Choleraesuis* auftrat. Entsprechend der intrazellulären Keimzahl verursachte *S. Enteritidis* die höchste, die beiden Hühner-adaptierten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* mit immerhin knapp 50% die niedrigste Zytotoxizität. Lediglich *S. Dublin* zeigte eine deutlich höhere Zytotoxizität als es die intrazelluläre Keimzahl vermuten lässt.

Berücksichtigt man jedoch die hohe Invasivität von *S. Dublin* aus Abbildung 7, ließe sich auch dieses Ergebnis durch eine hohe intrazelluläre Bakterienzahl deuten. Insgesamt könnten zytotoxische Effekte in HD-11 Zellen bei einer MOI von 5 damit durchaus einen starken Einfluss auf Bakterienvermehrung und -überleben haben, da die Bakterien in Folge eines

Wirtszellsterbens dem im Medium befindlichen Gentamicin ausgesetzt werden. Demzufolge könnten die niedrigen Persistenzraten aus Abschnitt IV.2.2 auf die große Sensibilität und dementsprechende Rate absterbender HD-11 Zellen zurückzuführen sein.

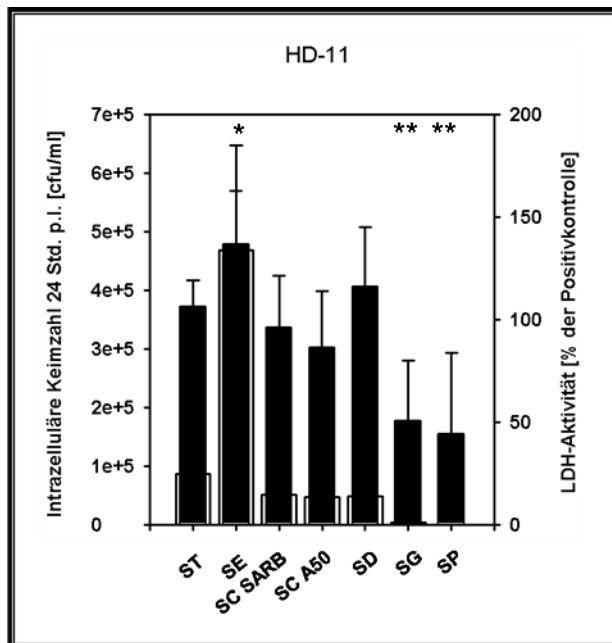


Abbildung 20: Durch *Salmonella* verursachte zytotoxische Effekte in Hühner-Makrophagen HD-11.

Dargestellt ist jeweils die Aktivität der in den Überstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß abgestorbener Zellen in Prozent der Positivkontrolle (schwarze Balken) sowie die intrazelluläre Keimzahl 24 Std. p.i. in cfu/ml (weiße Balken) eines repräsentativen Experiments. Die LDH-Werte sind jeweils um den Wert der Negativkontrolle (uninfizierte Zellen) bereinigt. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Auch bei näherer Betrachtung der Ergebnisse für die humanen Epithelzellen Caco-2 und LoVo (siehe Abbildung 21) ergeben sich deutliche Unterschiede, die darauf hindeuten, dass die Sensibilität gegenüber einer Infektion und das darauffolgende Absterben eher zelllinien- als wirtsspezifisch ist. So führen Infektionen mit *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Dublin* in LoVo-Zellen in etwa 50% der Zellen zu zytotoxischen Effekten, während weniger als 20% der Caco-2 Zellen bei einer entsprechenden Infektion absterben. In LoVo-Zellen korreliert die Zahl toter Zellen deutlich mit der Zahl intrazellulärer Bakterien. Lediglich *S. Dublin* scheint auf den ersten Blick zu einer unverhältnismäßig hohen Zahl toter Zellen zu führen. Bezieht man jedoch die große Invasivität von *S. Dublin* in LoVo Zellen, wie zuvor für die HD-11 Zelllinie beschrieben, mit ein, scheint auch in diesem Fall die Zahl toter Zellen und damit die Zytotoxizität der Serovare lediglich eine Folge der intrazellulären Bakterienzahl zu sein. Die Ergebnisse der THP-1 Makrophagen ähneln eher denen der Caco-2 Epithelzellen als der LoVo-Zellen. In beiden Fällen führte eine Infektion zu weniger als 20% abgestorbenen Zellen; bei einer MOI von 0,5 dürfte die Rate noch deutlich niedriger liegen. Wie zuvor für die porcinen Zelllinien beschrieben, spielen zytotoxische Effekte damit eher eine untergeordnete Rolle bzgl. der bakteriellen Persistenz.

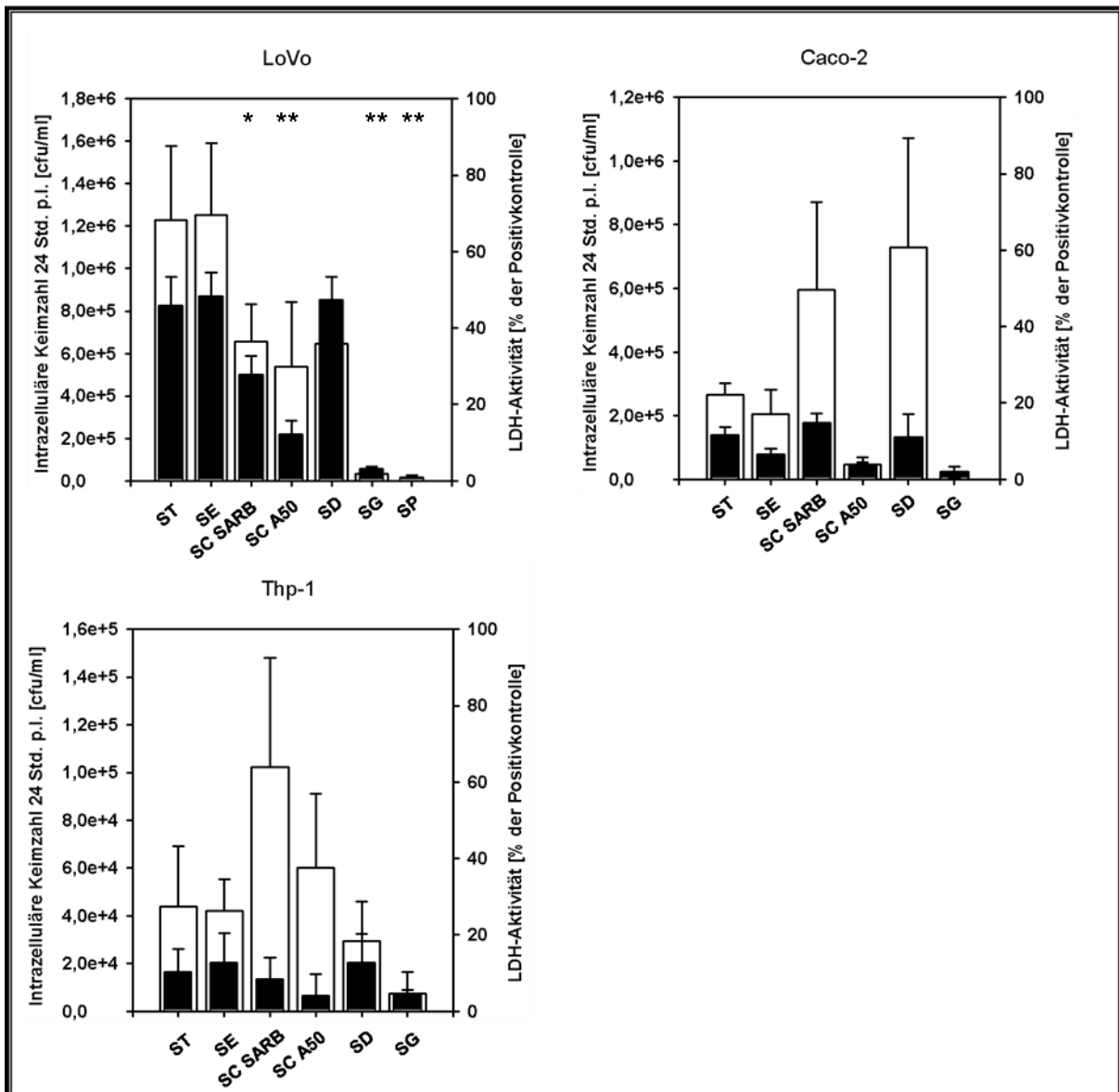


Abbildung 21: Durch *Salmonella* verursachte zytotoxische Effekte in humanen Epithel- (Caco-2, links oben; LoVo, rechts) und Makrophagen-Zelllinien (THP-1, links unten). Dargestellt ist jeweils die Aktivität der in den Überstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß abgestorbener Zellen in Prozent der Positivkontrolle (schwarze Balken) sowie die intrazelluläre Keimzahl 24 Std. p.i. in cfu/ml (weiße Balken) eines repräsentativen Experiments. Die LDH-Werte sind jeweils um den Wert der Negativkontrolle (uninfizierte Zellen) bereinigt. ST: *S. Typhimurium* SL1344, SE: *S. Enteritidis*, SC SARB: *S. Choleraesuis* SARB4, SC A50: *S. Choleraesuis* A50, SD: *S. Dublin*, SG: *S. Gallinarum*, SP: *S. Pullorum*.

Abschließend reagierten die Zelllinien durchaus unterschiedlich sensibel auf eine Infektion.

Während die porcinen Zellen selbst MOIs von 50 mit niedrigen Raten abgestorbener Zellen tolerierten, ist für LoVo- und HD-11 Zellen bereits eine MOI von 5 als kritisch anzusehen und bei der Betrachtung weiterer Ergebnisse hinsichtlich der bakteriellen Persistenz und der Aktivierung von NF- κ B zu berücksichtigen. Die Robustheit gegenüber einer Infektion stellte sich jedoch eher als Zelllinien-spezifische als Spezies-spezifische Eigenschaft heraus. Die Zytotoxizität war weniger eine Folge Serovar-spezifischer Faktoren wie Toxinen oder

Effektoren als vielmehr Resultat der Invasivität und intrazellulären Keimzahl und damit Belastung der Wirtszelle mit dem Pathogen.

IV.4. Untersuchung der Flagellin-Mutanten hinsichtlich ihrer Motilität

Zum Nachweis der eingeschränkten Motilität der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten *Salmonella* Mutanten bei Deletion eines oder mehrerer Flagelline wurde ein Motilitäts-assay mit Weichagarplatten durchgeführt, die es den Bakterien ermöglicht, aufgrund des niedrigeren Agaranteils von 0,25% (w/v) im Agar zu schwimmen.

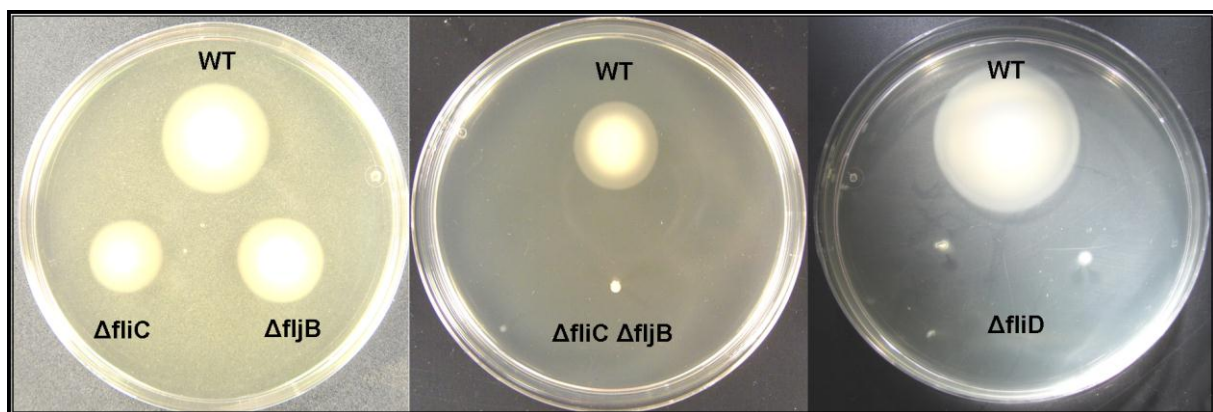


Abbildung 22: Darstellung des Schwarmverhaltens des *Salmonella* Typhimurium SL1344 Wildtyps (WT) sowie der in dieser Arbeit erzeugten Mutanten mit Deletionen der Gene *fliC* oder *fljB* (links), *fliC* und *fljB* (Mitte) sowie *fliD* (rechts). Dargestellt ist jeweils die Koloniegröße nach einer 8-stündigen Inkubation bei 37°C.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, kam es bei der Deletion nur eines der beiden in *S.*

Typhimurium SL1344 verfügbaren Flagelline nur zu einer reduzierten Fähigkeit zu schwärmen. Diese war bei Deletion von *fliC* stärker beeinträchtigt als bei Deletion von *fljB*.

Erst die Deletion beider Gene führte zu einem vollständigen Verlust der Motilität (siehe Abbildung 22, Mitte). Im Gegensatz zu den Flagellinen reichte allein die Deletion des Gens *fliD*, das für ein Capping-Protein codiert, aus, um das Schwarmverhalten vollständig zu unterbinden. Die Deletion der Flagellen-assoziierten Gene *fliC*, *fljB* und *fliD* in *S.*

Typhimurium kann damit als erfolgreich bewertet werden.

IV.5. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB

Um einen Überblick über die infolge einer Infektion auftretende Immunantwort der Wirtszelle zu erhalten und mögliche Wirtsspezies- oder Serovar-spezifische Unterschiede zu erkennen, wurde die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF-κB untersucht. Dieser reagiert kurzfristig auf die Stimulation vieler wichtiger Rezeptoren wie TLRs und NLRs und reguliert die Expression entscheidender Zytokine und Chemokine als Mediatoren zwischen

angeborenem und adaptivem Immunsystem. Um möglichst gut reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden anstelle einer herkömmlichen Transfektion der Zellen vor jedem Versuch, bei der häufig zytotoxische Effekte auftreten und eine variierende Transfektionseffizienz zu berücksichtigen ist, mittels lentiviraler Transduktion permanente Reporterzelllinien aus den zuvor verwendeten Epithel- und Makrophagenzelllinien humanen, porcinen und aviären Ursprungs hergestellt. Diese verfügen chromosomal integriert über mehrere κ B-Bindungsstellen stromaufwärts eines Promotors, der für die Expression einer Luziferase verantwortlich ist. Deren Aktivität lässt sich mithilfe eines Luminometers quantifizieren, so dass entsprechend der Luziferase-Aktivität eine Aussage über die Aktivierung von NF- κ B in der Wirtszellpopulation möglich ist. Die Werte werden dementsprechend als *relative light units* (RLU) angegeben. Mit diesen Reporterzelllinien wurden in Anlehnung an oben beschriebene Assays Infektionsversuche mit den verschiedenen Serovaren durchgeführt. Zudem konnten die Zellen hinsichtlich ihrer Resonanz auf für eine Salmonelleninfektion wichtige PAMPs hin charakterisiert und mögliche Spezies-spezifischen Unterschiede in der TLR oder NLR Funktion aufgedeckt werden. Dazu wurden die Zelllinien zum einen mit den entsprechenden TLR4 und TLR5 sowie NOD1 und NOD2 Agonisten inkubiert sowie mit Mutanten der zuvor verwendeten Serovare infiziert, die Deletionen in Flagellinogenen oder Genen für das Peptidoglycan-Aufnahmesystem und -recycling aufwiesen.

Um die transduzierten Zelllinien auf ihre Funktion als NF- κ B Reporter hin zu untersuchen, wurde die NF- κ B Aktivierung als Antwort auf typische Stimulantien wie TNF α überprüft [552]. Da für Hühner bislang kein entsprechendes Molekül für TNF α bekannt ist, wurde LPS von *S. Typhimurium* als Ersatzsubstanz zur Stimulation von NF- κ B verwendet [553].

Wie die Abbildung 23 zeigt, reagierten alle drei Zelllinien erwartungsgemäß auf die Stimulantien dosisabhängig mit einer erhöhten Luziferase-Aktivität und dementsprechend mit einer Aktivierung von NF- κ B. Während bei den humanen THP-1 Makrophagen eine Reaktion bereits bei 10 pg/ml TNF α zu beobachten war, trat diese bei den porcinen Makrophagen 3D4/31 erst ab 1 ng/ml auf. Bei den Hühnermakrophagen HD-11 war eine NF- κ B Aktivierung ebenfalls dosisabhängig ab 10 ng/ml LPS zu verzeichnen. Anhand der eingezeichneten roten Kurve lässt sich erkennen, dass die NF- κ B Aktivierung mit zunehmender Konzentration sowohl von TNF α als auch von LPS allmählich gesättigt wurde. Dieser Sättigungsbereich liegt bei THP-1 Zellen jenseits von 100 ng/ml TNF α , bei HD-11 über 10 μ g/ml LPS. Darüberhinaus wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zelllinien mit MG-132, einem in der Literatur beschriebenen Inhibitor der NF- κ B Aktivierung [552], inkubiert wurden, bei denen ebenfalls erwartungsgemäß eine drastische Reduktion der Luziferase-

Aktivität zu beobachten war (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Dementsprechend waren die Zelllinien erfolgreich auf ihre Reporterfunktion hin überprüft und konnten nun weitergehend hinsichtlich ihrer Reaktion auf bestimmte PAMPs sowie Infektionen mit *Salmonella* hin untersucht werden.

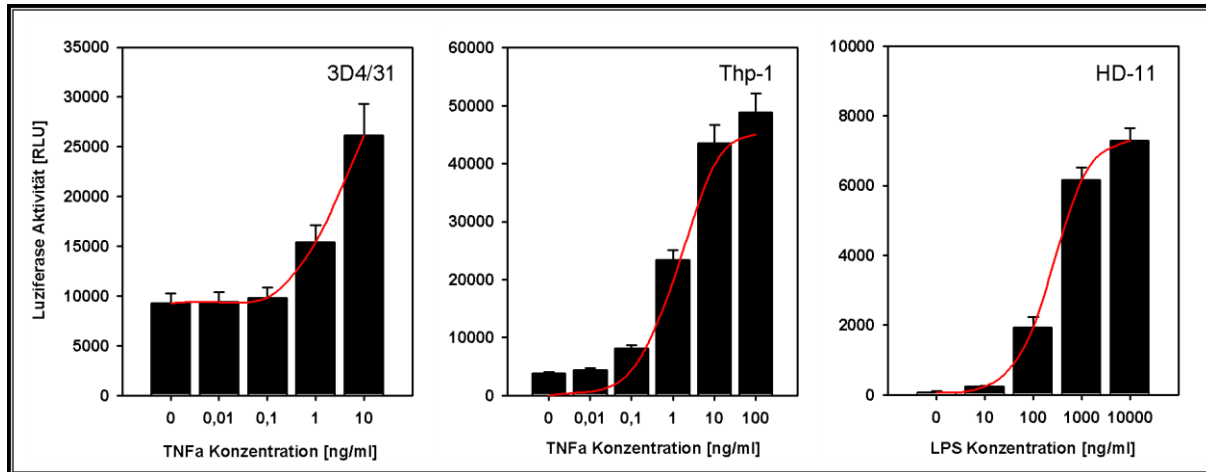


Abbildung 23: Aktivierung des Transkriptionsregulators NF- κ B in porcinen (3D4/31, links), humanen (THP-1, Mitte), aviären (HD-11, rechts) Reporter-Makrophagenzelllinien als Antwort auf eine Stimulation mit TNF α (3D4/31, THP-1) bzw. LPS von *S. Typhimurium* (HD-11). Dargestellt ist die Luziferase-Aktivität (mit variierender Skala) stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an TNF α oder LPS je eines repräsentativen Experiments.

IV.5.1. NF- κ B Aktivierung als Reaktion auf verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster

Beginnend sollen hier im Anschluss die Zelllinien hinsichtlich ihrer Reaktion auf bestimmte PAMPs hin charakterisiert werden. Neben Flagellin und LPS, die u.a. extrazellulär TLR-vermittelt eine Aktivierung von NF- κ B bewirken [295], sollte mit einem acylierten Derivat von γ -D-Glu-mDAP (C12-iE-DAP; Ligand für NOD1) und MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-mDAP (M-TriDAP; Ligand für NOD1/NOD2) auch die Reaktion auf NOD-Rezeptor Liganden untersucht werden. Da diese ausschließlich intrazellulär vorkommen [554], ist eine Aktivierung durch Liganden im Zellkulturüberstand nicht selbstverständlich. Zumindest für iE-DAP als auch für MDP wurde gezeigt, dass es u.a. über Clathrin-ummantelte Vesikel zur Endozytose dieser Substanzen kommt [273]. Wie die Abbildung 24 zeigt, reagierten die porcinen Zelllinien unabhängig vom Zelltyp besonders stark auf eine Stimulation mit porcinem TNF α durch Aktivierung von NF- κ B. Damit verbunden ist die Ausstattung aller Zelllinien mit entsprechenden TNF-Rezeptoren. Neben TNF α vermochte lediglich iE-DAP als Ligand des NOD1-Rezeptors in allen drei Zelllinien eine starke NF- κ B Aktivierung hervorzurufen, die in 3D4/31 Makrophagen sogar deutlich über der infizierter Zellen lag, in den beiden anderen Zelllinien eher ähnlich stark war. Daneben führte nur noch LPS in IPEC-J2 Epithelzellen und geringfügig in 3D4/31 Zellen zu einer gewissen Stimulation. In keiner der

drei Zelllinien konnte eine deutliche NF- κ B Aktivierung durch Flagellin erreicht werden, M-Tri-DAP stellte sich trotz der theoretischen Wirkung auf zwei Rezeptoren (NOD1 und NOD2) als wesentlich weniger potent als iE-DAP dar.

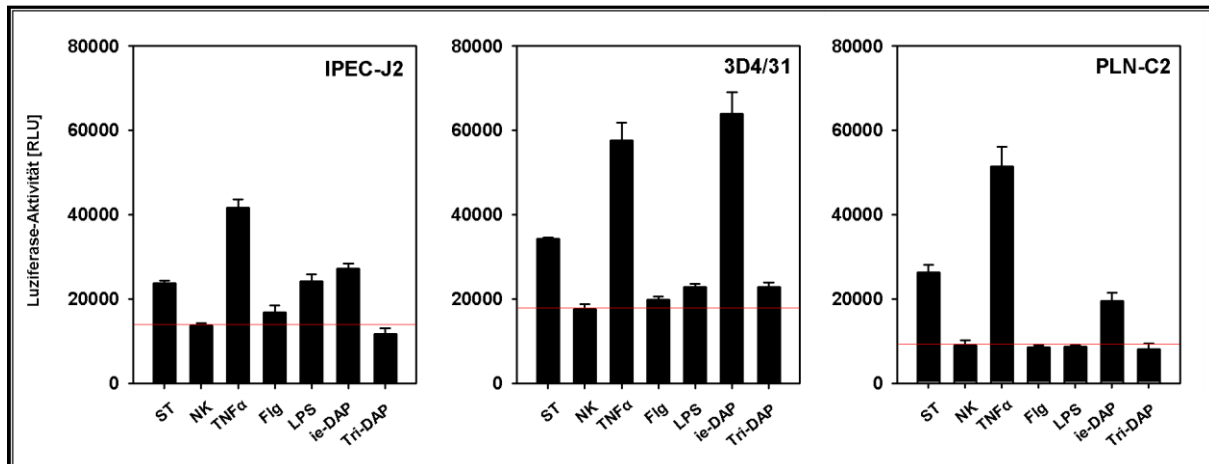


Abbildung 24: Aktivierung von NF- κ B in porcinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, links) und Makrophagen (3D4/31, Mitte; PLN-C2, rechts) als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs. Dargestellt ist je eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität in relative luciferase units (RLU) stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B 4 Std. nach Beginn der Inkubation / Infektion in Abhängigkeit der Behandlung mit 100 ng/ml TNF α , 50 ng/ml Flagellin (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml LPS (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml iE-DAP (NOD1-Ligand), 10 μ g/ml M-Tri-DAP (gemeinsamer Ligand für NOD1 & 2) sowie ohne Stimulanz (Negativ Kontrolle, NK) bzw. einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (ST). Die rote Linie beschreibt den Wert der NK.

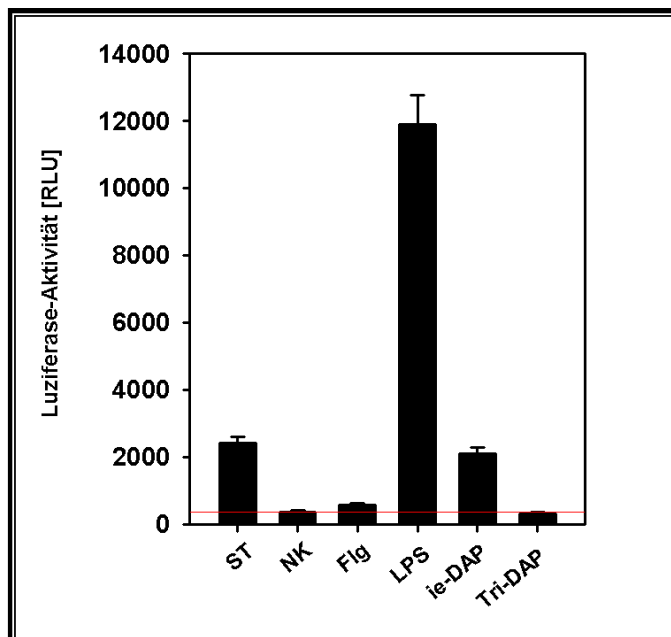


Abbildung 25: Aktivierung von NF- κ B in den Hühnermakrophagen-ähnlichen Zellen HD-11 als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs. Dargestellt ist eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität in relative luciferase units (RLU) stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B 4 Std. nach Beginn der Inkubation / Infektion in Abhängigkeit der Behandlung mit 50 ng/ml Flagellin (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml LPS (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml iE-DAP (NOD1-Ligand), 10 μ g/ml M-Tri-DAP (gemeinsamer Ligand für NOD1 & 2) sowie ohne Stimulanz (Negativ Kontrolle, NK) bzw. einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (ST). Die rote Linie beschreibt den Wert der NK.

Die Hühnermakrophagen-ähnlichen Zellen HD-11 zeigten eine besonders starke NF- κ B Aktivierung infolge einer LPS Behandlung, die deutlich stärker war, als es eine Infektion zu induzieren vermochte (siehe Abbildung 25). Daneben reagierten die Zellen nur noch auf iE-DAP, eine klare Reaktion auf Flagellin oder M-Tri-DAP blieb aus.

Ähnlich der porcinen Zelllinien ergab die Behandlung humaner Zelllinien mit humanem TNF α die stärkste Aktivierung von NF- κ B (siehe Abbildung 26).

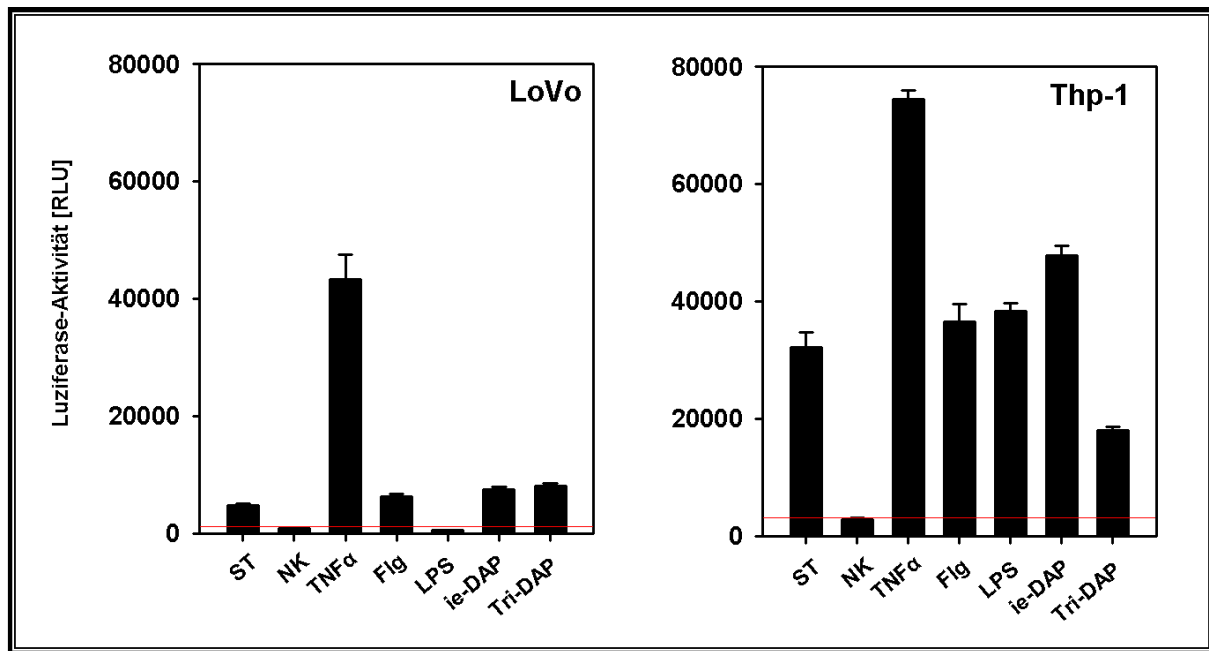


Abbildung 26: Aktivierung von NF- κ B in humanen intestinalen Epithelzellen (LoVo, links) und Makrophagen (THP-1, rechts) als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs. Dargestellt ist je eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität in relative luciferase units (RLU) stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B 4 Std. nach Beginn der Inkubation / Infektion in Abhängigkeit der Behandlung mit 100 ng/ml TNF α , 50 ng/ml Flagellin (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml LPS (*S. Typhimurium*), 1 μ g/ml iE-DAP (NOD1-Ligand), 10 μ g/ml M-Tri-DAP (gemeinsamer Ligand für NOD1 & 2) sowie ohne Stimulanz (Negativ Kontrolle, NK) bzw. einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (ST). Die rote Linie beschreibt den Wert der NK.

Auch diese Beobachtung fand unabhängig vom Zelltyp statt. Daneben ließen sich beide Zelllinien im Verhältnis zu infizierten Zellen aber auch gut durch alle übrigen Liganden NF- κ B aktivierender Signalwege stimulieren. Im Gegensatz zu den porcinen Zelllinien und Hühnermakrophagen reagierten sie auf Flagellin wie auch auf M-Tri-DAP, auch wenn letzteres im Gegensatz zu iE-DAP in THP-1 Monozyten nur halb so effizient erfolgte. Eine Ausnahme bildete LPS, das von LoVo Epithelzellen nicht erkannt wird und dementsprechend auch zu keiner Aktivierung von NF- κ B führte. Ursächlich dafür dürfte das in der Literatur beschriebene Fehlen des entsprechenden TLR4 Rezeptors sein (siehe Tabelle 3).

Diese Vorversuche zeigten bereits deutlich, dass die einzelnen Zelllinien z.T. sehr unterschiedlich auf bestimmte PAMPs reagierten. TNF α wirkte in allen Zelllinien zuverlässig als stärkstes Stimulanz; bei Hühnerzellen ließ sich die Rolle der Positivkontrolle für NF- κ B

Aktivierungen durch LPS ersetzen. Neben TNF α war nur iE-DAP als einziges PAMP in der Lage, durch seine intrazelluläre Bindung an NOD1-Rezeptoren alle hier verwendeten Zelllinien zu stimulieren. Das dem iE-DAP ähnelnde M-Tri-DAP konnte trotz seiner Funktion als Ligand für NOD1 und NOD2 nur in wenigen Zelllinien (THP-1, LoVo, 3D4/31) eine NF- κ B Aktivierung hervorrufen. Da Unterschiede in der Endozytose von iE-DAP und M-Tri-DAP eher unwahrscheinlich sind, ist die Bindung von M-Tri-DAP an die Rezeptoren NOD1 und NOD2 vermutlich deutlich ineffizienter, so dass es verhältnismäßig selten zur Induktion der Signalkaskade kommt. Daneben aktivierte LPS vor allem die Makrophagen-ähnlichen Zellen HD-11 und THP-1, aber auch in geringerem Maße die porcinen Zellen 3D4/31 und IPEC-J2. Flagellin als Bestandteil motiler Bakterien wurde in deutlicher Weise nur durch die humanen Zelllinien THP-1 und LoVo erkannt. In den anderen Zelllinien lag die NF- κ B Aktivierung nach Flagellin-Stimulation nur sehr knapp über der unbehandelten Probe, so dass von einer Erkennung nicht zweifelsfrei ausgegangen werden kann. Mit diesen Informationen wurde nun das Verhalten der Zelllinien bei einer Infektion mit Mutanten des Peptidoglycanrecyclings und Flagellin untersucht.

Da in der Literatur beispielsweise für Caco-2 Epithelzellen beschrieben wurde, dass sich ein Knockout der Flagellen-assoziierten Gene auf die Invasivität von *Salmonella* negativ auswirkt [555], wurden parallel auch die Invasionsraten der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp *S. Typhimurium* SL1344 überprüft (siehe Abbildung 27). Tatsächlich fiel die Invasivität bei einem Doppelknockout drastisch auf 10 – 20% der Invasivität des Wildtyps in humanen und Hühnerzelllinien unabhängig vom Zelltyp. Erstaunlicherweise kam es jedoch sowohl in porcinen Makrophagen als auch Epithelzellen nicht zu dieser Reduktion. Damit scheinen Flagellin bzw. die Flagellen unter den hier genutzten Bedingungen keinen Einfluss auf die Invasion von Zellen porcinen Ursprungs durch *Salmonella* zu haben. Wichtig ist, hierbei zu berücksichtigen, dass im Rahmen der Infektionsversuche die Bakterien auf die Wirtszellen abzentrifugiert wurden und damit die Motilität der Bakterien nicht voll zum Tragen kam bzw. zum Erreichen der Wirtszelle nicht zwingend notwendig war. Nichtsdestotrotz scheinen Flagellen bzw. das Flagellin zumindest für die Invasion humaner und aviärer Zellen hilfreich zu sein. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden die Zelllinien mit der dem Wildtyp entsprechenden MOI, aber parallel auch mit einer zehnfach höheren MOI infiziert und damit mögliche Invasionsunterschiede egalisiert.

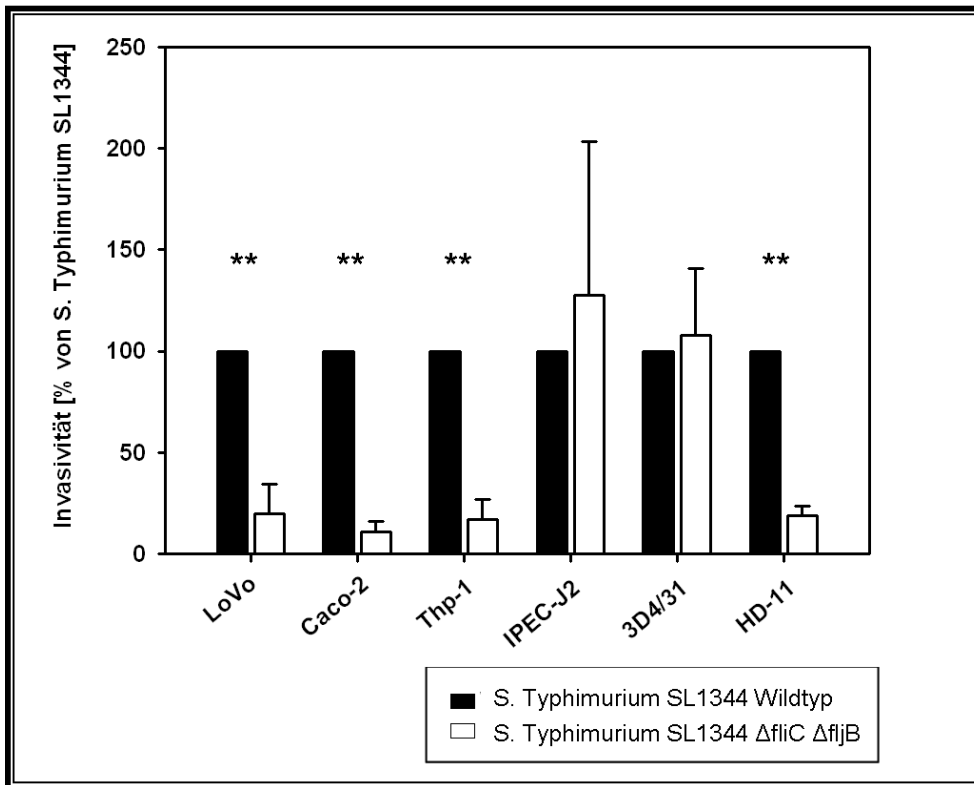


Abbildung 27: Invasionsraten der Flagellindoppelmutante (Δ fliC Δ fliB) von *S. Typhimurium* im Verhältnis zum Wildtyp *S. Typhimurium* SL1344 in den humanen Epithelzelllinien LoVo und Caco-2, der porcinen Epithelzelllinie IPEC-J2 sowie den Makrophagen-ähnlichen Zelllinien humanen (THP-1), porcinen (3D4/31) und aviären (HD-11) Ursprungs.

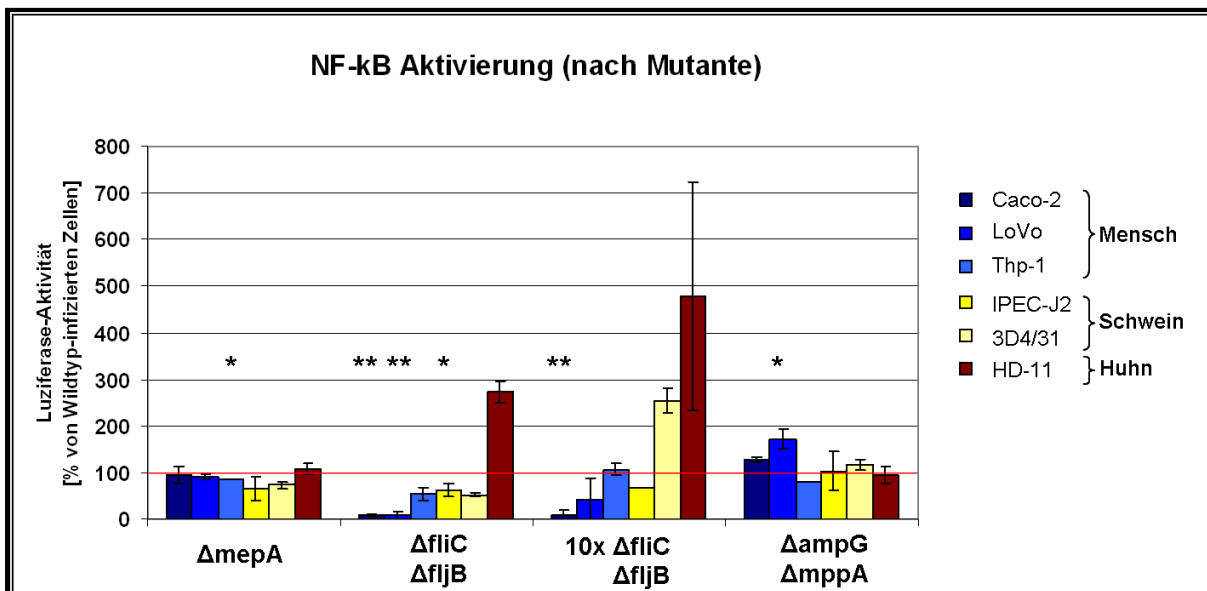


Abbildung 28: Aktivierung von NF- κ B in den humanen Zelllinien Caco-2, LoVo und THP-1 (blaue Balken), in den porcinen Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 (gelbe Balken) und der Hühnerzelllinie HD-11 (braune Balken) nach Infektion mit *S. Typhimurium* Deletionsmutanten für *mepA*, *fliC* und *fliB*, *ampG* und *mppA* im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-infizierten Zellen (rote Linie). Dargestellt ist jeweils die Aktivität der Luziferase als Maß für die NF- κ B Aktivierung 4 Std. p.i. Die Flagellin-Deletionsmutanten wurden zusätzlich mit einer zehnfach erhöhten MOI eingesetzt (10x Δ fliC Δ fliB).

Wie in Abbildung 28 dargestellt, führte die Deletion des Gens *murein endopeptidase A* (*mepA*), das für eine periplasmatische Peptidoglycan-Amidase codiert und im

Peptidoglycanrecycling sowie in der Remodellierung involviert ist [556, 557], nicht zu einer erhöhten Aktivierung von NF- κ B. Im Gegensatz dazu führte die Deletion der Gene *ampG* und *mppA*, die ebenfalls codierend für Permeasen und Bindungsproteine für die Wiederaufnahme von Muropeptiden in die Bakterienzelle und damit für das Peptidoglycanrecycling notwendig sind [558-560], zumindest in den humanen Epithelzelllinien Caco-2 und LoVo zu einer signifikant stärkeren NF- κ B Aktivierung als der Wildtyp. Somit muss es durch die Deletionen zu einer Akkumulation von Muropeptiden im Umfeld der Mutanten gekommen sein, wie es Nigro *et al.* bereits für *Shigella* zeigten [274], die zu einer stärkeren Aktivierung infolge der Stimulation der intrazellulären NOD1 und NOD2 Rezeptoren speziell in humanen Colon-epithelzellen nicht jedoch in Makrophagen oder Zelllinien anderen Ursprungs führten. Auch bzgl. der Deletion der Flagellengene *fliC* und *fliB* kam es zu deutlich unterschiedlichen Reaktionen seitens der Wirtszellen. Während die porcinen Zelllinien und die humanen Makrophagen THP-1 kaum auf eine Deletion verändert reagierten und der geringe Abfall in der NF- κ B Aktivierung durch eine Anpassung der MOI an eine verminderte Invasivität (s.o.) aufgehoben werden konnte, kam es bei der Infektion der humanen Epithelzelllinien Caco-2 und LoVo infolge der Flagellendeletion im Verhältnis zum Wildtyp zu einer deutlichen Reduktion der NF- κ B Aktivierung. Diese war so stark, dass die Mutanten trotz erfolgreicher Infektion kaum zu einer nachvollziehbaren Reaktion der Wirtszellen führten und selbst eine Anpassung der MOI die Reduktion bei weitem nicht aufhob. Als krasser Kontrast dazu kam es in HD-11 Makrophagen unerwarteterweise infolge der Deletion trotz nachgewiesener reduzierter Invasivität der Mutante zu einer erhöhten Aktivierung von NF- κ B. Ein Ausgleich der MOI führte nur noch zu einer weiteren Erhöhung und vermutlich durch größere zytotoxische Effekte infolge der hohen MOI (vgl. IV.3) zu einer großen Standardabweichung. Damit reagierten lediglich die humanen Epithelzelllinien Caco-2 und LoVo, wie erwartet, auf den Eingriff in das Peptidoglycanrecycling über AmpG und MppA mit einer erhöhten und den Verlust der Flagellengene mit einer stark erniedrigten NF- κ B Aktivierung. Die porcinen Zelllinien und humanen Makrophagen reagierten weder verändert auf die Mutanten des Peptidoglycanrecyclings noch in deutlicher Weise auf einen Verlust des Flagellins bzw. der Flagellen. Die Hühnermakrophagen reagierten ebenfalls nicht verändert auf die *ampG mppA* Deletionen; das fehlende Flagellin führte dagegen zu einer deutlichen Steigerung der NF- κ B Aktivierung.

Insgesamt war die Reaktion der porcinen Zellen auf PAMPs damit sehr robust und variierte kaum, während insbesondere die humanen Epithelzellen sehr empfindlich auf das Vorhandensein bestimmter Stimuli wie Flagellin reagierten. Das unerwartete Verhalten der

Hühnermakrophagen HD-11 ist in Anbetracht der speziellen Rolle nicht-motiler Serovare wie *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* für Hühnerinfektionen von Interesse und wurde u.a. im Rahmen der nun folgenden Untersuchungen der NF- κ B Aktivierung bei einer Infektion der verschiedenen Zelllinien mit verschiedenen Serovaren näher beleuchtet.

IV.5.2. NF- κ B Aktivierung als Reaktion auf Infektionen mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren

Wie in den Abbildung 29-31 dargestellt, kam es infolge der Infektionen 4 Std. p.i. in allen Fällen Serovar-abhängig zu einer unterschiedlich starken NF- κ B Aktivierung. Betrachtet man beispielsweise die porcinen Zelllinien in Abbildung 29, so fällt eine starke Ähnlichkeit der Aktivierungsmuster zwischen 3D4/31 Makrophagen und IPEC-J2 Epithelzellen auf.

Dementsprechend kam es in beiden Fällen zur höchsten Aktivierung bei einer Infektion mit den Breitspektrum-Serovaren *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* gefolgt vom Rinder-adaptierten Serovar *S. Dublin*, während insbesondere das Hühner-spezifische Serovar *S. Pullorum* nur zu einer geringfügigen Aktivierung führte. Im Gegensatz zu den Epithelzellen, die zwar gemäßigt aber dennoch deutlich auf eine Infektion mit dem Schweine-adaptierten Serovar *S. Choleraesuis* A50 reagierten, war die Reaktion bei den 3D4/31 Makrophagen ähnlich wie bei *S. Pullorum* äußerst schwach.

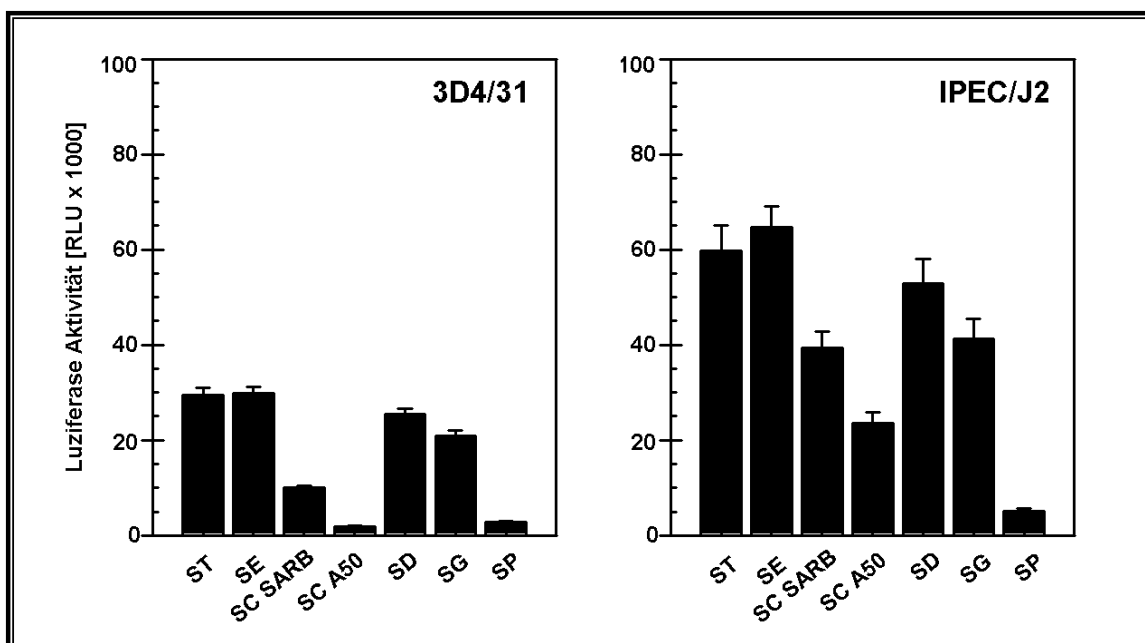


Abbildung 29: Aktivierung von NF- κ B in porcinen Makrophagen (3D4/31, links) und intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, rechts) als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren. Dargestellt ist je eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität in relative luciferase units (RLU) 4 Std. p.i. stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B in Abhängigkeit einer Infektion mit *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Choleraesuis* SARB4 (SC SARB) und A50 (SC A50), *S. Dublin* (SD), *S. Gallinarum* (SG) oder *S. Pullorum* (SP). Die Werte der unbehandelten Negativkontrolle sind jeweils subtrahiert worden.

Deutliche Unterschiede zu diesen Ergebnissen für das Schwein fanden sich bei der Untersuchung der Hühnermakrophagen HD-11 (siehe Abbildung 30). Die höchste NF- κ B Aktivierung war in diesem Fall nach einer Infektion mit dem Hühner-adaptierten Serovar *S. Pullorum* zu beobachten, was deutlich mit den Beobachtungen bzgl. der Flagellin-Mutanten (siehe Abbildung 28) korreliert. Dem folgend führten auch *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis* und *S. Choleraesuis* zu einer recht hohen Aktivierung während *S. Dublin* die geringste bewirkte. Damit ergaben sich insbesondere *S. Pullorum* auf der einen und *S. Typhimurium* sowie *S. Dublin* auf der anderen Seite entgegengesetzte Ergebnisse zu den zuvor beschriebenen porcinen Zelllinien. Betrachtet man zudem die jeweilige intrazelluläre Keimzahl, so findet man nicht etwa die zu erwartende positive Korrelation zwischen Keimzahl und NF- κ B Aktivierung, sondern viel eher eine negative, so dass zum Beispiel *S. Pullorum* mit der weitaus geringsten intrazellulären Keimdichte zur höchsten Aktivierung, *S. Dublin* mit der höchsten Keimzahl zur niedrigsten Aktivierung führten.

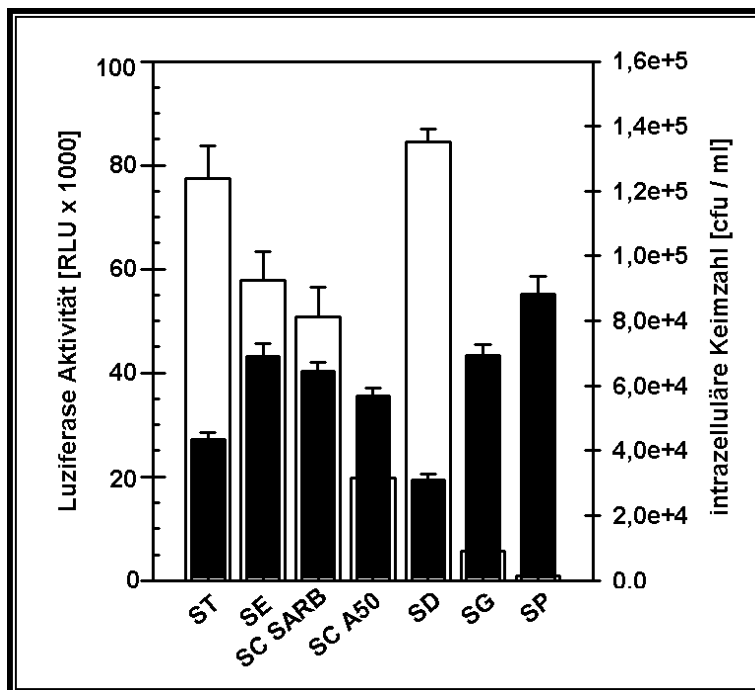


Abbildung 30: Aktivierung von NF- κ B in den Hühner-Makrophagen HD-11 als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren (schwarze Balken). Dargestellt ist je eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität (schwarze Balken) in relative luciferase units (RLU) 4 Std. p.i. stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B in Abhängigkeit einer Infektion mit *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Choleraesuis* SARB4 (SC SARB) und A50 (SC A50), *S. Dublin* (SD), *S. Gallinarum* (SG) oder *S. Pullorum* (SP). Die Werte der unbehandelten Negativkontrolle sind jeweils subtrahiert worden. Zudem ist die zeitgleiche intrazelluläre Keimbelastung in cfu/ml (weiße Balken) angegeben.

Wie die porcinen zeigten auch die humanen Zelllinien viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit durch bestimmte Serovare. So führten sowohl in den Makrophagen als auch in den Epithelzellen Infektionen mit *S. Dublin* gefolgt von den Breitspektrum-Serovaren *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* zu den stärksten NF- κ B Aktivierungen. Damit ist auch

schon der deutlichste Unterschied zwischen porcinen und humanen Zelllinien beschrieben. Wie zuvor bei den porcinen Zellen führte *S. Pullorum* in beiden Zelltypen zur geringsten NF- κ B Aktivierung, die in den Epithelzellen kaum noch messbar war. *S. Gallinarum* bewirkte in den LoVo-Zellen ebenfalls nur in sehr geringem Maße eine Reaktion, während die Makrophagen ähnlich der porcinen 3D4/31 und IPEC-J2 Zellen durchaus auf *S. Gallinarum* durch Aktivierung von NF- κ B reagierten. Auch in diesem Fall korrelieren die Ergebnisse bzgl. der nicht-motilen Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* gut mit den Ergebnissen zur NF- κ B Aktivierung mit aflagellaren Mutanten (vgl. Abbildung 28).

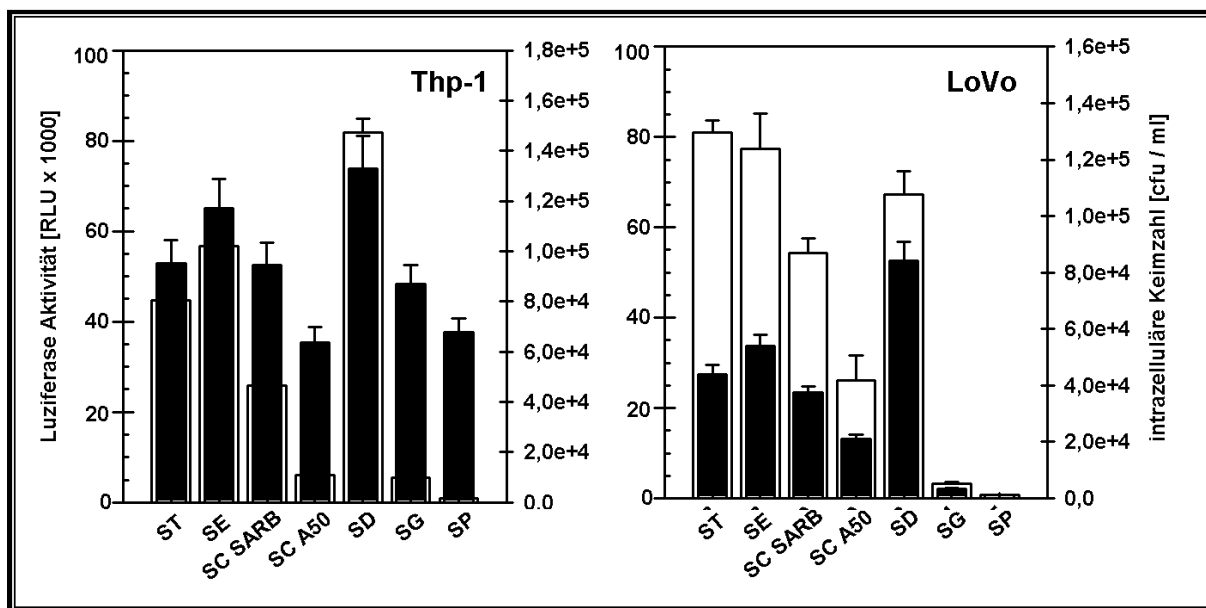


Abbildung 31: Aktivierung von NF- κ B in humanen Makrophagen (THP-1, links) und intestinalen Epithelzellen (LoVo, rechts) als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren. Dargestellt ist je eine repräsentative Messung der Luziferase-Aktivität in relative luciferase units (RLU) 4 Std. p.i. stellvertretend für die Aktivierung von NF- κ B in Abhängigkeit einer Infektion mit *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Choleraesuis* SARB4 (SC SARB) und A50 (SC A50), *S. Dublin* (SD), *S. Gallinarum* (SG) oder *S. Pullorum* (SP). Die Werte der unbehandelten Negativkontrolle sind jeweils subtrahiert worden. Zudem ist die zeitgleiche intrazelluläre Keimbelastung in cfu/ml (weiße Balken) angegeben.

Die Beobachtungen bzgl. der Aktivierung von NF- κ B bei einer Infektion mit künstlich hergestellten Flagellin-Mutanten spiegeln sich also deutlich in der Infektion der Zelllinien mit natürlichen Isolaten wider. So führt ein Verlust des Flagellins im Falle der Mutante aber auch der Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* in humanen Epithelzellen zu einer starken Minderung, in den Hühnermakrophagen HD-11 zu einer Erhöhung der NF- κ B Aktivierung. In den porcinen Zellen scheint dieser Punkt kaum zum Tragen zu kommen, so dass *S. Gallinarum* trotz geringerer Invasivität und Persistenz zu einer ähnlichen Reaktion wie *S. Dublin* oder *S. Choleraesuis* führt und die deutliche Reduktion bei *S. Pullorum*-infizierten Zellen vermutlich nur auf die deutlich reduzierte intrazelluläre Keimzahl zurückzuführen ist. Bzgl. der übrigen Serovare scheint vor allem die intrazelluläre Keimzahl von Bedeutung zu sein, so dass beispielsweise die hohe Aktivierung *S. Dublin*-infizierter humaner Zellen mit

einer besonders hohen Invasivität in humanen Zellen korreliert (vgl. Abbildung 14). Jenachdem folgen in den humanen und porcinen Zelllinien die Breitspektrum-Serovare mit meist recht hoher NF- κ B Aktivierung und danach die Schweine-adaptierten Isolate von *S. Choleraesuis* mit mittlerer bis niedriger Aktivierung.

IV.6. Expression bestimmter Zytokine infolge einer Salmonelleninfektion

Die Aktivierung von NF- κ B führt sowohl in Epithelzellen als auch in Makrophagen zur Induktion der Expression diverser Gene, die u.a. auch für die Synthese von Zytokinen und Chemokinen als wichtige Mediatoren einer Immunantwort verantwortlich sind [337, 352]. Nachdem aus den vorangegangenen Versuchen klar wurde, inwiefern die verwendeten Zelllinien auf PAMPs und verschiedene Serovare mit einer Aktivierung von NF- κ B reagierten, sollte nun geklärt werden, ob diese Aktivierung folgerichtig auch zur Expression bestimmter Zytokine und damit einem phänotypischen Erscheinungsbild führt.

Dazu wurden die Zelllinien wie in den vorangegangenen Versuchen mit einer MOI 5-10 infiziert und entsprechend der NF- κ B Assays 4 Std. p.i. lysiert, um die Wirtszell-RNA zu extrahieren. Nach bestandener Qualitätskontrolle, die eine Überprüfung des 260/280 nm - und 260/230 nm - Quotienten sowie die Kontrolle auf vollständige 18S- und 28S- rRNA-Banden sowie Degradationsprodukte im Agarosegel beinhaltete, wurde die einwandfreie RNA in cDNA übersetzt und die cDNA bestimmter Zytokingene wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12p40 stellvertretend für die Expression dieser Zytokine mittels RealTime-PCR quantifiziert. Pro well wurde eine Gesamt-RNA Menge von 1,5 μ g/well (Primärmakrophagen) bis 14 μ g/well (HD-11, LoVo) erzielt.

Die Genexpressionsuntersuchungen wurden nicht mit allen Zelllinien durchgeführt, sondern dienten vorwiegend zur Vertiefung wichtiger Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten. So zeigte sich während der Analyse der Aktivierbarkeit der Zelllinien durch bestimmte PAMPs und *Salmonella* Mutanten, dass vor allem die humanen Epithelzelllinien sensibel auf Änderungen der Muropeptidkonzentration sowie bakteriellen Flagellins reagierten, während es bei den Hühnermakrophagen HD-11 entgegengesetzt bei Deletion der Flagellengene in den Salmonellen zu einer erhöhten Aktivierung von NF- κ B kam (siehe Abbildung 28). Die Untersuchung der Expression des NF- κ B - abhängigen Chemokins IL-8 in HD-11 und LoVo-Zellen nach einer Infektion mit Deletionsmutanten für *fliC* und *fliB* bzw. für *fliD* [561] relativ zum Wildtyp *S. Typhimurium* SL1344 ergab, dass bei einer Deletion der Flagellengene die Chemokinexpression in LoVo-Zellen deutlich reduziert, während sie in HD-

11 Makrophagen erhöht wurde. Die Anpassung der MOI an verminderte Invasionsraten führte jeweils zu einer Erhöhung der IL-8 – Expression, die jedoch bei LoVo-Zellen den Wert der Wildtyp-infizierten Zellen nicht erreichte und bei HD-11 - Zellen die Erhöhung noch deutlich verstärkte. Nach Deletion von *fliD* fehlt den Bakterien ein zum Aufbau funktioneller Flagellen benötigtes Capping-Protein, so dass die Salmonellen unmotil sind, Flagellin als Monomer jedoch gebildet werden kann. Dementsprechend führte die $\Delta fliD$ -Deletionsmutante zu einer geringeren Zytokinexpression in LoVo-Zellen, die jedoch über der der mit der $\Delta fliC\Delta fliB$ -Doppelmutante infizierten Zellen blieb.

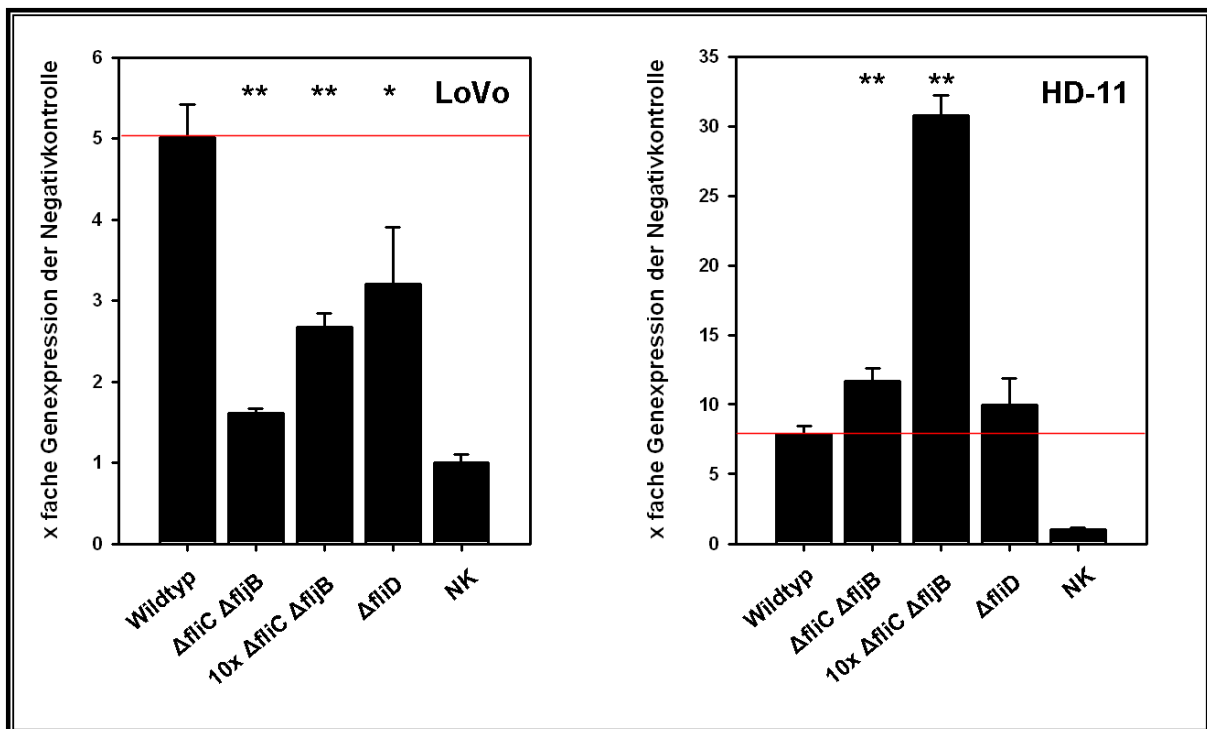


Abbildung 32: Relative Genexpression des Chemokins IL-8 infolge einer Infektion der humanen Epithelzelllinie LoVo (links) und HD-11 (rechts) mit dem *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-Stamm und Mutanten bestimmter Flagellingene (*fliC* und *fliB* bzw. *fliD*). Dargestellt ist die relative Expression von IL-8 4 Std. p.i. der infizierten Zellen zur uninfizierten Kontrolle (NK) eines repräsentativen Experiments. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten. Die relative Genexpression nach Infektion mit dem Wildtypstamm ist durch eine rote Linie markiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der IL-8 Genexpression bei der $\Delta fliC\Delta fliB$ -Doppelmutante über die einfache Invasivitäts-vermittelte Reduktion hinausgeht und dementsprechend bereits in der Literatur beschriebene Effekte auf die zur Aktivierung von NF- κ B führende Signaltransduktion zumindest bei humanen Epithelzellen eine wichtige Rolle spielen [285, 562].

Auch die Infektion mit der $\Delta ampG\Delta mppA$ -Doppelmutante ergab eine der NF- κ B Aktivierung entsprechende Erhöhung der Genexpression der Zytokine IL-1 β und IL-8 im Vergleich zu Wildtyp-infizierten humanen LoVo-Zellen (siehe Abbildung 33).

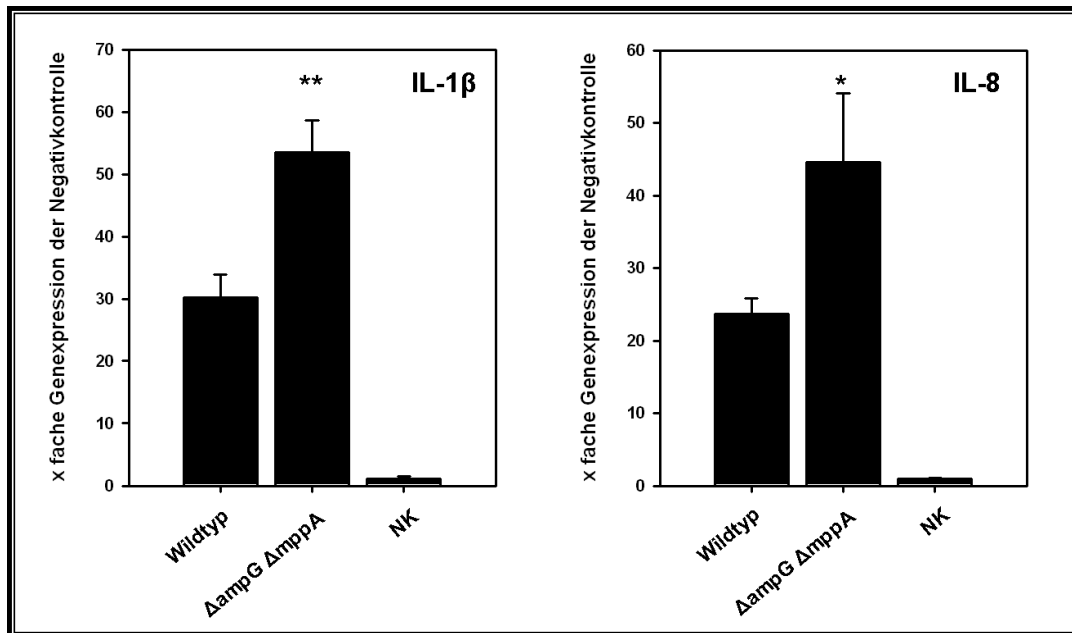


Abbildung 33: Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β (links) und IL-8 (rechts) infolge einer Infektion der humanen Epithelzelllinie LoVo mit dem *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-Stamm und einer $\Delta ampG \Delta amppA$ Mutante. Dargestellt ist die relative Expression von IL-1 β und IL-8 4 Std. p.i. der infizierten Zellen zur uninfizierten Kontrolle (NK) eines repräsentativen Experiments.

Hiermit korrelierten also die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mit denen der NF- κ B Assays, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine erhöhte NF- κ B Aktivierung auch eine entsprechende Erhöhung der Expression wichtiger Chemokine wie IL-8 zur Folge hatte und damit eine entsprechende Wirkung in der Immunreaktion erzielte.

Analog zu den Genexpressionsstudien mit *Salmonella* Mutanten wurden nun auch die Serovare in entsprechenden Versuchen eingesetzt, um einen Zusammenhang zwischen NF- κ B Aktivierung und daraus resultierender Zytokinexpression herstellen zu können. Exemplarisch wurde die Reaktion der mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren infizierten Makrophagenzelllinien THP-1, HD-11 und humanen Primärmakrophagen untersucht. Betrachtet man zuerst die Hühnermakrophagen HD-11, so fällt auf, dass, wie zuvor bei den NF- κ B Assays beobachtet, auch hier die *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* infizierten Makrophagen trotz geringerer Keimbelastung (vgl. Abbildung 7) mit die höchsten Zytokinexpressionen aufwiesen, während stark invasive und gut persistierende Serovare wie *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zwar ebenfalls eine starke Expressionsänderung insbesondere der Zytokine IL-1 β , IL-12p40 und IL-8 zeigten, diese jedoch geringer als bei *S. Gallinarum* / *Pullorum* infizierten Zellen ausfiel (siehe Abbildung 34). *S. Choleraesuis* infizierte Makrophagen wiesen eine im Verhältnis zu den anderen Serovaren mittlere Expressionsänderung auf. Somit reagierten die infizierten HD-11 Zellen sehr deutlich auf eine Infektion mit einer z.T. 500-fachen Steigerung der Expression

bestimmter Zytokine; die Stärke der Expressionsänderung war jedoch abhängig vom Serovar sehr unterschiedlich und ähnelte dem Muster der NF- κ B Aktivierung.

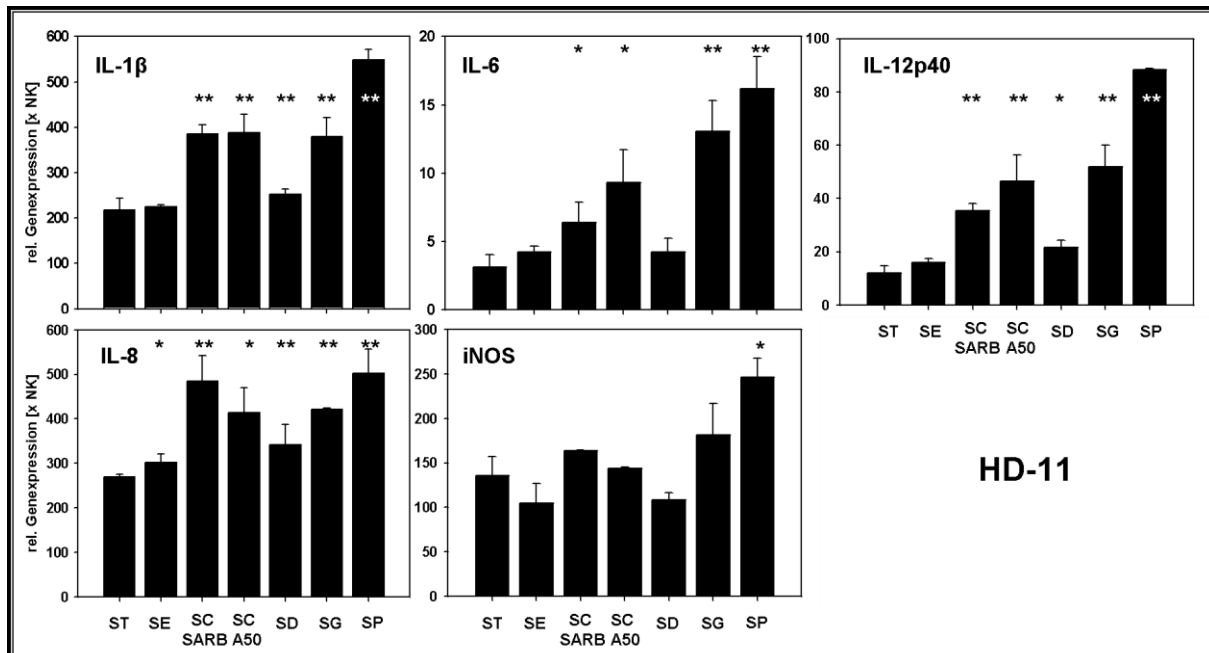


Abbildung 34: Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12p40 sowie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) infolge einer Infektion der Hühnermakrophagen HD-11 mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP). Dargestellt ist die relative Expression der Zytokine sowie der Synthase 4 Std. p.i. der infizierten Zellen zur uninfizierten Kontrolle (NK) eines repräsentativen Experiments.

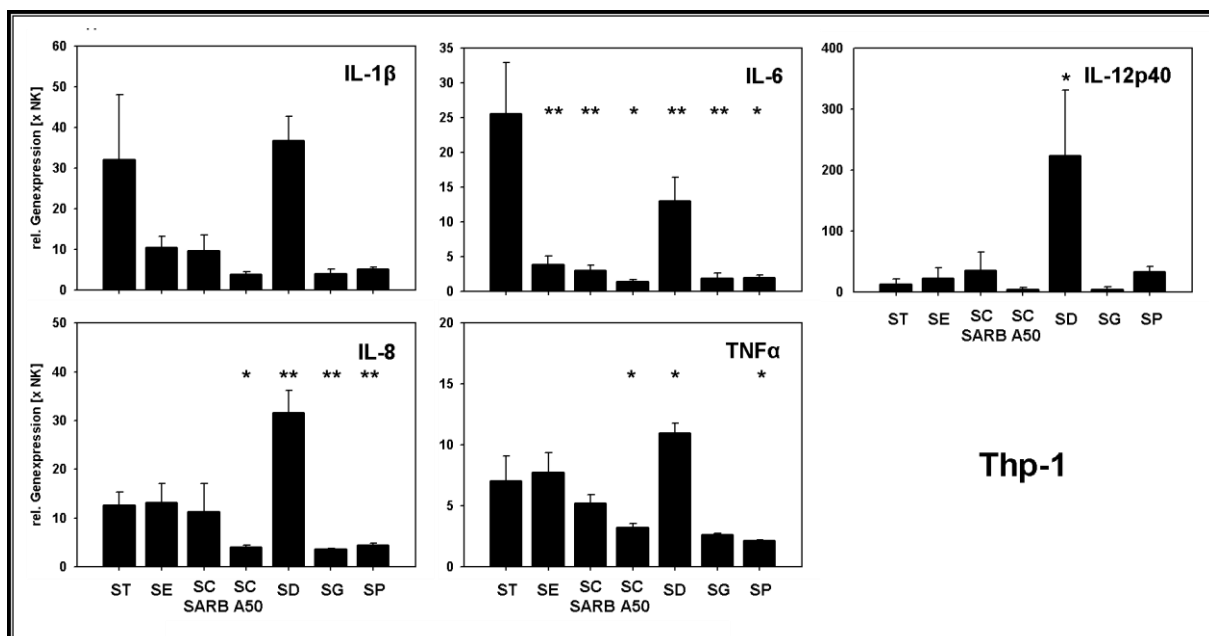


Abbildung 35: Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 und TNF α infolge einer Infektion der humanen Makrophagen THP-1 mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP). Dargestellt ist die relative Expression der Zytokine 4 Std. p.i. der infizierten Zellen zur uninfizierten Kontrolle (NK) eines repräsentativen Experiments.

Bei den humanen Makrophagen THP-1 war die Expressionsänderung durchschnittlich geringer als bei den Hühnermakrophagen (siehe Abbildung 34). Nichtsdestotrotz wurden auch

hier deutliche Expressionsänderungen durch Infektionen mit allen Serovaren bewirkt. Besonders hoch war die Änderung für IL-1 β und IL-6 bei *S. Typhimurium* und *S. Dublin* infizierten Zellen. Bei den restlichen Zytokinen dominierten *S. Dublin* infizierte Zellen, gefolgt von *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Choleraesuis* SARB4 infizierten Makrophagen. Damit spiegeln sich die Ergebnisse der NF- κ B Aktivierung vor allem in der Expression der Zytokine IL-8, IL-12p40 und TNF α wieder.

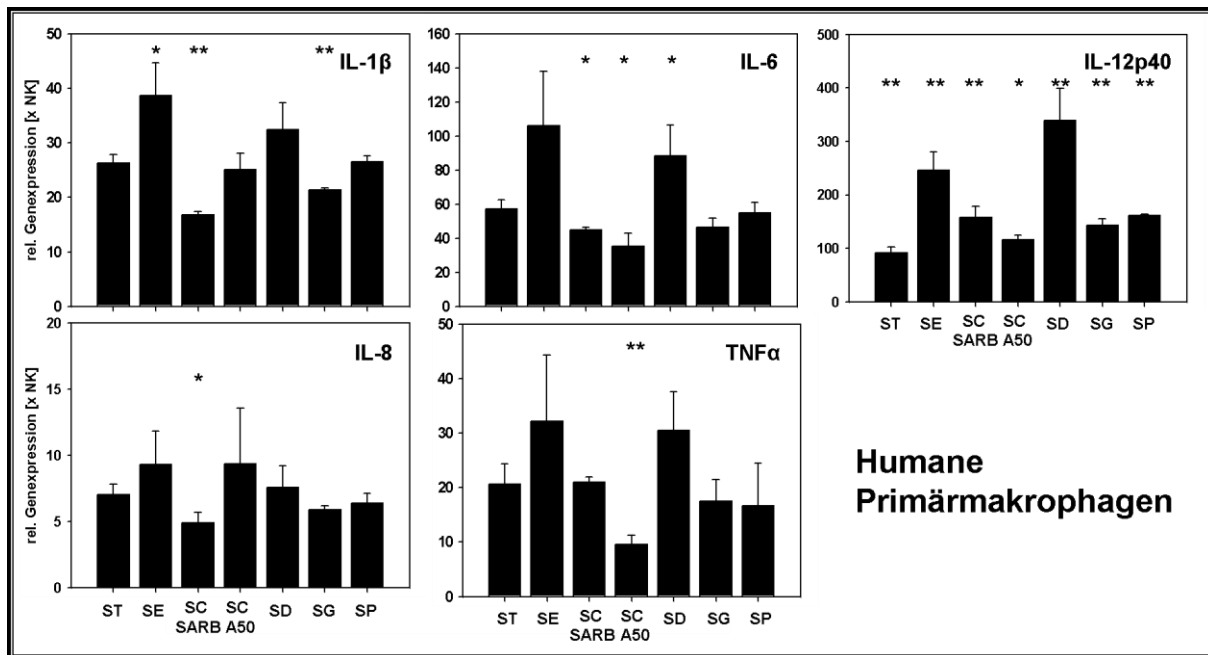


Abbildung 36: Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 und TNF α infolge einer Infektion humaner Primärmakrophagen mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP). Dargestellt ist die relative Expression der Zytokine 4 Std. p.i. der infizierten Zellen zur uninfizierten Kontrolle (NK) eines repräsentativen Experiments.

Betrachtet man im Vergleich die Infektion humaner Primärmakrophagen (siehe Abbildung 36), so ist die Expressionsänderung der Zytokine hier häufig einheitlicher als bei den THP-1 Zellen, auch wenn klare Unterschiede zwischen den Serovaren auffallen. Insgesamt ist die Expressionsänderung im Verhältnis zu den uninfizierten Makrophagen trotz geringerer Invasionsraten von *Salmonella* (siehe IV.2.3) ähnlich stark wie bei den THP-1 Makrophagen. Auch in den Primärmakrophagen verursachte *S. Dublin*, diesmal jedoch häufig zusammen mit *S. Enteritidis* die höchsten Expressionsänderungen. Ähnlich der THP-1 Ergebnisse kam es infolge einer *S. Choleraesuis* A50-Infektion zur geringsten Expressionssteigerung, während die *S. Gallinarum* / Pullorum infizierten Primärmakrophagen im Gegensatz zu den THP-1 Makrophagen eher eine mittlere Expressionsänderung auslösten. Somit fällt auf, dass die humanen Primärmakrophagen hinsichtlich ihrer Reaktion auf eine Infektion nicht ganz so deutlich zwischen den Serovaren unterschieden, wie es zuvor für die humanen THP-1

Makrophagen und z.T. auch die Hühnermakrophagen HD-11 beobachtet wurde. Insgesamt ähnelte die Reaktion jedoch eher den humanen THP-1 als den aviären HD-11 Zellen.

IV.7. Genomweite Genexpression humaner Primärmakrophagen infolge einer Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren

Um über die Expression bestimmter Zytokine hinausgehende Erkenntnisse zur genomweiten Expressionsänderung von Genen infolge einer Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren zu erhalten, wurden humane Primärmakrophagen aus Spenderblut extrahiert, ausdifferenziert und entsprechend vorangegangener Infektionsversuche mit *Salmonella* Serovaren unterschiedlicher Wirtsspezifität infiziert. In Anlehnung an die Versuche zur NF- κ B Aktivierung infizierter Zellen und einer parallel mit Primärmakrophagen aus Hühnerblut durchgeführten Studie in der Arbeitsgruppe von B. Kaspers an der LMU München [563] wurden die Zellen 4 Std. p.i. lysiert, die Gesamt-RNA extrahiert und u.a. durch die IMGGM Laboratories GmbH, Martinsried, hinsichtlich ihrer Qualität untersucht. Pro well wurden zwischen 6 – 15 μ g Gesamt-RNA extrahiert. Die 260/280 nm – Quotienten lagen hierbei zwischen 1,97 – 2,18, was einer hohen Reinheit entspricht. In Abwandlung zu den RTqPCR-Experimenten wurde die RNA zudem mittels Bioanalyzer untersucht. Die sogenannte RNA-Integritätsnummer (RIN) stellt hierbei ein Qualitätsmerkmal dar, das von Agilent Technologies und Quantiom Bioinformatics entwickelt wurde. Die gemessenen RIN-Werte der RNA-Proben lagen zwischen 9,3 – 9,8, was ebenfalls für eine gute Qualität und Integrität der RNA spricht.

Von den Proben wurden je 500 ng RNA eingesetzt und entsprechend III.3.7 zuerst in cDNA revers transkribiert, dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin-3 durch Einbau von Cy3-CTPs markiert und in cRNA transkribiert. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der markierten RNA ergab Werte zwischen 13 – 15 pmol Cy3 / μ g RNA, die damit deutlich oberhalb des von Agilent erforderten Grenzwertes von > 9 pmol Cy3 / μ g RNA lagen. Die Hybridisierung der markierten cRNA auf humane 4x44K v2 Microarray-Glasträger von Agilent, die Waschschrte, das Einscannen der Arrays sowie die Auswertung erfolgten am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin, unter Anleitung von H. Mollenkopf. Nach dem Scannen der Arrays und Bearbeitung der Daten durch die Agilent Feature Extraction Software erhielt man einen Qualitätsreport, der für alle Arrays unauffällig und damit positiv

ausfiel.

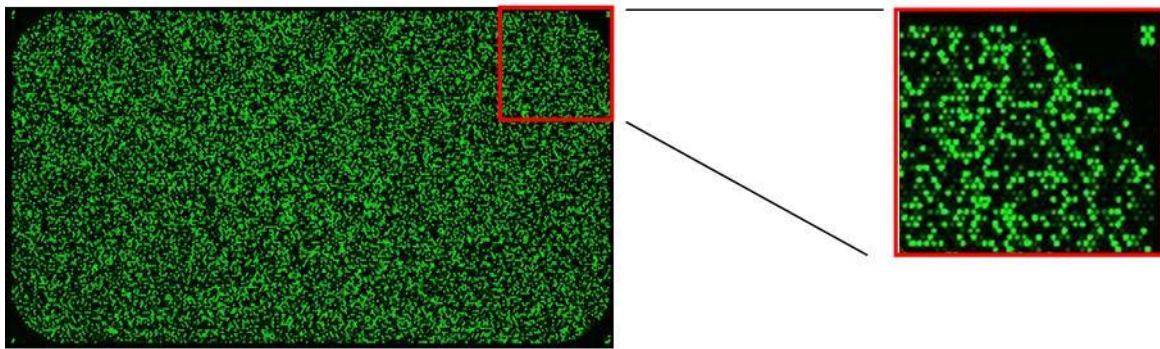


Abbildung 37: Eingescanntes Bild eines von vier 44K Arrays als Beispiel uninfizierter Makrophagen

Mit Hilfe der Software Rosetta Resolver wurden die einzelnen Signale nach dem LOWESS Algorithmus normalisiert sowie Signifikanzanalysen durchgeführt. Um herauszufinden, welche Gene bei einer Infektion mit einem bestimmten Serovar signifikant herunter- bzw. hochreguliert werden, wurden für jedes der acht Experimente Quotienten (ratios) aus den Signalintensitäten der Gene uninfizierter und denen infizierter Zellen berechnet und diese Quotienten gemittelt. Sie entsprechen bei einer Hochregulation der Expressionsänderung (FC, *fold change*) des betrachteten Gens für ein Experiment. Um Quotienten im Bereich zwischen 1 und 0 bei einer Herunterregulation ebenfalls linear ausdrücken zu können, wurde folg. Formel angewandt: $x = -1 / y$, wobei y dem Quotienten entspricht. Zur Ermittlung der Signifikanz unterschiedlich regulierter Gene zweier Gruppen (z.B. uninfizierte Zellen gegen *S. Typhimurium*-infizierte Zellen) mit je acht Mitgliedern (entsprechend der biologischen Replikate) wurde ein ungepaarter Zweistichproben t-Test (2s t-Test) auf Grundlage der Signalintensitäten angewandt. Darüberhinaus wurde die Signifikanz innerhalb einer Vergleichsgruppe (z.B. uninfizierte vs. *S. Typhimurium*-infizierte Zellen) mit Hilfe eines Einstichproben t-Test (1s t-Test) auf Grundlage der Quotienten ermittelt.

Zur Unterscheidung der regulierten Gene infizierter Zellen von denen uninfizierter Zellen wurde eine *false discovery rate* (FDR) oder Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% entsprechend p-Werten von 0,01 akzeptiert. In Tabelle 11 ist die Anzahl signifikant regulierter Gene (erfüllen sowohl den 1s als auch 2s t-Test) infolge einer Infektion humaner Primärmakrophagen, deren Expression sich mindestens um den Faktor 2 verändert hat, dargestellt. Betrachtet man die Auswirkung der Signifikanzanalyse, so stellt man fest, dass ein großer Teil der signifikant regulierten Gene (48 – 68%) die Anforderungen nicht erfüllt und dementsprechend in den folgenden Analyseschritten nur zum Teil berücksichtigt wurde. Nichtsdestotrotz kam es infolge einer Infektion zu einer mindestens um den Faktor 2

signifikant veränderten Expression von 5 - 11% der rund 32.000 auf den Array gespotteten Wirtsgene.

Serovar	Regulierte Gene (mind. ± 2 -fach)	Signifikant regulierte Gene	...davon hochreguliert	...davon herunterreguliert
S. Typhimurium	4530	1467	701	765
S. Enteritidis	7390	2383	1445	938
S. Dublin	6839	3524	2442	1082
S. Choleraesuis	6718	2979	1913	1066
S. Gallinarum	5254	2684	1237	1447

Tabelle 11: Anzahl unterschiedlich regulierter Gene nach einer Infektion mit den *Salmonella* Serovaren Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis oder Gallinarum (mit oder ohne Signifikanztest)

Zur Untersuchung der Signalwege, die durch eine veränderte Genexpression beeinträchtigt wurden, wandte man die Programme „Ingenuity“ und „Pathway Express“ an. Da im späteren Verlauf der Untersuchungen zunehmend der „Pathway Express“ benutzt wurde, gehe ich im Folgenden ausschließlich auf die daraus erhaltenen Resultate ein. Eingegeben wurden die in der Tabelle 11 genannten Gene, die beispielsweise bei einer *S. Typhimurium* Infektion signifikant ($p < 0,05$) mind. um das ± 2 - fache reguliert worden sind. Die am stärksten betroffenen Signalwege sind in Tabelle 12 genannt.

Darin werden die Signalwege entsprechend eines sogenannten *impact factor* (IF) sortiert, der sich aus Parametern wie der Expressionsänderung, der statistischen Signifikanz der Gene für den Signalweg, der Lage der importierten Gene sowie der Interaktion mit anderen Genen im Netzwerk zusammensetzt [564]. Je höher der *impact factor* ist, desto spezifischer sind die importierten Gene für den entsprechenden Signalweg. Aus dem herkömmlichen p-Wert berechnete das Programm mit dem IF den sogenannten γ p-Wert, der für die Signifikanz der Zuordnung steht. Ein Signalweg wird als signifikant beeinflusst angesehen, wenn der γ p-Wert $< 0,05$ ist. Da diesen Wert jedoch nur wenige Signalwege erfüllen, wurden auch γ p-Werte bis zu 0,25 berücksichtigt.

Erwartungsgemäß werden danach bei einer Infektion vor allem das TLR-Signalling, aber auch andere Signalwege wie das MAPK Signalling oder der Jak-STAT-Weg beeinflusst, die letztlich wichtige Rollen in der Regulation der Immunabwehr übernehmen und zur Expression von Zytokinen und Chemokinen führen. Ändert man die Zahl der importierten Gene durch Änderung der Filter für die Signifikanz oder der Genexpressionsänderung, so ändert sich bei Werten zwischen $p = 0,01$ bis $0,05$ und $FC > 1,5$ bis 2 sowie $< -1,5$ bis -2 lediglich die Rangfolge nicht jedoch die involvierten Signalwege, da diese nur mit entsprechend mehr oder weniger Genen ausgefüllt werden.

Rang	Name des Signalwegs	Impact Factor	% Gene des Signalwegs im Input	γ p-Wert
1	Cytokine-cytokine receptor interaction	18,16	17,87	2,49E-07
2	Phosphatidylinositol signaling system	16,45	7,90	1,25E-06
3	Toll-like receptor signaling pathway	13,14	21,57	2,79E-05
5	Apoptosis	11,30	20,23	1,52E-04
6	Jak-STAT signaling pathway	11,28	16,77	1,56E-04
11	Adipocytokine signaling pathway	7,81	14,93	3,58E-03
13	MAPK signaling pathway	6,54	9,93	0,01
14	ErbB signaling pathway	6,36	6,90	0,01
15	Hematopoietic cell lineage	6,34	11,49	0,01
17	Adherens junction	5,85	11,54	0,02
19	TGF-beta signaling pathway	5,30	9,20	0,03
21	Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	4,20	11,77	0,08
23	Insulin signaling pathway	4,03	9,42	0,09
24	Complement and coagulation cascades	3,84	5,80	0,10
26	Natural killer cell mediated cytotoxicity	3,51	8,89	0,13
30	Gap junction	3,13	4,17	0,18
32	Fc epsilon RI signaling pathway	2,97	7,69	0,20
33	PPAR signaling pathway	2,83	12,86	0,23
34	Tight junction	2,71	3,70	0,25

Tabelle 12: Rangliste bei einer *S. Typhimurium* Infektion humaner Primärmakrophagen betroffener Wirtssignalwege. Die Liste enthält die anhand eines impact factors gewichteten Signalwege infolge einer Infektion 4 Std. p.i. Desweiteren wird der Anteil der importierten signifikant regulierten Gene an den insgesamt zum Signalweg zählenden Gene sowie Werte für die Signifikanz der Beeinträchtigung eines Signalweges angegeben. Die Liste wurde um irrelevante Signalwege wie der Krebsentstehung bereinigt.

Mit Hilfe des Programms lassen sich die entsprechenden Signalwege auch bildlich darstellen, was in Abbildung 38 beispielhaft für das TLR-Signalling zu sehen ist. In der Darstellung werden hochregulierte Gene in rot, herunterregulierte Gene in blau unterlegt. Klar zu erkennen ist demnach die Hochregulation des NF- κ B Signalweges, während Toll-ähnliche Rezeptoren und der AP-1 Weg eher herunterreguliert werden. Folgerichtig werden zudem auch Gene diverser Zytokine sowie kostimulatorischer Faktoren, die für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems von Bedeutung sind, hochreguliert, die größtenteils vor allem unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B stehen.

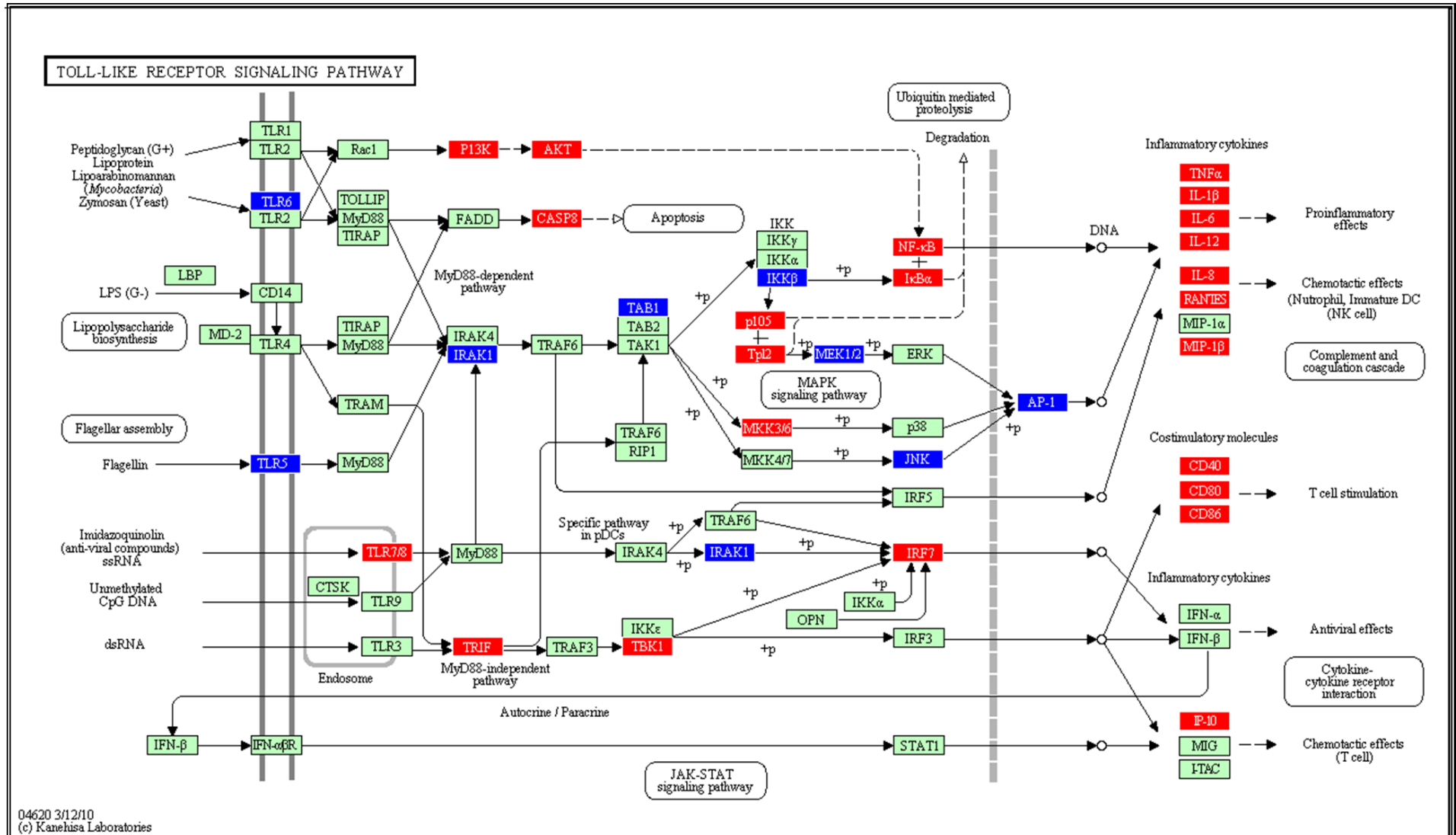


Abbildung 38: Schematische Darstellung der im Toll-like Rezeptor Signalweg hoch- (rot) bzw. herunterregulierten (blau) Gene infolge einer Infektion humaner Primärmakrophagen mit *S. Typhimurium* SL1344. Die Darstellung erfolgte auf Grundlage der frei verfügbaren Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

Zur genaueren Analyse ist in Tabelle 13 eine Auswahl von Genexpressionsänderungen für Gene, die für das angeborene Immunsystem relevant sind, aufgelistet. Betrachtet man die einzelnen Faktoren entlang der Signalkette von der Pathogenerkennung bis zur Expression zellulärer Signalmoleküle, so findet man im Bereich der für eine bakterielle Abwehr interessanten Rezeptoren eher geringfügige Veränderungen als Reaktion auf eine Infektion. Auffällig ist vor allem eine verhältnismäßig starke Herabregulation des Flagellin-bindenden TLR5, die scheinbar unabhängig vom tatsächlichen Vorhandensein bakteriellen Flagellins ist, da kaum Unterschiede zwischen den begeißelten Serovaren und dem aflagellären *Salmonella* Serovar Gallinarum zu erkennen sind. Auch der intrazelluläre Rezeptor zur Flagellin-Erkennung NLRC4 (Ipaf) wurde etwas stärker herabreguliert als die übrigen intrazellulären Rezeptoren. Zudem fällt die Induktion eines Oberflächenantigens CD274 auf, das auch als *Programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) bekannt ist und eher eine immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen ausübt [565]. Seine Hochregulation ist bereits aus Experimenten mit Mäusen durch bakterielle Stimuli bekannt [566]. Bzgl. der anschließenden Signalwege wurden ebenfalls eher geringe Expressionsänderungen beobachtet. Während die Expression von NF- κ B Untereinheiten, wie bereits erwähnt, leicht hochreguliert wurde, kam es bzgl. des AP-1 Signalweges zumindest anhand von *c-fos* zu einer deutlichen Expressionsreduktion. Zudem fällt die Hochregulation von IRF1 und 7 auf. Während der *interferon regulatory factor 7* (IRF 7) eher in der viralen Abwehr als bedeutend beschrieben wurde, fungiert IRF 1 umfassender in der Entwicklung und Aktivierung von Immunzellen [567]. Eine entsprechende Hochregulation deutet dementsprechend auf die zunehmende Aktivierung der Makrophagen hin. Große Expressionsänderungen wurden vor allem bei den Zytokinen gefunden. Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 α und - β , IL-6, IL-12p40, IL-23 und IL-27/30 wurden sehr stark jedoch unabhängig vom infizierenden Serovar induziert. In deutlich geringerem Maße fand jedoch auch eine Hochregulation eher regulatorisch wirkender Zytokine der IL-10 Familie (IL-10, IL-19, IL-22, IL-24) statt [568]. Auch bei den Chemokinen kam es vor allem zu Hochregulationen. Allen voran sind große Änderungen bei CCL1, CCL5, CXCL10, CXCL11 und insbesondere CCL20 zu erkennen, wo die Expressionsänderung um den Faktor 80 lag. Daneben waren auch einige Wachstumsfaktoren betroffen wie etwa Adrenomedullin, welches bereits zuvor in der Literatur bei der Stimulation von Makrophagen mit LPS aufgefallen ist [569]. Heraus sticht jedoch die Induktion der *Colony-stimulating factor 2* und 3 (CSF2, 3) mit einer etwa 100-fachen Expressionserhöhung bei CSF3 (*granulocyte-colony stimulating factor*, GCSF). Für CSF2

(*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, GM-CSF) wurde bereits die Bedeutung in der Pathogenese von *Salmonella* Infektionen näher untersucht [570].

Rezeptoren	ST	SE	SC	SD	SG
TLR2	1,4	1,1	1,3	1,2	1,1
TLR4	1,1	-1,2	-1,1	1,2	-1,1
TLR5	-6,1	-9,3	-5,9	-8,9	-5,4
TLR9	1,2	1,6	1,3	1,3	1,2
NOD1	2,0	1,7	1,8	2,5	1,8
NOD2	1,8	-1,4	-1,1	1,4	-1,1
NLRC3	-1,5	-2,1	-2,0	-2,0	-1,8
NLRC4 / Ipaf	-3,9	-4,3	-3,8	-4,8	-4,2
NLRC5	1,8	1,8	2,3	2,0	2,8
CD14	-1,2	-1,1	-1,1	-1,2	-1,1
CD40	1,7	2,2	2,6	2,3	2,8
CD69	4,3	2,8	3,1	6,2	3,1
CD80	6,7	3,3	3,9	6,2	4,0
CD86	2,1	1,2	1,8	4,5	1,7
CD274	6,4	5,7	6,3	7,0	6,0
TLR / NOD Signalling					
IRF1	3,7	4,0	5,3	4,6	5,7
IRF3	-1,2	-1,2	-1,0	-1,2	1,1
IRF7	8,5	9,2	7,4	10,9	8,5
IRAK1	-1,8	-1,7	-1,1	-1,8	-1,1
IRAK4	-1,3	-2,6	-2,3	-1,9	-2,1
TRAF6	1,2	-1,1	-1,1	1,1	-1,1
NFκB1	3,0	3,0	2,9	3,4	2,8
NFκB2	3,0	4,5	3,7	3,3	4,0
RelA	1,7	2,2	2,6	2,0	3,1
RelB	1,7	1,3	1,5	1,6	1,4
c-Rel	3,2	2,2	3,2	3,0	2,7
JUN	-1,4	-2,0	0,0	-1,7	-1,7
FOS	-3,5	-4,7	-5,9	-4,9	-5,6
Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF)					
2, TNFα	24,5	25,8	28,5	29,8	35,6
9, CD137L	11,0	13,9	10,7	12,0	12,7
10, TRAIL	14,0	9,9	7,6	23,0	7,0
12, TWEAK	-1,2	-1,4	-1,7	-1,6	-1,4
15, VEGI	8,3	3,7	3,9	3,9	2,7

Interleukine					
IL-1 α	36,5	16,5	27,3	17,0	17,8
IL-1 β	11,8	13,3	13,0	11,1	12,1
IL-6	70,4	59,4	60,9	70,1	54,0
IL-10	3,1	4,0	3,8	4,4	4,2
IL-12p35	2,4	2,3	2,8	3,2	2,5
IL-12p40	26,2	20,6	20,7	33,2	18,9
IL-15	3,2	3,3	3,1	3,7	3,3
IL-19	2,1	2,6	3,2	2,4	2,2
IL-22	11,0	8,8	7,4	10,4	8,6
IL-23	77,2	80,5	80,6	75,5	76,4
IL-24	1,4	1,6	1,7	1,7	1,6
IL-27/IL-30	50,4	65,1	58,0	73,1	62,2
CC Chemokine					
CCL1	12,3	12,6	11,8	11,6	11,0
CCL4	5,3	6,3	6,6	6,1	6,5
CCL5, RANTES	9,4	11,8	11,2	12,5	10,9
CCL8, MCP-2	6,6	2,9	4,7	6,1	3,7
CCL14	4,1	3,8	4,0	3,2	5,7
CCL15	8,1	7,5	6,5	6,0	8,6
CCL19, MIP-3b	3,1	4,4	3,4	4,4	3,9
CCL20, MIP-3a	85,7	70,5	82,6	83,6	83,0
CXC Chemokine					
CXCL1, GRO α	8,5	6,8	8,1	6,4	5,7
CXCL2, GRO β	7,2	5,2	6,1	4,6	4,3
CXCL3, GRO γ	10,7	4,6	7,5	6,0	4,6
CXCL8, IL-8	6,7	6,1	6,0	6,1	5,3
CXCL9	3,5	3,0	3,5	5,4	3,4
CXCL10, IP-10	10,6	14,2	10,5	24,0	10,4
CXCL11, IP-9	9,4	9,4	9,5	17,5	9,9
Wachstumsfaktoren					
Adrenomedullin	6,2	5,3	5,9	8,2	5,6
BMP2A	13,1	10,8	10,3	13,2	12,1
CSF2	14,6	19,8	14,5	17,1	15,1
CSF3	99,5	100,0	99,8	99,9	100,0
VEGFC	9,0	4,6	4,6	5,6	3,9

Tabelle 13: Genexpressionsänderungen ausgewählter immunrelevanter Faktoren in mit *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Choleraesuis* A50 (SC), *S. Dublin* (SD) oder *S. Gallinarum* (SG) infizierten humanen Primärmakrophagen. Dargestellt ist jeweils die Expressionsänderung zu uninfizierten Zellen mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ (grün) oder $p < 0,05$ (gelb) bzw. ohne Signifikanz (transparent) 4 Std. p.i.

Auf der Suche nach Serovar-spezifisch regulierten Genen fallen bezüglich der zuvor beschriebenen immunrelevanten Bereiche keine Gene durch größere Unterschiede auf.

Um aufzuklären, ob es jenseits dieser in der Literatur bereits recht gut beschriebenen Faktoren Gene gibt, die abhängig vom infizierenden Serovar unterschiedlich reguliert werden, wurden analog dem Vergleich uninfizierte gegen infizierte Zellen nun die mit verschiedenen Serovaren infizierten Zellen untereinander verglichen und die jeweils unterschiedlich regulierten Gene in Venn Diagrammen dargestellt (siehe Abbildung 39).

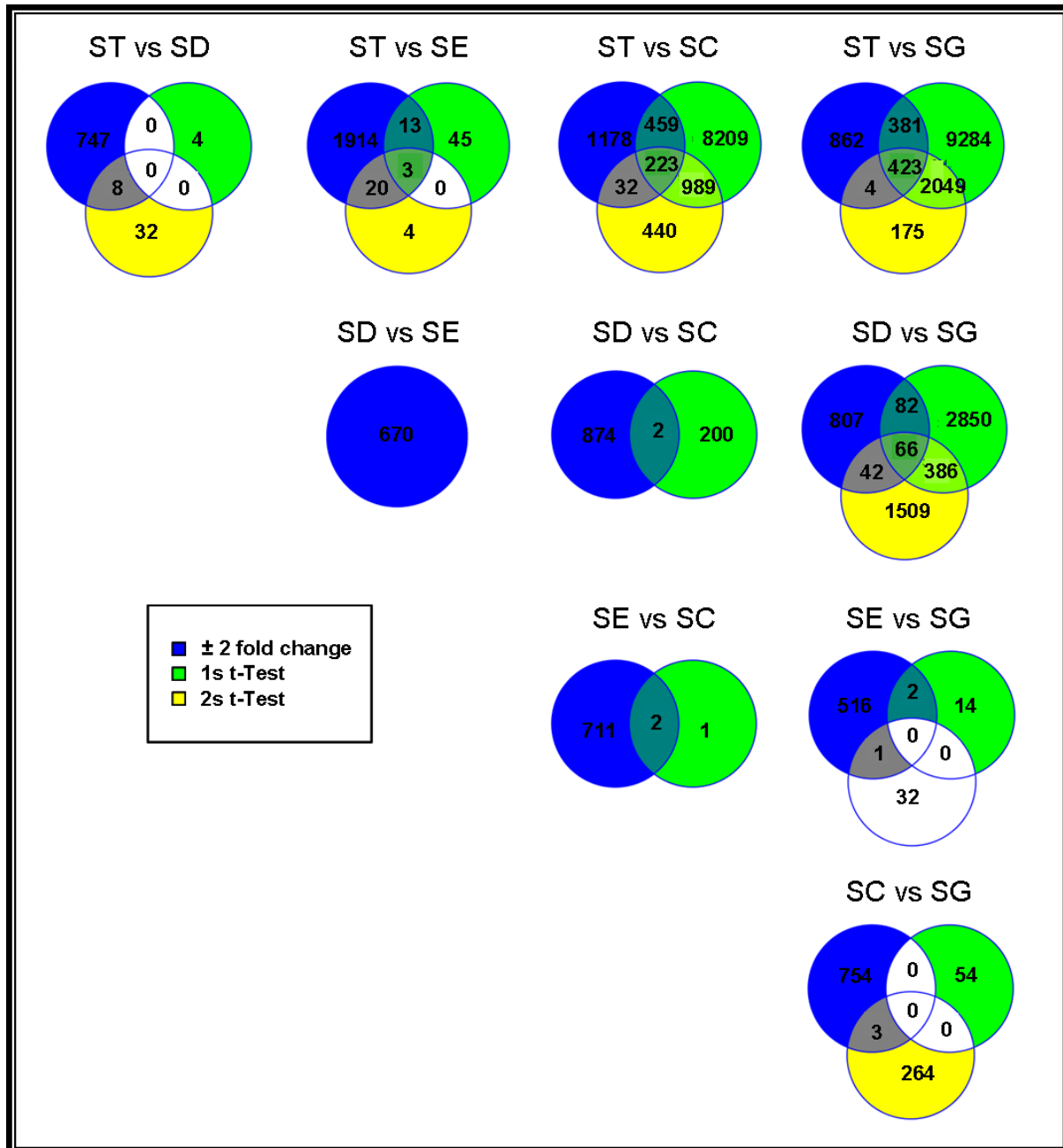


Abbildung 39: Venn-Diagramme unterschiedlich regulierter Gene bei einer Infektion humaner Primärmakrophagen im Vergleich zweier verschiedener Serovare. Genannt wird jeweils die Anzahl der Gene mit einer mind. ± 2 -fachen Expressionsänderung (blau), die den Einstichproben T-Test (grün) bzw. den Zweistichproben T-Test (gelb) erfüllen. ST: S. Typhimurium, SE: S. Enteritidis, SC: S. Choleraesuis, SD: S. Dublin, SG: S. Gallinarum

Bedingung war wiederum eine ± 2 -fach veränderte Genexpression, die sowohl den 1s- als auch 2s t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% erfüllte. Hierbei fällt auf, dass es

in den meisten Fällen keine bzw. sehr wenige Gene gab, die Serovar-spezifisch signifikant unterschiedlich reguliert wurden. Die größten signifikanten Unterschiede gab es zwischen Makrophagen, die mit *S. Typhimurium* oder *S. Gallinarum* infiziert wurden (423 Gene) sowie zwischen *S. Typhimurium* und *S. Choleraesuis*-infizierten Zellen (223 Gene). Somit wurde ein Großteil der zuvor beschriebenen in ihrer Expression veränderten Gene bei einer Infektion unabhängig vom infizierenden Serovar beeinflusst. Serovar-spezifische Einflüsse, die im Zusammenhang mit der Wirtsspezifität oder der jeweiligen Pathogenese stehen, lassen sich hier nicht erkennen. Betrachtet man die tatsächlich Serovar-spezifisch unterschiedlich regulierten Gene, so stammen diese häufig aus metabolischen sowie Apoptose-Signalwegen, die bei Berücksichtigung der Ergebnisse zu zytotoxischen Effekten während einer Infektion (siehe IV.3) sich leicht nachvollziehen lassen und damit eher auf einer Belastung der Zelle mit einer unterschiedlichen hohen Keimdichte beruhen als auf Effektor-vermittelte Signalwege. Eine vollständige Liste der unterschiedlich regulierten Gene ist im Anhang zu finden.

V. DISKUSSION

Auch in Zeiten sinkender Fallzahlen, u.a. durch zunehmend greifende Kontrollprogramme in der Tierhaltung, spielen Lebensmittel-bedingte Infektionen durch nicht-typhoidale *Salmonella* sowohl in den Industrienationen als auch den weniger entwickelten Staaten eine bedeutende Rolle und führen neben den Erkrankungen zu erheblichen ökonomischen Verlusten im Gesundheitswesen und der Lebensmittelindustrie [11, 571]. 2010 lag die Inzidenz in der EU im Schnitt bei 21,5 Fällen / 100.000 Einwohner, von denen die Breitspektrum-Serovare *S. Enteritidis* (45%) und *S. Typhimurium* (22,4%) mit zusammen etwa 67,4% den Großteil aller Fälle ausmachten [572]. Als Hauptinfektionsquelle gelten in den Industrienationen nach wie vor Lebensmittel vom Schwein oder Huhn. Eine Studie von Rodriguez *et al.* zeigte, wie weit *Salmonella* in Tierställen der USA trotz aller Hygiene- und Vorsorgemaßnahmen verbreitet ist. So fanden sie in 4,7% aller untersuchten Umweltproben Salmonellen, die größtenteils aus Schweineställen (57%) stammten, aber auch in Milchviehbetrieben (18%), Hühnerställen (16%) und Mastviehbetrieben (8,5%) zu finden waren [573]. Durch entsprechende Überwachungsprogramme ist es zwar gelungen, vor allem wirtsadaptierte und -beschränkte Serovare wie *S. Dublin*, *S. Choleraesuis* oder *S. Gallinarum* / *Pullorum* aus den Tierbeständen zu verdrängen. Diese führen z.T. nicht nur in den jeweiligen Wirtstieren sondern auch zu einem höheren Anteil als die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis* im Menschen zu schwerwiegenderen systemischen Verläufen mit höheren Mortalitätsraten [71, 574]. Der Erfolg der Programme spiegelt sich damit auch in der gesunkenen *Salmonella*-Prävalenz bei Menschen wider, so dass humane Infektionen mit diesen Serovaren hierzulande kaum noch eine Rolle spielen [572]. Insbesondere aber im asiatischen Raum und in Entwicklungsländern, in denen entsprechende kostenintensive Präventions- und Überwachungsprogramme selten möglich sind, kommen diese Erreger im Menschen noch häufig vor und führen auch unter dem Einfluss von Unterernährung und Immunsuppression zu Erkrankungen mit vielen Todesfällen [132, 575-579]. Doch auch Tierbestände in Europa sind z.T. noch stark mit wirtsadaptierten Erregern belastet. So belegte *S. Dublin* als häufigstes *Salmonella* Isolat aus Rinderherden in Großbritannien zwischen 2003 - 2008 den ersten Platz noch vor *S. Typhimurium* [580]. *S. Choleraesuis* verlor zwar in den Industrienationen seinen Platz als häufigster Erreger im Schwein an *S. Typhimurium*, doch findet man ihn mit 9% aller klinischen Infektionen in den USA im Schwein immer noch unter den Top 5 Erregern [581]. Auch das zunehmende Auftreten (multi-) resistenter Stämme beschränkt sich nicht nur auf Breitspektrum-Serovare und lässt eine Erhöhung der Fallzahlen befürchten, die es letztlich

erfordert, neue Wege in der Bekämpfung von *Salmonella* zu gehen [582]. Unerlässlich ist hierfür ein grundlegendes Verständnis der Infektionsprozesse und der Anpassungsmechanismen von *Salmonella* an seinen Wirt. Welche Rolle dabei das Wirtsimmunsystem einnimmt, lässt bereits die Beobachtung erahnen, dass vor allem Kinder, deren Immunsystem noch nicht vollständig ausgereift ist, und immunsupprimierte Erwachsene bei Infektionen mit nicht-typhoidalen Serovaren ein höheres Risiko aufweisen, eine systemische Bakteriämie zu entwickeln [583-585]. Während diese Serovare auch in vielen Jungtieren z.T. fatale Erkrankungen hervorrufen, vermögen nach Ausreifung des Immunsystems dieses nur noch die jeweils speziessadaptierten Serovare wie etwa *S. Choleraesuis* beim Schwein oder *S. Gallinarum* beim Huhn [476]. Vermutlich hat im Laufe der Evolution bei den wirtsadaptierten Serovaren damit eine Anpassung an das jeweilige Immunsystem stattgefunden, die aber auch eine Einschränkung des Wirtsspektrums mit sich brachte [476].

Welche wirtsabhängigen Faktoren und Spezies-spezifischen Eigenschaften als auch *Salmonella* Serovar-spezifischen Faktoren in der Wirtsadaptation entscheidend sind, ist bislang nur ansatzweise untersucht. Entsprechend der drei im Menschen vorkommenden Krankheitsbilder (Typhus, Bakteriämie, Gastroenteritis) existieren diverse Modelle zu Untersuchung von *Salmonella* Infektionen. Ein durch *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B und C verursachter Typhus als schwerste systemische Erkrankung im Menschen wird am häufigsten durch die Maus als Modellsystem nachgebildet [586]. Da *S. Typhi* in Mäusen keine Infektion auslöst, muss *S. Typhimurium* benutzt werden, um Typhus-ähnliche Krankheitsbilder hervorzurufen. Aufgrund der genetischen Divergenz zwischen *S. Typhi* und *S. Typhimurium* lassen sich etwa *S. Typhi*-spezifische Faktoren wie das Vi-Antigen in der Maus nur durch Klonierung in und Expression durch *S. Typhimurium* untersuchen [587]. Unbekannte Faktoren bleiben dementsprechend unberücksichtigt. Auch könnten *S. Typhimurium*-spezifische Gene zur Anwendung kommen, die in *S. Typhi* gar nicht vertreten sind und damit in der humanen Pathogenese keine Rolle spielen. So sind etwa 5% aller Gene von *S. Typhimurium* LT2 in *S. Typhi* inaktiv [587]. Dass es auch phänotypisch Unterschiede zwischen dem Typhus-Modell der Maus und der Erkrankung im Menschen gibt, zeigte beispielsweise eine Arbeit, in der *S. Typhi* in humanen intestinalen Epithelzelllinien die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 auslöst, während *S. Typhimurium* dies in murinen intestinalen Epithelzellen nicht vermochte [588].

Zur Untersuchung enterocolitischer Infektionen ist das Maus-Modell natürlicherweise aufgrund der sogenannten Kolonisierungsresistenz nicht geeignet [589]. Früh zeigte sich, dass diese Resistenz mit der kommensalen Besiedlung des Darms zusammenhing, so dass eine

Streptomycin-Behandlung auch *S. Typhimurium*-Infektionen ermöglichte [590-592]. In keimfreien Mäusen oder nach Antibiotika-Behandlung verursacht *S. Typhimurium* dann auch der menschlichen Gastroenteritis - ähnliche Symptome [593, 594]. Allerdings wird hier schon klar, mit welchen Anstrengungen künstliche Systeme in Organismen zur Imitation menschlicher Krankheitsverläufe geschaffen werden müssen. Zudem unterscheidet sich die Colitis in der Maus von der Enterocolitis im Menschen in wesentlichen Punkten. So betrifft die Infektion im Menschen eher das terminale Ileum und das proximale Colon wohingegen bei der Maus vor allem Caecum und Colon betroffen sind [595]. Zudem fehlen Mäusen und Ratten die Gene für CXCR1 und seinem Chemokinliganden IL-8, das z.B. im Menschen entscheidend für den Influx polymorphonukleärer Zellen wie Neutrophilen in das infizierte Darmgewebe und demfolgend auch für die beobachtete Gewebsnekrose ist [596, 597]. Die Diarrhoe ist dementsprechend nicht so stark ausgeprägt und ein Übergang zu einer systemischen Ausbreitung ist möglich [593, 595]. Neben der Maus wurden und werden auch Rinder, Schweine, Hühner, Kaninchen und Schafe je nach Fragestellung und verwendeten Serovaren häufig als Versuchstiere genutzt, wobei sich die ausgelösten Krankheitsbilder jedoch häufig nicht mit den entsprechenden Infektionen im Menschen decken. In Ausnahme davon gelten Infektionen in Kälbern aufgrund von klinischen und pathologischen Parametern zur Untersuchung enterischer Erkrankungen als der menschlichen Salmonellose ähnlichstes Modell [595, 598]. Da Tiere jedoch für erste grundlegende und sehr umfangreiche „Screening“ Versuche, wie sie in dieser Arbeit stattfinden sollten, vor allem aus ethischen Gründen als Modell fragwürdig erscheinen und genetische Veränderungen oft nicht verfügbar oder in der gegebenen Zeit nicht etablierbar wären, wurden Zelllinien für die anstehenden ersten Versuche gewählt. Diese haben dazu den Vorteil, dass die Versuchsabläufe leichter zu standardisieren sind, einfließende variable Faktoren auf ein Minimum reduziert sowie besser kontrolliert werden und Änderungen sowie neue Ergebnisse schneller in die Arbeit einfließen können. Nichtsdestotrotz gibt es natürlich eine Reihe einschränkender Argumente in der Arbeit mit Zelllinien. So verändert sich das genetische Repertoire und die Eigenschaften der Zelllinien mit der Zeit, so dass zwei verschiedene Arbeitsgruppen trotz Verwendung der gleichen Zelllinie unterschiedliche Ergebnisse erhalten können [599-601]. Zudem sind die Eigenschaften von Zelllinien, die häufig aus Tumorzellen hervorgingen, nur zu einem gewissen Maße identisch mit denen natürlich vorkommender Zellen desselben Typs. Allein die Fähigkeit apoptotische Vorgänge einzuleiten, ist in Tumorzellen und damit auch in den meisten Zelllinien stark eingeschränkt. Beachtet man jedoch diese Einschränkungen, so ermöglicht es mittlerweile eine Vielfalt verfügbarer Zelllinien aus unterschiedlichen

Organismen, Erkenntnisse z.B. zur Wirtsadaptation von *Salmonella* zu gewinnen, die dann ggfs. im Tiermodell nachvollzogen werden können. Zudem wäre eine Aufklärung einzelner Faktoren aufgrund der Komplexität des Immunsystems ohne eine entsprechende Vereinfachung und Fokussierung auf bestimmte Zelltypen nur schwer möglich.

Betrachtet man die Abläufe während einer Infektion mit *Salmonella*, die zu einer Enteritis führen und denen, die in eine systemische Infektion münden, so findet die entscheidende Weichenstellung wahrscheinlich bereits in einer frühen Infektionsphase statt [142]. In Frage kommen dabei zum einen die durch infizierte Enterozyten und M-Zellen exprimierten und sekretierten Zytokine, die in charakteristischer Weise zur Aktivierung des Immunsystems und zum Influx unterschiedlicher Immunzellen wie Neutrophilen, DCs, Makrophagen und Lymphozyten führen können und damit das Erscheinungsbild einer Erkrankung prägen. So wurde beispielsweise gezeigt, dass es während einer Enteritis durch die Sekretion von IL-8 zu einem massiven Influx von Neutrophilen kommt, während dieser bei typhoidalen Erkrankungen im Menschen ausbleibt bzw. in Mäusen verzögert auftritt [602-604]. Jedoch können auch Makrophagen und DCs für ein entsprechendes Signal sorgen und fungieren zudem als Träger der Salmonellen bei einer systemischen Ausbreitung [389, 605, 606]. So fanden Barrow *et al.* etwa bei der Untersuchung wirtsadaptierter Serovare in Mäusen und Hühnern kaum Unterschiede hinsichtlich der Invasivität im Darmepithel, jedoch ein deutliches Serovar-spezifisches Vermögen entlegenere Organe zu erreichen und in diesen zu überleben [142]. Entsprechende ältere Versuche mit *Salmonella* Mutanten, die unfähig waren, in Makrophagen zu überleben, und sich *in vivo* als avirulent herausstellten, untermauern die Relevanz dieses Zelltyps [607].

Dementsprechend wurden zur Aufklärung und Untersuchung möglicher wirts- und *Salmonella* Serovar-abhängiger Faktoren in der Wirtsadaptation von *Salmonella* intestinale Epithelzelllinien und Monozyten / Makrophagen-ähnliche Zelllinien benutzt. Intestinale Epithelzelllinien waren bis zur Fertigstellung dieser Arbeit leider nur vom Schwein und vom Menschen verfügbar. Alle hier verwendeten Epithelzelllinien sind bereits gut in der Literatur charakterisiert worden und wurden auch schon für Infektionsversuche mit *Salmonella* benutzt [219, 492, 522]. Nachweislich exprimieren IPEC-J2 Zellen wie auch Caco-2 Zellen die TLRs 1 - 6 und 9 [518, 523-525], LoVo Zellen die TLRs 2, 3, 5, 6, 8 und 9, jedoch nicht das zur Erkennung bakteriellen LPS wichtige TLR4 [517, 518], was in dieser Arbeit im Rahmen der NF- κ B Aktivierung durch bakterielle PAMPs auch zu beobachten war (siehe Abbildung 26). Monozyten / Makrophagen-ähnliche Zelllinien waren dagegen von allen drei Spezies verfügbar, auch wenn die porcinen (3D4/31, PLN/C2) und Hühnermakrophagen (HD-11,

MQ-NCSU) weniger gut charakterisiert sind als die humanen Zelllinien THP-1 und U937 (siehe Tabelle 5). Leider war es mangels Verfügbarkeit nicht möglich, Monozyten / Makrophagen gleichen Gewebersprungs zu nutzen, so dass man die unterschiedliche Herkunft aus dem Blut (THP-1, U937, MQ-NCSU), aus dem Knochenmark (HD-11) und aus Lungengewebe (3D4/31) mit einem entsprechend unterschiedlich ausgeprägten Differenzierungsgrad berücksichtigen muss.

Da pulmonale Infektionen in immunkomprimierten Menschen beispielsweise mit *S. Typhimurium* von Zeit zu Zeit in der Literatur beschrieben wurden und Pneumonien im Schwein durch *S. Choleraesuis* durchaus üblich sind, ist die Verwendung von Alveolar-makrophagen durchaus von Interesse [608-610]. Auch ein Eintritt der Salmonellen über die oberen Atemwege und die Lunge wurde für das Schwein diskutiert [611, 612]. Zudem wurde schon früh gezeigt, dass sie bei der Beseitigung von Erregern aus dem Blut durchaus eine wichtige Rolle übernehmen [613].

Auch die verwendeten *Salmonella enterica* Stämme wurden größtenteils schon in der Literatur beschrieben und für ähnliche experimentelle Infektionen verwendet, so dass ein Vergleich der Ergebnisse leichter möglich ist [614-619].

V.1. Invasion und Persistenz von *Salmonella*

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche vergleichende Infektionsstudien mit mehreren *Salmonella* Serovaren und / oder mehreren Wirtsspezies sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter Nutzung verschiedener Modellsysteme durchgeführt. Den Umfang der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien und *Salmonella* Serovare erreichen jedoch nur wenige Studien, so dass der Ansatz dieser Versuchsreihe es ermöglicht, die hier gewonnenen Ergebnisse mit den Einzelergebnissen kleinerer Studien aus der Literatur zu vergleichen. Hinzu kommt, dass die Untersuchung zellulärer Signalwege und Immunreaktionen durch Infektionen mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren die genaue Kenntnis der Infektionsabläufe wie etwa der Zytotoxizität, der Invasivität und des intrazellulären Verhaltens der Stämme erfordern und damit vorausgehende Untersuchungen notwendig machen, auch wenn diese allein in der Vergangenheit eher wenig erfolgversprechend hinsichtlich ihrer Aussagekraft zur Wirtsadaptation von *Salmonella* waren [483, 616, 620].

Mögliche Probleme im Vergleich der verschiedenen Studien und der hier gefundenen Ergebnisse ergeben sich dadurch, dass die Methoden zur Infektion, auch wenn sie auf den ersten Blick ähnlich erscheinen, sich häufig in einigen entscheidenden Punkten unterscheiden, so dass im Vorlauf der hier dargestellten Infektionsversuche bereits eine Abwägung dieser

Varianten stattfand. So werden zur Infektion von Zelllinien oft verschiedene *multiplicity of infections* (Verhältnis infizierender Bakterien / Wirtszellen; MOIs) verwendet, die von einer MOI von 1 bis zu 100 reichen. Welche Auswirkung die Wahl der MOI auf den Infektionsverlauf hat, zeigten die eigenen Experimente zur Zytotoxizität von *Salmonella* (siehe Abbildung 18). So äußerte sich beispielsweise eine MOI von 5 in den meisten Zelllinien über einen Zeitraum von 24 Std. kaum durch absterbende Zellen. Lediglich HD-11 und LoVo Zellen reagierten bereits bei dieser MOI. Zu beobachten war zudem eine mit der MOI zunehmende Azidifikation des Zellkulturüberstands, wie sie auch von Bolton *et al.* schon beschrieben wurde [616]. So muss bei LoVo und HD-11 Zellen bei einer MOI von 5 mit einem Verlust eines größeren Teils der Wirtszellen gerechnet werden, der z.T. allein durch die zunehmende Azidifikation vermittelt wird, wohingegen die anderen Zelllinien bedenkenlos mit dieser MOI behandelt werden können. Genexpressionsänderungen der überlebenden Zellen wären im Falle der LoVo und HD-11 - Zelllinien eher artifiziell durch die Ansäuerung bedingt. Betrachtet man die porcinen Zelllinien, so ließe sich selbst eine MOI von 50 anwenden, ohne dass ein erheblicher Verlust über einen Versuchszeitraum von 24 Std. zu beobachten war. Bei HD-11 Zellen führte diese MOI dagegen zu einem Totalverlust der Wirtszellen und aufgrund des Gentamicin-haltigen Mediums ebenso der rekultivierbaren Bakterien. Die Untersuchung der zellulären Signaltransduktion wäre in diesem Fall ebenfalls sinnlos. Unter diesen Gesichtspunkten wurde für längere Versuche bis zu 24 Std. eine MOI von etwa 0,5, für Kurzzeitversuche bis zu 4 Std., die zudem eine möglichst vollständige Infektion der Wirtszellen wie im Fall der Genexpressionsuntersuchungen erforderte, eine MOI von 5 gewählt.

Als zweiter Punkt soll hier eine dem Infektionsversuch begleitende oder vorangehende aktivierende Behandlung der Wirtszellen diskutiert werden. Es ist bekannt, dass Makrophagen bei vorheriger Aktivierung beispielsweise durch IFN γ oder Markierung der Salmonellen durch Komplementfaktoren oder Antikörper diese effizienter aufnehmen und abtöten [621-624]. Die bakterizide Funktion der Makrophagen wird beispielsweise durch eine IFN γ -abhängige Induktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffintermediate (RNS, ROS) ermöglicht [625, 626]. Da für unsere Fragestellung jedoch vor allem die Rolle der Makrophagen als potentielle Transporter bei einer systemischen Infektion und die frühen Immunantworten auf eine Infektion von Interesse waren, wurde für die hier angewandte Zellkultur stets Hitze-inaktiviertes Serum verwendet, das u.a. keine funktionsfähigen Komplementfaktoren mehr enthält. Mit Ausnahme der Differenzierung humaner Primärmakrophagen durch GM-CSF

und der Zelllinie U937 mit Phorbolestern wurde dem Zellkulturmedium vor oder während einer Infektion keine aktivierenden Agentien wie TNF α oder IFN γ zugesetzt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Entscheidung für eine Zentrifugation der Bakterien zur Festlegung eines gleichzeitigen Startpunkts der Infektion. So sprachen sich Bolton *et al.* gegen einen Zentrifugationsschritt beim Infektionsversuch aus, da dieser eine künstliche Erhöhung der Invasionsraten sowie eine Ablösung der Zellschicht bewirke [616]. Da jedoch in diesem Fall eine vergleichbare Infektionsdauer und eine reproduzierbare Invasivität insbesondere nicht-motiler Serovare oder Mutanten z.B. auch aufgrund unterschiedlichen Pipettierverhaltens kaum herstellbar wären, entschieden wir uns für einen initialen Zentrifugationsschritt, der bereits in anderen Veröffentlichungen zur „Synchronisation“ der Invasion beschrieben wurde [283, 588, 627]. Eine Beschädigung des Monolayers wurde in keinem Fall beobachtet; dementsprechend könnten die Beobachtungen von Bolton *et al.* auf eine zu hohe Umdrehungszahl oder Zentrifugationsdauer zurückzuführen sein. Einzig die künstliche Erhöhung der Invasionsraten, die alle Ansätze mit motilen Stämmen gleichermaßen betraf, ist zu berücksichtigen. Dass trotz der Zentrifugation gravierende Unterschiede in der Invasion von Wildtyp und nicht-motilen *Salmonella* Mutanten in humanen und Hühnerzelllinien zu beobachten waren, spricht für einen Einfluss dieser Mutationen auf den Invasionsprozess unabhängig von der Motilität (siehe auch Abbildung 27) und letztendlich auch für die hier angewandte Methodik. Es bleibt jedoch zu beachten, dass die absolute Invasionsrate eines Stammes nur begrenzte Aussagekraft hat und auf keinen Fall direkt mit anderen Ergebnissen in der Literatur verglichen werden darf. Lediglich eine vergleichende Aussage z.B. hinsichtlich der Invasivität zweier verschiedener Serovare ist zulässig, da man den Invasionsprozess als solches nicht beeinflusste, und wird hier in der Folge angewandt.

So zeigte sich in dieser Arbeit zusammenfassend, dass die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* in allen Zelllinien meist mittlere bis hohe Invasionsraten und darüber hinaus häufig ein hohes intrazelluläres Wachstum aufwiesen, während das wirtsadaptierte Serovar *S. Choleraesuis* überwiegend mittlere Invasivitäten und Wachstumsraten und die beiden wirtsbeschränkten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* die niedrigsten Raten ergaben (siehe Abbildung 15). In einer der wenigen vergleichenden Veröffentlichungen mit *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* wurde ebenfalls von einer sehr ähnlichen initialen Invasivität der beiden Serovare im Hühnerdarm berichtet [628]. Schmidt *et al.* verglichen zudem die Invasivität mehrerer *S. Typhimurium*-Stämme (u.a. auch SL1344) und fanden ähnliche Invasionsraten in der porcinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2 und mukosalen

Explantaten als Brücke zur *in vivo* Situation [629]. Somit ist davon auszugehen, dass die hier gefundenen Invasionsraten zumindest von *S. Typhimurium* SL1344 durchaus charakteristisch für virulente Stämme des *Salmonella* Serovars Typhimurium sind.

Bzgl. *S. Choleraesuis* wies die raue Isoform von SARB4 in der Regel höhere Invasionsraten wie *S. Choleraesuis* A50 auf, die intrazelluläre Persistenz war jedoch vergleichbar bzw. etwas schlechter als bei A50. Diese Beobachtung deckt sich mit einer älteren Arbeit mit rauen und glatten Isoformen von *S. Typhimurium* in HeLa-Zellen [630]. Die generell etwas niedrigere Invasivität von *S. Choleraesuis* gegenüber *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Dublin* könnte zum Teil durch die fehlende Expression von SopE erklärt werden, das im Gegensatz zum stark konservierten SopE2 nur in bestimmten Stämmen phagencodiert vertreten ist und dessen Funktion nicht durch die des SopE2 kompensiert werden kann [631-634]. So führte die Deletion von SopE in *S. Typhimurium* und *S. Dublin* zu einer Invasivitätsminderung in Epithelzellen [635, 636]. Dass die Invasionsunterschiede jedoch nicht allein durch die Expression dieses Virulenzfaktors erklärt werden können, deutet etwa die Anwesenheit von SopE in *S. Gallinarum* an [632], welches hier und in anderen Veröffentlichungen ebenfalls als eines der schwach invasiven Serovare auffiel [483, 637]. Trotz der nachgewiesenen Bedeutung von SopE im *S. Typhimurium*-bedingten Colitis-Modell der Maus [638], bleibt die Relevanz von SopE auch hinsichtlich der Heterogenität im *Salmonella* Serovar Typhimurium *in vivo* unklar [639] und stellt nur eine mögliche Option zur Erklärung der Invasionsunterschiede zumindest für das *Salmonella* Serovar Choleraesuis dar.

Das ebenfalls wirtsadaptierte Serovar *S. Dublin* zeigte im Gegensatz zu *S. Choleraesuis* häufig sehr hohe Invasionsraten, die vergleichbar oder sogar höher als bei den Breitspektrum-Serovaren waren, die intrazelluläre Persistenz stellte sich dann jedoch schlechter als bei *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* dar, so dass auch *S. Dublin* ähnlich *S. Choleraesuis* sich insgesamt im Mittelfeld bewegt. Konsistent mit diesen Ergebnissen zeigten auch Bolton *et al.* trotz fehlender Zentrifugation zur Infektion in humanen Caco-2 Zellen höhere Invasionsraten für virulente *S. Typhimurium*-Stämme gegenüber *S. Choleraesuis* A50 [616]. Der dabei verwendete *S. Dublin*-Stamm 3246 wies ebenfalls Invasionsraten auf, die zwischen denen von *S. Typhimurium* TML und *S. Choleraesuis* A50 lagen. Eine frühere *in vivo* Studie der Gruppe um Bolton ergab in ähnlicher Weise höhere Invasionsraten von *S. Typhimurium* 4/74 im Vergleich zu *S. Choleraesuis* A50 und *S. Dublin* 3246 in einem porcinen und bovinen *ileal-loop* Modell [484]. Diese Ergebnisse seien zudem ähnlich der Invasionsraten einer weiteren Studie mit ilealen Explantaten aus dem Kaninchen [640] und deuten an, dass die Ergebnisse durchaus von biologischer Relevanz sein könnten. Was an dem Experiment von Bolton *et al.*

(1999) jedoch auch klar wurde, war die fehlende Korrelation zwischen Wirtsspezifität und Invasivität [484]. So waren die Invasionsraten trotz unterschiedlicher Wirtsadaptation von *S. Choleraesuis* und *S. Dublin* im Schwein und im Rind ähnlich. Auch Uzzau *et al.* und die hier dargestellten *in vitro* Versuche zeigten kein Indiz für eine Korrelation zwischen Invasivität und Wirtsadaptation, so dass beispielsweise das Schweine-adaptierte Serovar *S. Choleraesuis* keine Auffälligkeiten in Zelllinien aus dem Schwein (3D4/41, IPEC-J2) oder das ovin-adaptierte Serovar *S. Abortusovis* keine Auffälligkeiten bei der Invasivität im Schaf aufwies [485]. Es ist naheliegend, dass in einem so komplexen System wie der Interaktion zwischen diversen verschiedenen Immunzellen und einem Pathogen die Betrachtung der Invasion in einer dieser Zelltypen nicht ausreicht, um den Sachverhalt zu klären. So zeigten auch Versuche von Watson *et al.* mit *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* in porcinen Alveolarmakrophagen, die in dieser Arbeit ebenfalls beschriebene gute Persistenz von *S. Typhimurium* im Gegensatz zur verhältnismäßig schlechten Persistenz von *S. Choleraesuis* [620]. Eine weitere Arbeit verdeutlichte, dass *S. Typhi* in der Lage war, *in vitro* humane sowie murine intestinale Epithelzellen als auch *in vivo* in Mäusen M-Zellen zu invadieren, jedoch im *in vivo* Versuch erst im späteren Verlauf daran scheiterten, die Peyer'schen Plaques zu besiedeln [588, 641]. In ähnlicher Weise waren *S. Abortusovis*, *S. Dublin* und *S. Gallinarum* in der Lage, die bovine Mukosa zu besiedeln; allein *S. Dublin* konnte jedoch aus inneren Organen wie Leber, Milz und hepatischen Lymphknoten reisoliert werden [642]. Zwei Jahre später fanden Chadfield *et al.*, dass diverse Serovare die Fähigkeit besaßen, die Mukosa des Hühnerdarms und die Bursa Fabricii zu kolonisieren, während lediglich *S. Gallinarum* zu einer systemischen Ausbreitung in der Lage war [483]. Da somit auch zahlreiche biologisch relevantere *ileal-loop* Studien eine fehlende Korrelation in einem sehr frühen Stadium der Infektion aufwiesen, scheint die Wirtsspezifität nicht auf der Ebene der Invasion entschieden zu werden. Dafür spricht auch das bevorzugte Eindringen der Salmonellen über M-Zellen am Rande der Peyer'schen Plaques, die selbst aktiv die Bakterien aufnehmen und damit eine aktive Invasion der Salmonellen nicht notwendigerweise erfordern [390, 643]. Folgerichtig fanden Jones *et al.* eine Invasions-defiziente Mutante von *S. Typhimurium* im Epithelgewebe von murinen *ileal-loops* und Vazquez-Torres SPI1-defiziente *S. Typhimurium* in der Milz von Mäusen nach oraler Applikation infolge der Aufnahme durch CD18⁺ Phagozyten [389]. Auch R.A. Murray und C.A. Lee stellten ein Jahr später in ihrer Arbeit mit SPI1-defizienten *S. Typhimurium* fest, dass Invasionsgene offensichtlich nicht für die Invasion des Epithelgewebes und die systemische Ausbreitung zwingend notwendig sind [644], was die Rolle der Invasivität allein hinsichtlich der weiteren

Pathogenese in Frage stellt.

Vielmehr legen auch die oben beschriebenen Veröffentlichungen nahe, dass im Rahmen der systemischen Ausbreitung wirtsadaptierter Serovare und der gefundenen positiven Korrelation zwischen dem systemischen Auftreten und der Adaptation an einen Wirt die Invasivität allenfalls dazu beiträgt, der maßgebliche Unterschied jedoch im Umgang mit dem Wirtsimmunsystem zu suchen ist [485]. Und diesbezüglich sind neben den Invasionsraten auch das Vermögen zur intrazellulären Persistenz, die interzelluläre Ausbreitung sowie das Wirken verschiedener Virulenzfaktoren von Bedeutung.

Einher mit den hohen Invasionsraten geht beispielsweise auch eine vergleichsweise hohe Zytotoxizität der Serovare, die bei den Breitspektrum-Serovaren sowie den wirtsadaptierten Serovar *S. Dublin* am höchsten, bei den übrigen wirtsadaptierten und den wirtsbeschränkten Serovaren am niedrigsten war (siehe Abbildung 17). Bzgl. der wirtsadaptierten Serovare fiel schon in früheren Studien die hohe Zytotoxizität von *S. Dublin* beispielsweise im Vergleich zu *S. Choleraesuis* auf, so dass von einem *S. Typhimurium*-spezifischen Toxin die Rede war, das in ähnlicher Weise auch von *S. Dublin* exprimiert wird [484, 645]. Bislang wurde jedoch ein solches Toxin nicht molekular oder genetisch nachgewiesen.

Nichtsdestotrotz führt diese Eigenschaft hoch invasiver und sich stark vermehrender Serovare dazu, dass es zu einer verhältnismäßig starken Inflammation und zur Destruktion des mukosalen Gewebes kommt, wie es für *S. Dublin* und *S. Typhimurium* in Schafen [485], im Kaninchen [640] und *S. Dublin* im Schwein und im Rind [484] gezeigt wurde. Dahingegen scheinen wirtsadaptierte / wirtsbeschränkte Serovare wie *S. Choleraesuis* und *S. Gallinarum* von ihren niedrigen Invasionsraten und dem langsamen intrazellulären Wachstum zu profitieren. So fanden Uzzau *et al.* in *S. Abortusovis* und *S. Gallinarum* infiziertem ovinen Gewebe [485], Bolton *et al.* in *S. Choleraesuis* infiziertem bovinen und porcinen Gewebe [484] und Pascopella *et al.* in *S. Typhi* infiziertem Gewebe kaum Zeichen einer Gewebezerstörung und Inflammation und weisen damit auf ein „leises“ Fortschreiten der Infektion hin [641]. Dass es *S. Dublin* trotz hoher Invasionsraten *in vitro* (siehe diese Arbeit) als auch *in vivo* [642] und der damit einhergehenden Inflammation gelingt, systemische Infektionen z.B. im Rind hervorzurufen, spricht für einen von den Serovaren *Gallinarum* und *Choleraesuis* abweichenden Mechanismus, der bislang jedoch vollkommen unklar ist und mangels entsprechender boviner Zelllinien in dieser Arbeit auch nicht geklärt werden konnte.

In den meisten Fällen korrelieren die Ergebnisse der *in vitro* Infektionen in dieser Arbeit mit den Wachstumsversuchen in Kultur, bei denen sich hinsichtlich der Generationszeiten folgende Reihenfolge ergab: Breitspektrum-Serovare < wirtsadaptierte Serovare <

wirtsbeschränkte Serovare. Die Generationszeiten sind zwar in Kultur geringer als intrazellulär und auch die Reihenfolge der Serovare ist nicht in jeder Zelllinie den Generationszeiten in Kultur entsprechend gleich, doch dürfte das Vermögen in Kultur langsam oder schnell zu wachsen die intrazelluläre Wachstumscharakteristik stark beeinflussen. So ist es unwahrscheinlich, dass ein wirtsbeschränktes Serovar wie *S. Pullorum*, das in Kultur nur sehr langsam wächst, intrazellulär hohe Raten aufweist. Dahingegen ist es durchaus denkbar, dass in Kultur schnell wachsende Serovare wie *S. Typhimurium* intrazellulär ihr Wachstum drosseln, um sich einem wirtsadaptierten Serovar ähnlich zu verhalten. Dazu bei träge beispielsweise auch die Einleitung apoptotischer Vorgänge, die letztlich zwar nicht das Wachstum der einzelnen Bakterienzelle jedoch der Bakterienpopulation beeinflussen könnten. Welche wichtige Rolle die Wachstumsgeschwindigkeit hinsichtlich der Persistenz von Bakterien spielt, zeigt eines der erfolgreichsten mikrobiellen Beispiele für eine Koexistenz zwischen Wirt und Pathogen: *M. tuberculosis*. Dieses Bakterium weist besonders lange Generationszeiten bzw. langsames Wachstum auf und besitzt Gene, die die Latenz im Wirtsorganismus erst ermöglichen. Eine Deletion dieser Gene führt zu einem unbegrenzten intrazellulären Wachstum in Makrophagen und einer verminderten Virulenz [646]. Ein ähnliches „Überwachsen“ von Makrophagen beobachteten Eriksson *et al.* bei *Salmonella* Mutanten, die in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) beeinträchtigt waren und auch *in vivo* sich als schwach virulent herausstellten [624, 647]. Ein weiterer Punkt, der dafür spricht, dass niedrige Wachstumsraten eine systemische Ausbreitung begünstigen, ist die Beobachtung, dass systemisch persistierende *Salmonella* häufig in sehr geringen Zellzahlen in den beherbergenden Phagozyten vorkommen. So fanden Sheppard *et al.* in 90% der infizierten murinen Phagozyten 4 Tage p.i. < 3 Bakterien / Zelle. Unterschiedliche bakterielle Wachstumsraten gingen dabei nicht mit einer größeren Zahl Bakterien / Zelle sondern mit mehr infizierten Zellen einher, so dass der Quotient gleich blieb [648]. In ähnlicher Weise fanden Monack *et al.* ein Jahr nach der Infektion von Mäusen in den Makrophagen der MLN im Mittel nur 3 - 4 Bakterien / Zelle [649]. Damit scheint eine niedrige intrazelluläre Bakterienzahl für eine systemische Ausbreitung essentiell zu sein. Dies wäre zum einen durch niedrige Invasionsraten oder ein langsames intrazelluläres Wachstum gewährleistet, wie sich im Falle der hier untersuchten wirtsadaptierten und -beschränkten *Salmonella* Serovare Choleraesuis, Gallinarum und Pullorum andeutete. Zum anderen kann aber auch die Interaktion mit der Wirtszelle etwa bei der Induktion apoptotischer, pyroptotischer und nekrotischer Prozesse zur Infektion benachbarter Zellen von Bedeutung sein, wie es möglicherweise bei schnell

wachsenden Breitspektrum-Serovaren wie *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium* der Fall ist, die beispielsweise in adulten Schweinen und Hühnern für ihre lange Persistenz bekannt sind. Auch die systemische Infektion von *S. Dublin* in Rindern würde nach den Ergebnissen dieser Arbeit eher zu dieser Hypothese passen. Welcher Mechanismus jeweils greift, dürfte von Serovar zu Serovar und Wirtsspezies zu Wirtsspezies, möglicherweise auch Zelltyp-spezifisch unterschiedlich sein und letztlich davon abhängen, welche Faktoren in der Wirts-Pathogen Interaktion aus intrazellulärem bakteriellen Wachstum und der Einleitung inflammatorischer sowie pro- und antiapoptotischer Signalwege überwiegen. Auf Grundlage dieser Arbeit soll versucht werden, Anhaltspunkte für die jeweils greifenden Mechanismen zu finden.

V.2. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch *Salmonella*

Da entgegen einiger älterer vergleichender Studien mit *S. Typhi* und *S. Typhimurium* weder die Invasivität noch die intrazelluläre Persistenz *in vitro* sich generell mit der Wirtsspezifität von *Salmonella* korrelieren ließen [650, 651], interessierte nunmehr vor allem die Wirtsimmunantwort auf eine Infektion. So fanden z.B. Bueno *et al.*, dass *S. Typhi* und *S. Enteritidis* in Mäusen zu einer starken T-Zell Aktivierung führten, die ihre Ausbreitung unterband, und zudem nicht in der Lage waren, *in vitro* in murinen DCs, im Falle von *S. Typhi* jedoch in humanen DCs zu persistieren [652]. Zwar unterschieden sich die Breitspektrum-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* in dieser Arbeit zum Teil erheblich, was aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Serovare bzgl. Pathogenese und Wirtsspektrum etwas verwundert, jedoch in der Arbeit nicht näher diskutiert wurde, doch weist sie auch eindeutig auf eine richtungsweisende Funktion des Wirtsimmunsystems insbesondere in Bezug auf die Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei der Wirtsadaptation von *Salmonella* hin. Als zentraler Transkriptionsfaktor für die Regulation einer Immunantwort auf eine Infektion, der ubiquitär sowohl in Epithel- als auch in Makrophagenzellen vorkommt und in allen drei hier verwendeten Wirtsspezies exprimiert wird, bot sich NF- κ B bzw. dessen Aktivierung an [653]. Die Folge einer NF- κ B Aktivierung ist u.a. die Induktion von Zytokin- und Chemokinexpressionen, die als verbindendes Glied zwischen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems fungieren. Zudem nutzen die meisten Pathogen-Erkennungsrezeptoren Signalkaskaden, die über NF- κ B zu einer Genexpressionsregulation führen. Dementsprechend ist NF- κ B hervorragend geeignet, um in vergleichender Weise die Aktivierung des Wirtsimmunsystems in verschiedenen Spezies zu untersuchen. Die Wirkung der NF- κ B – Aktivierung wurde dementsprechend durch die Expression einiger

proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, deren Gene bewiesenermaßen NF- κ B – Bindungsstellen besitzen (siehe <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>), mittels RTqPCR nachgewiesen. Neben NF- κ B ist der Transkriptionsfaktor AP-1 als im Infektionsgeschehen bedeutsam beschrieben worden [654-656], der parallel zur Aktivierung von NF- κ B von diversen TLRs aus über TAK1 und den MAPKinasen p38 und c-Jun-N-terminal kinase (JNK) aktiviert wird und sich ähnlich wie NF- κ B als Homo- oder Heterodimer aus den Proteinen Jun, Fos, *activating transcription factor* (ATF) oder *basic region leucine zipper* (bZIP) zusammensetzt, jedoch Gene reguliert, die über ein *cAMP response element* verfügen [657-659]. Da der AP-1 Weg jedoch lediglich vom NF- κ B Signalweg abzweigt, durch viele aber nicht alle NF- κ B Aktivatoren angesprochen wird und dementsprechend auch keine Aktivierung erwartet wird, die sich substantiell von der des NF- κ B unterscheidet, entschieden wir uns, lediglich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B stellvertretend für eine Immunaktivierung zu beobachten.

So konnte in dieser Arbeit gut nachvollzogen werden, dass die hier als besonders invasiven und gut persistierenden Breitspektrum-Serovare als auch *S. Dublin* ähnlich ihrer intrazellulären Keimzahl zu einer verhältnismäßig starken Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B (siehe IV.5.2) und dem folgend der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40 sowie des Chemokins IL-8 in Zelllinien des Schweins und des Menschen führten (siehe IV.6). Damit widersprechen die Ergebnisse einer Arbeit von Watson *et al.*, die keine Unterschiede in der Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α bei *S. Typhimurium*, *S. Dublin* und *S. Choleraesuis* - infizierten porcinen Alveolar-makrophagen fanden [620]. Möglicherweise war der dabei verwendete Nachweis der Zytokine im Medium nicht sensitiv genug, um signifikante Unterschiede, wie sie sich hinsichtlich der Invasivität und Persistenz andeuteten, nachzuweisen. Auf der anderen Seite lassen sich allein auf Grundlage unterschiedlicher Genexpressionen in dieser Arbeit keine Rückschlüsse auf die Sekretion der Proteine tätigen. Jedoch korrelieren die hier gefundenen Ergebnisse deutlich mit anderen aktuelleren Veröffentlichungen etwa von Paulin *et al.*, die in einem porcinen *ileal-loop* Modell nachwiesen, dass die hohe Invasivität von *S. Typhimurium* 4/74 gegenüber *S. Choleraesuis* A50 insbesondere in einer sehr frühen Phase der Infektion zu einer hohen Expression der Gene für das Chemokin IL-8 und die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-18 führten und wahrscheinlich maßgeblich für eine lokale Begrenzung der Infektion waren [615]. Auch in der polarisierten porcinen Epithelzelllinie IPEC-J2 wiesen Skjolaas *et al.* eine höhere Sekretion des Chemokins IL-8 per ELISA bei *S. Typhimurium* gegenüber *S. Choleraesuis* – infizierten Zellen nach [522]. In einem *in vivo* Ansatz mit

Schafen zeigten Montagne *et al.* zudem deutlich Unterschiede zwischen *S. Dublin* und *S. Abortusovis* infizierten Tieren, in denen *S. Dublin* zu einer deutlich höheren Induktion der Gene für IL-1 β , IL-12 und TNF α im lymphoiden Gewebe als das ovin-adaptierte Serovar *Abortusovis* führte [660].

Dass jedoch die Stärke der NF- κ B Aktivierung nicht generell einfach nur eine Funktion der intrazellulären Keimzahl ist, deuten die Ergebnisse für die überwiegend sehr schwach invasiven und schlecht persistierenden Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* an. Mit Ausnahme der humanen LoVo Epithelzellen führt zumindest *S. Gallinarum* in den meisten Zelllinien zu einer im Verhältnis zur intrazellulären Keimzahl und dem Fehlen von Flagellen als einem der wichtigsten PAMPs überraschend hohen NF- κ B Aktivierung, die der anderer wesentlich besser persistierenden Serovare wie *S. Choleraesuis* oder *S. Dublin* zumindest ähnlich ist. Ob dies mit dem Fehlen NF- κ B - inhibierender Faktoren bei *S. Gallinarum* / *Pullorum* oder der Anwesenheit stärker aktivierender Faktoren wie etwa eine veränderte LPS-Struktur zu erklären ist, konnte hier nicht geklärt werden, wäre jedoch eine interessante Aufgabe zukünftiger Arbeiten.

Vergleicht man nun die drei Wirtsspezies miteinander, so fällt auf, dass es auf der Ebene der NF- κ B Aktivierung zum einen kaum Unterschiede zwischen den Zelltypen gab, so dass man ähnliche NF- κ B Aktivierungsmuster bei den Makrophagen wie bei den Epithelzellen fand. Darüberhinaus war das Muster auch zwischen humanen und porcinen Zelllinien sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass die Aktivierung bei *S. Dublin* infizierten humanen Zellen in Verhältnis zu den anderen Serovaren höher war als bei *S. Dublin* infizierten porcinen Zellen. Jedoch lässt sich auch dieser Unterschied durch eine verminderte Invasivität von *S. Dublin* in porcinen Zellen gegenüber humanen Zellen erklären. Demnach ist für die Aktivierung von NF- κ B in den meisten Fällen aber nicht ausschließlich die Invasivität und Persistenz der Serovare maßgebend, die, wie oben diskutiert, nicht mit der tatsächlichen Wirtsspezifität der Serovare korrelieren, jedoch Anhaltspunkte für die durch bestimmte Serovare initiierten Krankheitsverläufe liefern. Nichtsdestotrotz gibt es einige feine Unterschiede, die erst im genauen Vergleich der Ergebnisse auffallen. So reagieren beispielsweise humane Epithelzellen wesentlich empfindlicher und differenzierter auf eine Infektion als porcine Zellen oder Makrophagen insgesamt. Dieser Punkt soll in Abschnitt V.3 näher erörtert werden. Zudem unterscheidet sich auch die Aktivierbarkeit der Hühnermakrophagen HD-11 durch die verschiedenen Serovare gravierend von denen der porcinen und humanen Zelllinien. Diese Beobachtung soll nun im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

V.2.1. Die Rolle bakteriellen Flagellins in der Pathogenerkennung

Flagellin ist der wichtigste Bestandteil bakterieller Flagellen, deren filamentöse Struktur aus rund 20.000 helikal angeordneten Untereinheiten in Form eines Hohlzylinders besteht und damit u.a. entscheidend für die bakterielle Motilität ist [661]. Neben der Mobilität nutzt *Salmonella* auch effektorische Funktionen des Flagellins. So wurde zum einen gezeigt, dass *Salmonella* im Gegensatz zu Kommensalen Flagellin SPI2-abhängig durch Transzytose in Vesikeln von der apikalen Epithelseite aus auf die basolaterale Seite im Darm transportieren lässt [284, 286]. In monomerer Form wird es danach durch TLR5 auf Immunzellen erkannt und induziert eine Signalkaskade, die über NF- κ B und MAPK zur Expression proinflammatorischer Zytokine und zu einer Inflammation führt, die häufig eine Gewebszerstörung bewirkt und somit eine Diarrhoe einleitet [662, 663]. Damit wird *Salmonella* neben der Bereitstellung von Nährstoffen auch die Ausbreitung auf neue Wirte ermöglicht. *Salmonella* sekretiert jedoch Flagellin auch gezielt als Effektor SPI-1 T3SS – abhängig in das Wirtszell-zytosol, wo es durch NLRs wie Ipaf / NLRC4 und Birc1e / NAIP5 erkannt wird und zur Induktion eines Inflammasoms führt, das u.a. zur Aktivierung der Caspase-1 und Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-18 beiträgt [281-283, 664]. Die Folge ist die Pyroptose der Wirtszelle, wie es für Makrophagen gezeigt wurde [283]. In der intestinalen Mukosa wurde TLR5 basolateral auf Enterozyten sowie auf CD11c⁺ DCs nachgewiesen, die häufig in einer sehr frühen Infektionsphase mit Salmonellen assoziiert gefunden worden [284, 665, 666] und ist somit für eine frühe Erkennung einer Infektion und Limitierung dieser wichtig [343]. Damit könnte die Flagellin-Erkennung einen wichtigen Mechanismus zur Unterbindung der Ausbreitung von *Salmonella* im Gewebe darstellen und desweiteren richtungsweisend für den Krankheitsverlauf sein. Trotz der prinzipiell als sehr wichtig beschriebenen Funktion der Flagellin-Erkennung im Infektionsgeschehen von *Salmonella* [285, 343] als auch in der Abwehr von *Legionella* [667] bleibt die Bedeutung z.B. für humane Salmonellen-Infektionen bislang unklar. So konnte entgegen einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *L. pneumophila* bei bestimmten Polymorphismen im TLR5 Gen des Menschen eine ähnliche erhöhte Suszeptibilität gegenüber *S. Typhi* – Infektionen nicht gefunden werden [667, 668]. Zudem korreliert im Menschen wie auch in vielen anderen Säugern die Expression der Flagellingene nicht mit einer bestimmten Pathogenität der Serovare. Anders ist es im Huhn, wo die Geflügel-adaptierten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* kein funktionelles Flagellin exprimieren und damit unmotil bleiben, jedoch im Gegensatz zu den Breitspektrum-Serovaren *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis* zu schweren systemischen Erkrankungen auch im adulten Huhn führen.

Betrachtet man die Resonanz auf eine Flagellin-Behandlung durch die Zelllinien verschiedener Wirtsspezies in dieser Arbeit, so stellen sich zum Teil gravierende Unterschiede dar. Einzig die humanen Zelllinien LoVo, Caco-2 und THP-1 reagierten auf monomeres Flagellin mit einer deutlich erhöhten NF- κ B Aktivierung. Dementsprechend zeigte sich, dass eine Deletion der Gene zumindest in den humanen Epithelzelllinien zu einer drastischen Reduktion der NF- κ B Aktivierung führte, wohingegen die Hühnermakrophagen HD-11 entgegengesetzt mit einer erhöhten NF- κ B Aktivierung reagierten. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf die Versuche mit den *Salmonella* Serovaren beziehen, so dass *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* in humanen Epithelzellen kaum zu einer Aktivierung von NF- κ B führten, wohingegen diese bei HD-11 Zellen nach einer *S. Gallinarum* / *S. Pullorum* in Anbetracht der geringen intrazellulären Bakterienzahls höher als bei den Breitspektrum-Serovaren und *S. Dublin* war. Die porcinen Zelllinien reagierten weder auf monomeres Flagellin noch auf eine entsprechende Deletion der Gene in *Salmonella*, ähnelten in ihrer Resonanz auf die verschiedenen Serovare jedoch eher den humanen Zellen, insbesondere den humanen Makrophagen. Damit wird deutlich, dass die Zellen verschiedener Wirtsspezies sehr unterschiedlich auf Flagellin reagieren und vor allem die Reaktion der HD-11 Zellen mit Hinsicht auf die herausragende Rolle der nicht-motilen *Salmonella* Serovare *Gallinarum* und *Pullorum* im Huhn von Interesse ist.

V.2.2. Die Reaktion der Hühnermakrophagen HD-11

Betrachtet man die Genexpressionsuntersuchungen der Hühnermakrophagen HD-11, so stellt man fest, dass die Δ *fliD*-Mutante eine ähnlich erhöhte Genexpression proinflammatorischer Zytokine zeigt wie die Δ *fliC* Δ *fliB*-Mutante (siehe Abbildung 32). Da jedoch bei einer *fliD*-Deletion weiterhin Flagellin gebildet und normal sekretiert wird, kann diese Erhöhung nicht am Flagellin selbst liegen, sondern viel eher mit der deutlich verminderten Invasivität zusammenhängen, die beide Deletionsmutanten als auch die nicht-motilen Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* gleichsam betrifft. Bleibt zu klären, warum diese Serovare und Mutanten dann zu einer erhöhten und nicht zu einer erwartungsgemäß niedrigeren Aktivierung der Makrophagen im Gegensatz zum Wildtyp *S. Typhimurium* führten. Wie in Abbildung 20 dargestellt, wirkt sich eine erhöhte intrazelluläre Bakterienzahl wie bei *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* und *S. Dublin* neben der NF- κ B Aktivierung auch auf das Absterben der Wirtszellen aus. Insbesondere in diesem Punkt stellten sich die Hühnermakrophagen HD-11 als besonders sensibel im Vergleich zu den anderen Zelllinien heraus (siehe Abbildung 17). Eine geringere Zahl von Wirtszellen bei einer Infektion mit dem Wildtyp

gegenüber den Flagellinmutanten oder mit den *Salmonella* Serovaren Typhimurium, Enteritidis und Dublin gegenüber *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* würde sich in den NF- κ B Assays durch deutlich niedrigere Signale bei den Wildtyp-, *S. Typhimurium*-, *S. Enteritidis*- oder *S. Dublin* - infizierten Zellen bemerkbar machen, wie sich auch zeigte (siehe Abbildung 30). Da jedoch die Signale der RTqPCR auf das *housekeeping*-Gen β -Actin und damit auf die eukaryotische Zellzahl normalisiert wurden, dürften unterschiedliche Wirtszellzahlen sich in diesen Versuchen nicht bemerkbar machen. In der Literatur ist jedoch beschrieben, dass eine starke Aktivierung von Caspasen etwa in apoptotischen Zellen zu einer Inhibition von NF- κ B führt [669-671]. Wie wir in den Zytotoxizitätsversuchen gesehen haben, scheint genau dies bei den Breitspektrum-Serovaren und *S. Dublin* der Fall zu sein. Neben der Einleitung apoptotischer Vorgänge durch Überlastung der Wirtszelle wurde für *Salmonella* auch eine Caspase-1 abhängige Pyroptose-Induktion in Makrophagen durch den Effektor SipB oder durch intrazelluläre Flagellin-Bindung an Ipaf beschrieben (s.o.) [451]. Zudem vermitteln Lipopeptide über TLR2 und LPS über TLR4 eine proapoptotische Wirkung [672, 673]. Dementsprechend beschrieben Maelfait *et al.* eine durch TLR3 und TLR4, Aliprantis *et al.* eine durch TLR2 induzierte Aktivierung der Initiator-Caspase 8 [672, 674].

Auf der anderen Seite führen alle diese TLR-abhängigen Signalwege auch zu einer Aktivierung von NF- κ B und damit zur Expression einiger anti-apoptotisch wirkender Gene wie cIAP-1, -2 und A20 [675-677]. So zeigten Zeng *et al.* neben der proapoptotischen Wirkung von Flagellin über TLR5 auch, dass eine Präinkubation mit Flagellin vor einer Infektion mit *S. Typhimurium* die Zellen vor einer Apoptose schützt [678]. Letztlich entscheidet das Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Faktoren über die Aktivierung von Caspasen und die Einleitung der Apoptose oder Pyroptose. *Salmonella* kann über verschiedene Mechanismen in dieses Gleichgewicht eingreifen. So wurde etwa für den Effektor AvrA neben der Inhibition des NF- κ B Signalweges vor allem eine Inhibition des AP-1 / JNK Signalweges und eine daraus resultierende Stabilisierung der epithelialen Integrität und Minderung der phagozytären Apoptose gefunden [347, 679-681]. Auf der anderen Seite inhibiert der PhoP-abhängige SPI2-kodierte Effektor SseL ausschließlich den NF- κ B Weg und verringert damit die Expression proinflammatorischer Zytokine, induziert jedoch im Gegensatz zu AvrA die Apoptose von Makrophagen [349, 682]. Eine ähnliche NF- κ B inhibitorische Wirkung entfaltet auch der Effektor SspH1 durch Bindung der Serin / Threonin-Kinase PKN1 [683, 684]. Wie fein die Expression und Wirkung dieser und anderer Effektoren reguliert ist, zeigte eine Arbeit von Streckel *et al.* [634]. Danach besitzen die hier untersuchten Serovare *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin* und *S. Gallinarum* im

Gegensatz zu *S. Choleraesuis* das *avrA* Gen, die Expression ist jedoch in Abhängigkeit der gewählten Kulturbedingungen und des verwendeten Stammes sehr unterschiedlich. Dass sowohl *S. Dublin* als auch *S. Gallinarum*, die sich hier deutlich hinsichtlich der NF- κ B Aktivierung und Zytotoxizität unterscheiden, über *avrA* verfügen, zeigt, dass das Vorhandensein einzelner Virulenzgene allein nichts über den Phänotyp aussagt. Die exakte Regulation und zeitliche Abfolge dieser Effektoren entscheidet letztlich mit darüber, ob *Salmonella* den programmierten Zelltod oder das Überleben der Wirtszelle beeinträchtigt.

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse liegt der Schluss nahe, dass entweder die Schwelle zur Überlastung der HD-11 Zellen im Gegensatz zu anderen Zelllinien niedriger ist oder ein Caspase-induzierender und NF- κ B inhibierender Weg in HD-11 Zellen stärker ausgeprägt ist, als die anti-apoptotische Funktion der NF- κ B Aktivierung selbst. Eine starke Infektion und hohe intrazelluläre Belastung durch hoch invasive Serovare wie *S. Typhimurium*, *S.*

Enteritidis oder *S. Dublin* führt damit nicht nur zu einem starken Zellsterben, sondern in dessen Vorlauf auch zu einer starken Aktivierung von Caspasen, die eine NF- κ B inhibitorische Wirkung entfalten können. Somit ergäbe sich eine scheinbar niedrige NF- κ B Aktivierung und Expression proinflammatorischer Zytokine bei hoch invasiven Serovaren gegenüber schwach invasiven sowie beim *S. Typhimurium* Wildtyp gegenüber der schwach invasiven Flagellinmutanten, die jedoch allein auf der unterschiedlichen intrazellulären Bakterienzellzahl beruht. Der Versuch, diese Zellzahl durch Erhöhung der MOI auszugleichen, führte jedoch aufgrund der starken Aktivierbarkeit der HD-11 Zellen durch LPS (siehe Abbildung 25) zu einer weiteren Erhöhung der NF- κ B Aktivierung, die jedoch überwiegend auf die Erhöhung der LPS-Konzentration zurückzuführen ist und jede Inhibition der NF- κ B Aktivierung verschleiert. *Salmonella* Δ *fliC* Δ *fljB*-Mutanten ohne LPS oder mit verkürzten LPS-Ketten könnten diesbezüglich hilfreich sein und werden zurzeit etabliert.

Nach der oben beschriebenen Hypothese sollte eine Anpassung der MOI an unterschiedliche Invasionsraten dann zu einer ähnlich hohen NF- κ B Aktivierung wie der Wildtyp *S.*

Typhimurium führen.

Ob dies sich so bewahrheitet und ob Nebenwirkungen der LPS-Modifikation wie eine stärkere NF- κ B Aktivierung und Avirulenz rauer Isoformen Einfluss nehmen [685, 686], wird in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Zu diesem Zeitpunkt steht allein die Hypothese, dass die Aktivierung der HD-11 Zellen unabhängig von Flagellin selbst ist, jedoch maßgeblich von der intrazellulären Keimzahl und der Einleitung apoptotischer Prozesse abhängt. Ob es sich bei dem hier beobachteten Phänomen um eine HD-11 – Zelllinien- oder Wirtsspezies-spezifische Reaktion handelt und ob es zudem auch *in vivo* relevant ist, lässt

sich nur durch zusätzliche Hühnerzelllinien und dazu passende *in vivo* Versuche herausfinden. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um B. Kaspers in München mit primären Hühnermakrophagen ergaben zumindest ebenfalls ein frühes Absterben der Zellen bereits bei einer MOI um 5.

Vorrausgesetzt, Hühnermakrophagen reagierten sensibler auf hohe Bakterienzellzahlen, so ergäbe sich ein Vorteil für schwach invasive und langsam wachsende Serovare, die für eine mögliche systemische Ausbreitung die Makrophagen für einen längeren Zeitraum nutzen könnten. Der hier beobachtete Phänotyp wäre also weniger von Flagellin als vielmehr von anderen bakteriellen Charakteristika wie Invasivität und Wachstumsgeschwindigkeit abhängig, die sich ja bei *S. Pullorum* und *S. Gallinarum* als sehr niedrig erwiesen und diesen Serovaren damit eine systemische Infektion im Huhn ermöglichten. So fanden Iqbal *et al.* eine stärkere systemische Ausbreitung einer nicht-motilen *fliM*-Mutante im Huhn mit einer deutlich verzögerten IL-1 β Induktion. Eine *in vitro* Behandlung von Chicken Kidney Cells (CKC) mit Flagellin führte zu einer erhöhten IL-1 β , nicht jedoch IL-6 Expression [687]. Entsprechend der hier gezeigten Ergebnisse reagierten HD-11 Makrophagen auch in dieser Arbeit nur geringfügig auf monomeres Flagellin. Entscheidend scheint möglicherweise in diesem Zusammenhang der jeweilige Zelltyp zu sein, so dass aflagelläre Stämme primär bei Kontakt mit Enterozyten und DCs eine verminderte Proinflammation aufweisen, wie es für *S. Gallinarum* *in vitro* auch schon gezeigt wurde [688]. Die hier nachgewiesene verminderte Zytotoxizität in Hühnermakrophagen ermöglicht ihnen nach dieser „leisen“ Invasion des Gewebes dann auch eine ungestörte Migration in systemische Regionen. In ähnlicher Weise wurde für *S. Typhi* gezeigt, dass das Fehlen von *spvB*, einem Toxin zur Depolymerisation des Actin-Zytoskeletts der Wirtszelle, zu einer geringeren Zytotoxizität in Makrophagen führt, die ihm eine systemische Ausbreitung erleichtert [651, 689]. Aufgrund des Mangels aviärer Zelllinien war es uns leider nicht möglich, die Ergebnisse sowie das Modell mit anderen Hühnerzelllinien zu überprüfen.

V.2.3. Die Reaktion der porcinen Zelllinien

Die humanen Zelllinien reagierten unabhängig vom Zelltyp deutlich auf diverse PAMPs (siehe Abbildung 26). Zudem diskriminierten die humanen Epithelzelllinien Caco-2 und LoVo dementsprechend zwischen flagellären und aflagellären Stämmen (Serovaren und Mutanten), so dass übertragen auf die Situation *in vivo* lediglich die flagellären und hoch invasiven Serovare und Stämme eine starke Inflammation im Epithelgewebe und die darauffolgende Diarrhoe hervorrufen würden.

Im Gegensatz dazu reagierten sowohl die porcinen Makrophagen 3D4/31 und PLN/C2 als auch die Epithelzellen IPEC-J2 auf viele wichtige PAMPs wie Flagellin, LPS und M-Tri-DAP kaum oder gar nicht, obwohl etwa die Expression von TLR4 und TLR5 für IPEC-J2 Zellen nachgewiesen wurden [524, 525]. Eine ähnliche Beobachtung machten Tallant *et al.*, die trotz des Nachweises von TLR5 bei einigen humanen Zelllinien wie HeLa kaum oder keine Reaktion auf monomeres Flagellin fanden und einen bislang unbekanntem Cofaktor dahinter vermuten [562]. Konsistent mit dieser Beobachtung berichteten auch Skjolaas *et al.* von einer mangelnden Resonanz der IPEC-J2 Zelllinie auf LPS [522], wohingegen eine andere Gruppe mit einer deutlich höheren LPS-Konzentration zwar eine Expressionsänderung der Zytokine und Chemokine TNF α , IL-8 und MCP-1 beobachtete [523], die jedoch im Vergleich zu den hier gefundenen Genexpressionsänderungen bei einer Salmonelleninfektion anderer Wirtsspezies äußerst gering ausfiel. Das proinflammatorische IL-1 β war auch in dieser Arbeit unbeeinflusst und auch die ileale Zelllinie IPI-2I ergab nur geringfügige Expressionsänderungen.

Neben der mangelnden Resonanz porciner Zellen auf verschiedene PAMPs zeigte sich hier, dass die Invasionsraten insgesamt in porcinen Epithelzellen sehr niedrig waren (siehe Abbildung 14). Auffällig war in diesem Zusammenhang außerdem der fehlende Invasionsunterschied zwischen motilem *S. Typhimurium*-Wildtyp und der aflagellären Δ *fliC* Δ *fljB*-Mutante (siehe Abbildung 27). Üblicherweise wird in der Literatur stets eine Reduktion der Invasionsgeschwindigkeit infolge mangelnder Motilität bei aflagellären Stämmen gegenüber beigeißelten Stämmen berichtet [555, 690]. Dies entspricht auch den hier beobachteten Unterschieden bei der Infektion humaner und aviärer Zelllinien, schließt jedoch zusätzlich zu den in der Literatur beschriebenen Epithelzellen auch die Makrophagen ein. Aufgrund des initialen Zentrifugationsschrittes bei jedem Infektionsversuch sollten Unterschiede in der Motilität eigentlich nicht durch unterschiedliche Invasionsraten auftreten, es sei denn, die Flagellen oder das Flagellin wirken neben der beschriebenen Motilität auch in irgendeiner Form adhäsiv oder auf den Invasionsprozess. Eine Flagellen-vermittelte Adhäsion würde auch eine höhere Phagozytoserate bei phagozytierenden Zellen wie Makrophagen erklären, bei denen die Invasivität der Salmonellen durch die Phagozytoseaktivität der Wirtszelle relativiert wird. Neben Newell *et al.*, die schon 1985 in ihrer Studie ein vermittelndes Adhäsin bei der Flagellin- aber nicht Motilitäts-abhängigen Adhäsion von *C. jejuni* an humane Epithelzellen [691] vermuteten, weisen auch andere Studien in verschiedenen bakteriellen Spezies auf eine adhäsive Funktion der Flagellen hin [692-695]. Möglich wären etwa eine direkte Interaktion z.B. mit dem TLR5 oder anderen Oberflächenproteinen auf der Wirtszelle, als auch indirekte

Interaktionen über andere bakterielle Adhäsine. Eine solche Adhäsions-vermittelnde Funktion wurde kürzlich etwa bei enterotoxischen *E. coli* (ETEC) für das sekretierte Adhäsin EtpA beschrieben, welches über eine Flagellin-Bindung die Adhäsion und Kolonisation des Darms begünstigt [696]. EtpA wird über ein *two-partner secretion* (TPS) System sekretiert, welches u.a. auch in *Neisseria* für seine Adhäsions-vermittelnde Funktion zu Epithelzellen beschrieben wurde [697]. Für *Salmonella* gibt es bislang jedoch keine Veröffentlichung zu einem TPS System; allerdings wurden Ähnlichkeiten zwischen dem TPS System und dem *Salmonella* - spezifischen Sekretionssystem ZirTS beschrieben [698]. Ein dem EtpA analoges oder homologes Protein ist in *Salmonella* bislang jedoch nicht nachgewiesen.

Neben einer Adhäsions-vermittelnden Funktion bestünde auch die Möglichkeit, dass es durch die Erkennung des Flagellins beispielsweise vom TLR5 ausgehend über den NF- κ B - oder MAPK - Weg zu einer Aktivierung bestimmter Wirtsfaktoren kommt, oder dass direkt über die Flagellen Effektoren in die Wirtszelle sekretiert werden, die die Invasion für *Salmonella* erleichtern. Für den letzten Punkt sprechen Arbeiten von Konkel *et al.*, die für einen engen Verwandten von *Salmonella*, *Campylobacter*, die Sekretion von *Campylobacter invasion antigens* (CIA) über das flagelläre T3SS beschrieben, deren Funktion entscheidend für die Invasion von *Campylobacter* ist [699]. Ähnliches wurde zuvor auch bei *Yersinia* beobachtet [700]. Zwar wurde die Sekretion ähnlicher Proteine für *Salmonella* bislang noch nicht veröffentlicht, doch gibt es Anhaltspunkte für die Relevanz von Flagellen hinsichtlich der Funktionalität *Salmonella* spezifischer Effektoren. So fanden Huang *et al.* heraus, dass für die Funktion des Effektors SopE2 ein funktionierendes flagelläres System existieren bzw. zumindest die Expression der Flagellingene *fliC* und *fljB* funktionieren muss [701]. Dass Effektoren wie SopE/E2 in *Salmonella* prinzipiell auch über das flagelläre Sekretionssystem transloziert werden können, zeigte eine Arbeit von Lee *et al.* [398]. Demnach entscheidet die Funktion bestimmter Chaperone über die Nutzung des SPI1-T3SS oder flagellären Sekretionssystems. Da SopE/E2 auch beim Actinrearrangement im Invasionsprozess mitwirken [400], könnten flagelläre Stämme demnach besser als aflagelläre Stämme SopE/E2 transduzieren, welches wiederum durch ein effektiveres Actinrearrangement für höhere Invasionsraten sorgen würde. Damit wäre neben der Motilität eine direkte Funktion von Flagellin im Invasionsprozess nachgewiesen. Die hier gefundenen Ergebnisse deuten auf einen der oben beschreibenden Mechanismen hin. Überraschend und bislang ebenfalls nicht beschrieben ist zudem, dass dieser Mechanismus scheinbar nicht bei porcinen Zelllinien funktioniert. Gründe für diesen möglicherweise Spezies-spezifischen Unterschied lägen nach dem zuvor beschriebenen Modellen auf der fehlenden Komponente auf Seiten der porcinen

Wirtszelle und trügen *in vitro* als auch *in vivo* dazu bei, die Invasion von *Salmonella* in porcinen Zellen zu mindern.

Im Gegensatz zu den niedrigen Invasionsraten in porcinen Epithelzellen persistierten die Salmonellen unabhängig vom Serovar deutlich besser in porcinen Zellen als in allen anderen betrachteten Zelllinien (siehe Abbildung 14). Damit einhergehend stellten sich die porcinen Zelllinien als äußerst robust dar, so dass selbst hohe MOIs von 50 kaum zu einem Absterben der Zellen führte. *In vivo* hätte ein solches Absterben in Form von Pyroptose oder Nekrose eine starke Inflammation zu Folge, die zu einer Begrenzung der Infektion führen würde. Sollte die Robustheit der porcinen Zelllinien auch für die *in vivo* Situation charakteristisch sein, so würde diese üblicherweise beobachtete Inflammation ausbleiben und selbst den Breitspektrum-Serovaren ermöglichen, in den Tieren zu persistieren. Die hier beschriebenen niedrigen Invasionsraten in den Epithelzellen und eine fehlende Resonanz auf verschiedene sonst stark proinflammatorisch wirkende PAMPs unterstützen dieses Modell. Diese Beobachtungen korrelieren mit einer aktuellen Veröffentlichung von Rostagno *et al.*, die bei einer *S. Typhimurium*-Infektion im schlachtreifen Schwein zwar eine über mehrere Wochen bis zur Schlachtung anhaltende Infektion und Ausscheidung der Salmonellen fanden, jedoch keine klinischen Symptome wahrnahmen [702]. Neben pathologischen Veränderungen ist für eine krankheitsbedingte Verhaltensänderung die Expression von Zytokinen entscheidend [703]. Während die Infektion die Expression von TNF α u.a. im Caecum erst nach mehreren Tagen beeinflusste, fand man keine Wirkung auf die Expression des wichtigen proinflammatorischen Zytokins IL-1 β [702]. Damit korrelieren die hier gefundenen Ergebnisse mit der besonders für den Menschen problematischen Rolle des Schweins als Träger von *Salmonella*, dessen klinisch inapparente Infektion oft nicht auffällt und deren serologischer Nachweis schwierig ist [704], so dass nach der Schlachtung eine Lebensmittel-bedingte Infektion droht [90, 705]. So fanden etwa Perron *et al.* in den MLN von geschlachteten, unauffälligen Tieren aus kanadischen Schweineställen in etwa 6% der Fälle Salmonellen [705], die EFSA beschrieb in ihrem Report von 2010 bis zu 8,2% positive Fälle anhand der Lymphknoten geschlachteter Tiere in den europäischen Mitgliedstaaten [572], während Kishima *et al.* in Japan aus Kot von rund 3% der Schweine verschiedenen Alters Salmonellen isolierten [706]. Dass dieser Anteil infizierter Tiere während der Schlachtung zu einer Kontamination weiterer geschlachteter Tiere und damit zu einer starken Erhöhung des Risikos für humane Infektionen führen kann, zeigten Bottledoorn *et al.* [707].

Somit ergaben die Resultate dieser Arbeit Hinweise auf die Ursache der häufig asymptomatisch verlaufenden *Salmonella*-Infektionen beim ausgewachsenen Schwein [90, 92]. Zwar

gibt es einige Veröffentlichungen, die *in vivo* inflammatorische Vorgänge sowohl bei einer Infektion mit *S. Typhimurium* als auch mit *S. Choleraesuis* nachwiesen [615, 708-711], doch beziehen diese sich meist auf Jungtiere, deren Immunstatus sich deutlich von dem adulter Tiere unterscheidet [712, 713] und bei denen eine *S. Typhimurium*-Infektion auch häufig zu enteritischen Erkrankungen führt [90]. Darüberhinaus wurde auch *in vitro* von Genexpressionsänderungen proinflammatorischer Zytokine und Chemokine berichtet [523], doch wurde bislang nie ein Vergleich zwischen porcinen und z.B. humanen Zellen angestellt. *In vivo* ist ein solcher Vergleich der Genexpression bestimmter Gewebe sicherlich schwierig und bzgl. humanen Gewebes unmöglich. Erst die Nutzung von Zelllinien ermöglicht einen entsprechenden Ansatz, wie er in dieser Arbeit genutzt wurde. Betrachtet man die Reaktionen der porcinen Zellen für sich, so findet man auch hier eine erhöhte NF- κ B Aktivierung und erhöhte Zytotoxizität bei einer Salmonelleninfektion. Erst der Vergleich mit den Zelllinien anderer Wirtsspezies ermöglicht eine Gewichtung dieser Resultate mit einer abweichenden Schlussfolgerung.

V.3. Die Rolle von Makrophagen und Epithelzellen bezüglich der Wirtsadaptation von *Salmonella*

Während einer Infektion des Darms stellt die Epithelzellschicht die erste zelluläre Barriere für *Salmonella* dar und kommt dementsprechend sehr früh im Infektionsgeschehen mit ihnen in Kontakt. Sie bildet die Grenzschicht zwischen einem Antigen-reichen Darmlumen und der Lamina Propria, die reich an Immunzellen ist. Dementsprechend übernehmen die Epithelzellen wichtige Funktionen in der Regulation der mukosalen Immunreaktion, müssen auf der einen Seite eine unnötige Inflammation aufgrund des ständigen Kontakts mit Kommensalen vermeiden, auf der anderen Seite eine lebensnotwendige Inflammation bei Kontakt mit Pathogenen einleiten. So besitzen sie die Fähigkeit, als nicht-professionelle Antigen-präsentierende Zellen über klassische und nicht-klassische MHC Moleküle Antigene an Zellen des adaptiven Immunsystems wie T-Lymphozyten zu präsentieren, bakterielle Muster über *pathogen-recognition receptors* (PRR) wie TLRs und NLRs zu erkennen und daraufhin Zytokine und Chemokine zu sekretieren, die die Aktivität anderer Immunzellen beeinflussen und die Migration dieser Zellen koordinieren [714, 715]. So werden etwa die Zytokine TGF- α , IL-1, IL-10, IL-15 und IL-18 konstitutiv exprimiert, um eine basal Aktivierung des Immunsystems zu gewährleisten, wohingegen andere Zytokine wie IL-1 α/β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, CCL20 und GM-CSF etwa während einer Infektion induziert werden [219, 714]. Epithelzellen können jedoch nicht nur Signale aussenden, sondern sind auch in der Lage

verschiedene Stimuli wie Zytokine über entsprechende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu verarbeiten [716] und diese ggfs. zu verstärken, wie es etwa im Fall des Zytokins IL-1 gezeigt wurde [717]. Als Quelle dieser Signale kommen u.a. Monozyten / Makrophagen in Frage. Hierbei ist jedoch zwischen ansässigen Gewebsmakrophagen und einwandernden Blutmakrophagen / Monozyten zu unterscheiden. Während Gewebsmakrophagen eine wichtige Rolle in der Homöostase spielen, viele kostimulatorischen Moleküle und Rezeptoren für Zytokine und Chemokine jedoch nicht exprimieren und damit weder auf Chemokine noch auf eine Infektion durch Anpassung der Zytokinexpression reagieren [245, 248, 718], besitzen Blutmakrophagen diese Fähigkeiten und sind für die Einleitung einer Inflammation essentiell [243, 247, 719]. Im Gegensatz zu DCs, die ebenfalls als Wirtszellen für einen Transport der Salmonellen in systemische Regionen in Frage kommen, sind eingewanderte Monozyten aus dem Blut neben Epithelzellen die dominanten Produzenten antimikrobieller Moleküle und inflammatorischer Mediatoren zur Kontrolle einer Salmonelleninfektion [720]. Damit wird ihnen eine führende Rolle im inflammatorischen Prozess als auch in der Ausweitung der Infektion zu einer systemischen Erkrankung zugeschrieben, die möglicherweise auch bei der Adaptation von *Salmonella* an bestimmte Wirtsspezies von Bedeutung sein könnte. So lag der Fokus dieser Arbeit vor allem auf der genomweiten Genexpressionsanalyse humaner Blutmakrophagen nach einer Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren. Als Methode der Wahl wurde eine Microarray-Analyse auf Grundlage des Systems der Firma Agilent Technologies durchgeführt, die sich in der Arbeit unserer Kooperationspartner um B. Kaspers in München für primäre Blutmakrophagen aus dem Huhn bereits bewährte [563], äußerst reproduzierbare Ergebnisse liefert und zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus beiden Studien dementsprechend unabdingbar war.

Als Folge der Infektion fanden wir vor allem die Regulation von inflammatorischen Vorgängen zu denen Gene TLR-abhängiger Signalkaskaden wie dem MAPK - Weg und dem NF- κ B - Signalweg gehörten, aber auch Gene zählten, die in apoptotischen Vorgängen eine Rolle spielen (siehe Tabelle 12). Stark reguliert waren insbesondere auch davon abhängige Zytokin- und Chemokingene [721]. Auffällig war die deutliche Polarisierung der Immunreaktion hin zu einer Th1-Antwort mit einer starken Induktion der Genexpression von IL-1 α/β , IL-6 und Mitgliedern der IL-12 Familie (IL-12p40, IL-23, IL-27/30). IL-23 ist ein Heterodimer aus einer p19-Untereinheit und IL-12p40, das über den JAK-STAT - Signalweg, der ebenfalls als stark reguliert auffiel, zur Produktion von IFN γ durch Th1- und NK-Zellen führt, aber auch in autokriner Weise auf die Makrophagen selbst wirkt [722-724]. IFN γ , IL-12p40 und IL-23 sowie die entsprechenden Rezeptoren wurden als essentiell zur Abwehr von *Salmonella* oder

Mycobacteria Infektionen überwiegend in der Maus aber auch im Menschen beschrieben [354, 355, 725]. Ihre Relevanz im Menschen beweisen auch Arbeiten zu genetischen Defekten im IL-12/IL-23 – Signalweg, die mit einer deutlich höheren Suszeptibilität gegenüber *Salmonella* und *Mycobacteria* Infektionen und schweren Krankheitsverläufen einhergehen [726]. Somit wird über die Th1-Antwort eher eine zelluläre als eine humorale Immunreaktion eingeleitet, für die Th2-assoziierte Zytokine notwendig wären. Zusätzlich zu diesen proinflammatorischen Zytokinen wurden auch hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und M-CSF (CSF2 bzw. CSF3) stark hochreguliert, die u.a. für die Differenzierung und Reifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen notwendig sind. So fanden Coon *et al.* in GM-CSF - Knockout Mäusen eine deutlich verzögerte Inflammation und Gewebszerstörung sowie verlängerte Persistenz der infizierenden Salmonellen im Gewebe, so dass zumindest für GM-CSF eine bedeutende Rolle in der Salmonellenabwehr beschrieben wurde [570].

Als dritte wichtige Gruppe wurden auch Chemokine stark hochreguliert, allen voran die CC-Chemokine CCL1, CCL5/RANTES, CCL20/MIP-3 α und die CXC-Chemokine CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC, während CXCL8/IL-8 nur mäßig induziert wurde. Während CC-Chemokine, wie die zuvor als hochreguliert beschriebenen, vorwiegend eine Rolle in der Anziehung von Lymphozyten, Monozyten und DCs spielen [727-731], gelten CXC-Chemokine wie IL-8 eher als Chemoattraktant für Neutrophile [732]. Eine Ausnahme bilden die zuvor als besonders stark hochregulierten Chemokine CXCL10 und CXCL11, welche ähnlich der CC-Chemokine anstelle von Neutrophilen eher T-Lymphozyten und Monozyten anziehen [733-735]. Somit fanden wir vor allem Lymphozyten- als auch Monozyten-, aber auch Neutrophile - anziehende Chemokine als stark hochreguliert, wie es zuvor auch schon bei *in vivo* Versuchen mit *Salmonella* beschrieben wurde [736-738]. Auffällig war vor allem die starke Induktion von CCL20, dessen Bedeutung zuvor bereits in der systemischen Ausbreitung von *Salmonella* in Mäusen erkannt wurde [739]. So führten anti-CCL20 Antikörper zu einer verstärkten Besiedlung der Milz und einer Verschiebung des T-Zell-Profiles in Richtung einer Th2-Aktivierung. Eine ähnliche Funktion wurde zuvor auch für die CCL20 - Expression durch Epithelzellen im humanen Xenograft-Modell nachgewiesen [740].

Auch Gene der TNF-Superfamilie für TNF α , CD137L und TRAIL zeigten sich hochreguliert. So ist die protektive Rolle von TNF α sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits gut beschrieben [352]. CD137L (4-1BBL) dient der Aktivierung und Proliferation von T- und B-Lymphozyten [741]. Über seine Funktion bei einer Salmonelleninfektion ist bislang noch nichts bekannt. Interessant ist vor allem *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), da, wie der Name

bereits andeutet, seine Funktion ähnlich der anderer TNF-Familienmitglieder in der extrinsischen Apoptose - Induktion liegt [742] und klare Expressionsunterschiede zwischen den Serovaren zu beobachten waren (siehe Tabelle 13). So führten die hoch invasiven und schnell wachsenden Serovare *S. Typhimurium* und *S. Dublin* zu sehr großen Expressionsänderungen, wohingegen *S. Choleraesuis* und *S. Gallinarum* niedrigere Änderungen bewirkten (siehe Tabelle 13). Damit einher geht auch die bereits aus den Zytotoxizitätsversuchen bekannten stärkeren zytotoxischen Effekte bei *S. Typhimurium* und *S. Dublin* Infektionen gegenüber *S. Gallinarum* Infektionen.

Somit bestätigten die hier gefundenen Ergebnisse zum einen das Modell, dass aus dem Blut rekrutierte Monozyten / Makrophagen die Quelle vieler für die Salmonellenabwehr wichtiger Zytokine und Chemokine sein könnten. So fanden wir insbesondere die Induktion von Lymphozyten-, Monozyten- und Neutrophilen-anziehende Chemokine und Zytokine, die eine proinflammatorische Th1-dominierende Immunantwort einleiten würden. Daneben wurden aber auch Signalwege apoptotischer Vorgänge beeinträchtigt, und insbesondere in diesem Punkt fanden wir Unterschiede zwischen den Serovaren. Die Untersuchung unterschiedlich exprimierter Gene zwischen *S. Typhimurium* und *S. Gallinarum* infizierter Makrophagen führte dementsprechend auch nicht zu Genen der Inflammation, so dass beispielsweise Zytokine und Chemokine in beiden Gruppen ähnlich hochreguliert wurden, sondern vor allem zu Zelltod - assoziierten Genen und Metabolismus - assoziierten Genen, die vermutlich infolge einer unterschiedlich starken Belastung des Wirtszellmetabolismus durch eine unterschiedlich hohe intrazelluläre Bakterienzahl unterschiedlich stark reguliert wurden. Die für eine Inflammation wichtigen Gene waren demnach in mit verschiedenen Serovaren infizierten Makrophagen sehr ähnlich und spiegeln somit nicht die unterschiedliche Wirtsspezifität der *Salmonella* Serovare wieder.

Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob sich eine wirtsspezifische Genexpression inflammatorisch wichtiger Gene im Vergleich der Infektion humaner Makrophagen mit *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis* und Hühnermakrophagen, die durch unsere Kooperationspartner um B. Kapsers mit *S. Enteritidis* infiziert wurden, beobachten lässt. So führt *S. Enteritidis* im Menschen häufig zu einer Gastroenteritis wohingegen es im adulten Huhn oft asymptomatisch persistiert und ausgehend von diesen Trägertieren eine große Gefahr für den gesamten Bestand eines Stalls sowie die Lebensmittelproduktion ausgeht [743-746]. Für uns war von Interesse, ob sich ein ähnlicher Unterschied in der Reaktion der Makrophagen auf eine Infektion mit *S. Enteritidis* abzeichnete. Diesbezüglich sei angemerkt, dass die verwendeten *S. Enteritidis* - Stämme aus einem Salmonellose-Ausbruch in Fulda 2007

stammen [747], wobei für die Hühnermakrophagen - Infektion das Hühner - Isolat und für die humanen Makrophagen - Infektion das entsprechende Isolat aus dem Menschen verwendet wurden. Die Durchführung der Versuche erfolgte in möglichst ähnlicher Weise, so dass dieselben MOIs, derselbe Zeitpunkt der Probennahme, dieselben Protokolle zur RNA-Extraktion und zu weiterführenden Methoden bis zur Nutzung des Agilent Microarray Systems angewandt wurden. Ein Vergleich der erhaltenen Genexpressionsunterschiede in humanen und aviären Makrophagen ist in Tabelle 14 zu sehen.

Rezeptoren	Mensch		Huhn
	FC (ST)	FC (SE)	FC (SE)
TLR2	1,4	1,1	-2,3
TLR4	1,1	-1,2	-3,7
TLR5	-6,1	-9,3	-2,1
TLR9	1,2	1,6	
CD14	-1,2	-1,1	-1,6
CD40	1,7	2,2	17,7
CD80	6,7	3,3	7,5
CD86	2,1	1,2	1,5
CD274	6,4	5,7	1,4
TLR / NOD Signalling			
NFκB1	3,0	3,0	4,1
NFκB2	3,0	4,5	6,7
RelA	1,7	2,2	2,2
RelB	1,7	1,3	1,3
c-Rel	3,2	2,2	
JUN	-1,4	-2,0	-1,4
FOS	-3,5	-4,7	-1,5
Interleukine			
IL-1β	11,8	13,3	14,8
IL-6	70,4	59,4	28,0
IL-10	3,1	4,0	9,5
IL-12p35	2,4	2,3	1,7
IL-12p40	26,2	20,6	146,8
IL-15	3,2	3,3	-2,0
IL-22	11,0	8,8	2,5
IL-23*	77,2	80,5	
IL-27/IL-30*	50,4	65,1	

CC Chemokine			
CCL1	12,3	12,6	65,6
CCL4	5,3	6,3	68,9
CCL5, RANTES	9,4	11,8	10,4
CCL19, MIP-3b	3,1	4,4	1,4
CCL20, MIP-3a	85,7	70,5	343,0
CXC Chemokine			
CXCL1, GRO α	8,5	6,8	6,5
CXCL2, GRO β	7,2	5,2	
CXCL3, GRO γ	10,7	4,6	
CXCL8, IL-8	6,7	6,1	
CXCL10, IP-10*	10,6	14,2	
CXCL11, IP-9*	9,4	9,4	
Wachstumsfaktoren			
Adrenomedullin	6,2	5,3	27,4
BMP2A	13,1	10,8	1,9
CSF2	14,6	19,8	2,9
CSF3	99,5	100,0	

Tabelle 14: Genexpressionsänderungen (FC) ausgewählter immunrelevanter Faktoren in mit *S. Typhimurium* (ST) und *S. Enteritidis* (SE) infizierten Primärmakrophagen aus humanem Blut (Spalte 1 & 2) und Hühnerblut (Spalte 3). Dargestellt ist jeweils die Expressionsänderung zu uninfizierten Zellen. * bislang nicht im Hühnergenom nachgewiesen. Hühner Genexpressionsdaten sind mit Erlaubnis aufgeführt [563].

Leider waren nicht für alle humanen Gene auch entsprechende Vertreter auf der aviären Seite zu finden bzw. wurden nicht auf die Hühner - spezifischen Microarrays gespottet. Kaiser *et al.* veröffentlichten 2005 eine Analyse des Hühnergenoms hinsichtlich orthologer Gene, die Sequenzhomologien und Syntenien zu immunologisch relevanten Säugergenen aufwiesen [748]. Dabei fanden sie heraus, dass einige Gene etwa aufgrund der unterschiedlichen Architektur des Immunsystems im Huhn und in Säugern im Hühnergenom fehlen. Dass diese Ergebnisse jedoch nicht endgültig waren, zeigten aktuelle Fortschritte zu bislang als im Hühnergenom fehlend beschriebenen Genen wie dem humanen CSF3 (M-CSF) Ortholog [749], die jedoch bei der Herstellung der hier verwendeten aviären Microarrays nicht mehr berücksichtigt werden konnten. Nichtsdestotrotz erhält man schon anhand der hier analysierten und dargestellten Gene einen Überblick zur Expression wichtiger immunrelevanter Faktoren. Da die Daten in unterschiedlichen Laboratorien erhoben wurden und insbesondere bei der Auswertung der Signalintensitäten etwa bei der Normalisierung und der Berechnung der Genexpressionsänderungen (*fold changes*; FC) unterschiedliche Methoden und Algorithmen unvermeidbar waren, ist ein Vergleich der humanen und aviären Ergebnisse nur bedingt möglich. So lassen sich etwa die Genexpressionsänderungen für ein Gen nur unter

Berücksichtigung der übrigen Werte miteinander vergleichen. Beispielsweise fällt mit einer 286-fachen Genexpressionsänderung das Chemokin CCL20 bei den Hühnerversuchen auf. Zwar ist der Wert deutlich höher als der für die humanen Makrophagen (86- bzw. 71-fach); im Vergleich zu den übrigen Werten markiert er jedoch in beiden Fällen die größte Genexpressionsänderung der hier dargestellten Gene und wird daher als ähnlich hochreguliert betrachtet.

Die Analyse der aviären Daten ergibt sehr ähnlich der zuvor für die humanen Makrophagen beschriebenen Ergebnisse eine starke Hochregulation vor allem der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-12p40. Im Gegensatz zum Menschen, wo das Zytokin IL-6 etwa sechsmal stärker hochreguliert wird als IL-1 β , kommt es im Huhn nur zu einer doppelt so starken Hochregulation. Während die genetische Struktur von IL-1 β zwischen Mammaliern und Hühnern fast identisch ist, besitzt das aviäre IL-6 ein Intron weniger, so dass zwei Exons zu einem fusionierten [750]. Zudem fehlen einige regulatorische Elemente, so dass sich die Regulation von IL-6 zwischen Mensch und Huhn durchaus unterscheiden und während einer Salmonelleninfektion zu einer unterschiedlich hohen Genexpression führen kann, wie es in diesem Fall für Makrophagen gezeigt wurde. Nichtsdestotrotz bleibt in beiden Fällen eine deutlich Th1-lastige Proinflammation, die durch die Hochregulation der Chemokine CCL1, CCL4 (K203 im Huhn), CCL5 und CCL20 primär zur Einwanderung von Monozyten und Lymphozyten unterstützt wird [751-753]. Das für die Anziehung von Neutrophilen (beim Menschen) bzw. Heterophilen (beim Huhn) wichtige IL-8 (strukturell analog zu CXCL1/K60 im Huhn [754]) wird in beiden Fällen nur moderat hochreguliert. Betrachtet man die für diese Inflammation wichtigen Signalwege, so findet man eine leichte Herunterregulation von Fos und Jun, wohingegen die NF- κ B – assoziierten Gene für NF- κ B1 (p50 bzw. p105) und NF- κ B2 (p52 bzw. p100) in beiden Spezies hochreguliert wurden. Damit ähnelt die Antwort stark den Ergebnissen, die Ciraci *et al.* für die einfache Behandlung von aviären HD-11 Makrophagen mit *Salmonella* LPS fanden [755]. Im Gegensatz zu den hier präsentierten Daten, fanden Ciraci *et al.* allerdings eine leichte Hochregulation von Komponenten des AP-1 Signalweges. Möglicherweise wird insbesondere dieser Signalweg durch andere bakterielle Faktoren negativ beeinflusst, die bei der Betrachtung von LPS allein nicht zur Geltung kommen.

Die Untersuchung einiger Oberflächenproteine und wichtiger Rezeptoren ergab, dass TLRs tendentiell in beiden Spezies eher herabreguliert werden, wohingegen der für die Aktivierung von T-Zellen wichtige Cofaktor CD80 hochreguliert wird. Unterschiede sind dagegen bzgl. der Oberflächenrezeptoren CD40 und CD274 zu erkennen. Während CD40, das der

Aktivierung der Makrophagen durch T-Zellen dient, in Hühnermakrophagen hochreguliert wird, beobachteten wir keine deutliche Expressionsänderungen in humanen Zellen. Eine ähnliche Funktion wurde jedoch für beide Spezies beschrieben [756]. Bzgl. CD274 (PD-L1) fanden wir eine starke Hochregulation in humanen Makrophagen, wie sie bereits für aktivierte Makrophagen in der Maus beschrieben wurde [566]. In Hühnermakrophagen kam es dagegen zu keiner Expressionsänderung; die Rolle von CD274 im Huhn ist jedoch bislang kaum untersucht und eine ähnliche Funktion wie im Menschen entsprechend ungewiss. Neben diesen beiden Rezeptoren deuteten sich noch Spezies-spezifische Unterschiede in zwei Wachstumsfaktoren an: GM-CSF (CSF2) und BMP-2. Über die Bedeutung von GM-CSF in der Differenzierung von Monozyten wurde bereits zuvor geschrieben (siehe S.147). Eine ähnliche Funktion im Huhn liegt nahe, wurde aber bislang nicht veröffentlicht. BMP-2 ist ein Wachstumsfaktor der TGF- β - Superfamilie, der primär auf die Osteogenese wirkt [757]. Darüberhinaus wurde aber auch bei BMP-2 Behandlung von Ratten eine starke inflammatorische Infiltration beobachtet [758] und eine Rolle in der Anziehung von Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen beschrieben [759]. Welche Funktion BMP-2 bei Infektionsvorgängen spielt, ist jedoch bislang unklar.

Zusammenfassend konnte in diesem vergleichenden Ansatz gezeigt werden, dass sowohl Makrophagen des Huhns als auch des Menschen in sehr ähnlicher Weise auf eine Infektion mit *S. Enteritidis* mit der Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zur Anziehung von Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen / Heterophilen reagierten. Zu beobachten waren lediglich geringfügige Unterschiede in der Expression einzelner Gene für Oberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren, deren Relevanz im Infektionsprozess vor allem im Huhn bislang unklar und deren Einfluss auf inflammatorische Vorgänge im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen recht konservierten Mechanismen vermutlich äußerst begrenzt einzuschätzen ist. Deutliche Unterschiede in der Genexpression, die der unterschiedlichen Pathogenese von *S. Enteritidis* im Huhn und im Menschen entsprechen, konnten auf der Ebene der Makrophagen nicht gefunden werden.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit früheren Untersuchungen zur Genexpression von *S. Choleraesuis* und *S. Typhimurium* infizierten Schweinen, so wurde ebenfalls in beiden Gruppen eine starke Aktivierung proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF gefunden, die zeitliche Abfolge unterschied sich jedoch deutlich zwischen den beiden Gruppen, so dass es bei *S. Typhimurium* zu einer schnellen Aktivierung proinflammatorischer Zytokine kam, bei *S. Choleraesuis* infizierten Tieren zu einer verzögerten [760]. Entsprechend dieser zeitlichen Unterschiede sind evtl. auch unterschiedliche Zellpopulationen

an der Immunreaktion beteiligt. So spricht einiges dafür, dass dieser Unterschied nicht von Makrophagen ausgeht, die als Gewebsmakrophagen bewiesenermaßen kaum zur Inflammation beitragen und als Blutmonozyten / Makrophagen erst auf einen bereits vorhandenen Stimulus hin ins Gewebe migrieren. Die hier gezeigten Versuche bewiesen, dass Makrophagen aus dem Blut sogar unabhängig ihrer Herkunft aus dem Huhn oder dem Menschen in sehr ähnlicher Weise auf eine Infektion reagierten und bzgl. ihrer Zytokinexpression auch kaum zwischen den Serovaren unterschieden.

Viel eher könnten die intestinalen Epithelzellen eine entscheidende Rolle spielen, da ihre Variabilität bereits in der Unterscheidung zwischen kommensalen und pathogenen Erregern nachgewiesen wurde [761] und eine ausbleibende frühe Inflammation etwa im Falle einer *S. Choleraesuis* - Infektion im Schwein zu allererst durch eine entsprechende Reaktion der Epithelzellen gewährleistet werden muss. Eine fehlende Reaktion anderer Zelltypen wie Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten, wäre dann nur eine Folge davon.

Dass Epithelzellen deutlich variabler reagieren können und sich ihre Reaktion wirtsspezies-spezifisch unterscheiden kann, zeigten die hier aufgeführten Untersuchungen.

Betrachtet man die Versuche zur NF- κ B Aktivierung, so fällt auf, dass *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* in humanen LoVo Epithelzellen nur zu einer äußerst geringfügigen Aktivierung führen, während diese zumindest bei *S. Gallinarum* in den Makrophagenzellen THP-1 und 3D4/31 als auch den porcinen Epithelzellen IPEC-J2 im Bereich der übrigen wirtsadaptierten Serovare liegt (vgl. IV.5.2). Die extrem geringe Wachstumsrate von *S. Pullorum* überdeckt vermutlich eine entsprechende Beobachtung wie bei *S. Gallinarum*. Damit scheint Flagellin als PAMP für Makrophagen und porcine Epithelzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Beachtet man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Stimulation mit verschiedenen PAMPs und der Infektion mit Flagellindeletionsmutanten, bewahrheitet sich diese Vermutung. So waren alle hier verwendeten humanen Zelllinien in der Lage, Flagellin zu erkennen und mit einer entsprechenden NF- κ B Aktivierung darauf zu reagieren (siehe Abbildung 26). Jedoch ergab dieser Faktor ausschließlich in den Epithelzelllinien LoVo und Caco-2 einen deutlich unterscheidbaren Phänotyp, so dass eine Deletion der Flagellingene zu einer deutlich verminderten NF- κ B Aktivierung und Zytokinexpression führte, die auch durch Anpassung der MOI an die verminderte Invasivität nicht wie etwa bei den humanen Makrophagen THP-1 auszugleichen war. Flagellin ist also für humane, nicht aber porcine Epithelzellen ein entscheidender Faktor bei der Aktivierung von NF- κ B. Für Makrophagen spielt dieser Faktor unabhängig ihrer prinzipiellen Aktivierbarkeit (siehe THP-1: Abbildung 26) jenseits von Invasionsunterschieden ebenfalls keine Rolle.

Diese Spezies-spezifischen Unterschiede in der Erkennung von Flagellin und der Umsetzung in inflammatorische Signale werden durchaus von einigen Veröffentlichungen gestützt. So fanden Kestra *et al.*, dass nach Klonierung von TLR5 aus der Maus, dem Menschen und dem Huhn in HeLa-Zellen diese unterschiedlich auf Flagellin von *S. Enteritidis* reagierten, und zeigten damit erstmalig Spezies-spezifische Unterschiede in der Flagellin - Erkennung bzw. Verarbeitung zu zellulären Signalen [762]. Dass diese Spezies-spezifische Reaktion auf Flagellin *in vivo* relevant ist, wiesen Winter *et al.* ein Jahr später nach, indem sie zeigten, dass die Flagellin - Erkennung in Rindern, nicht jedoch in Mäusen zur Inflammation und Diarrhoe bei einer *S. Typhimurium* Infektion beitrug [737]. Dass es trotz der hohen Konservierung von TLRs Spezies-spezifisch zu Unterschieden in der Erkennung sowie in der resultierenden Immunantwort kommen kann, lässt schon die Ausstattung der einzelnen animalen Spezies mit TLRs vermuten. So sind insgesamt 13 TLRs in Mammaliern beschrieben, von denen z.B. der Mensch zehn besitzt [763]. Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse kein TLR10, dafür die TLRs 11, 12 und 13. Hühner wiederum exprimieren keine TLRs 8 und 9 [764], dafür TLRs 15 und 21 [763]. In Knochenfischen sind bislang 17 verschiedene TLRs bekannt [765]. Doch auch jenseits dieser Unterschiede in der Ausstattung mit bestimmten TLR-Genen gibt es Sequenzunterschiede gleicher TLRs verschiedener Spezies. So besitzen Rinder wie der Mensch die TLRs 1-10 [766], die Sequenzhomologie liegt im Mittel jedoch nur bei 65 – 77% [767]. Eine ähnliche Homologie wurde auch für die TLRs von Mensch und Schwein gefunden [767]. Während die intrazellulären Domänen dabei hoch konserviert vorliegen, gibt es auf der extrazellulären Seite große Spezies-spezifische Divergenzen [298], die beispielsweise dazu führen, dass bestimmte Lipid A - Analoga durch murines nicht jedoch humanes TLR4 erkannt werden [768]. Darüberhinaus erkannte TLR4 aus Pferd und Hamster, nicht jedoch aus dem Menschen oder der Maus LPS von *R. sphaeroides* [769]. Doch auch die Signalwege abwärts der TLR-Erkennung unterscheiden sich zwischen den Spezies. So fanden etwa Kestra *et al.* für die TLR4-abhängige LPS - Erkennung, dass diese in Hühnern nicht zur MyD88-unabhängigen Induktion von IFN β führte und schlussfolgerten daraus, dass der TRAM-TRIF – Signalweg in Hühnern fehlt [770]. In Schweinen wurde zudem eine Aktivierung verschiedener Signalwege durch TLR1 und 6 bzw. TLR10 vermutet, die bei Mensch und Maus eher einheitlich über MyD88 erfolgt [771]. Wie variabel insbesondere die LRR-Region auch innerhalb einer Spezies sein kann, zeigten Analysen von *single nucleotide polymorphisms* (SNP) in NOD-Genen der Maus und des Schweins [772-774]. Diese erhöhen vermutlich die Variabilität der Erkennung von PAMPs und könnten damit für die unterschiedliche Resistenz und Suszeptibilität verschiedener Schweine- und Hühnerrassen Infektionen gegenüber mit

verantwortlich sein [775, 776]. So wurde für porcines NOD2 eine mit bestimmten SNPs variierende Funktion in der Erkennung von MDP nachgewiesen [776]. Für Hühner wurde beispielsweise gezeigt, dass die Resistenz gegenüber latenten *Salmonella* Infektionen von der Immunaktivierung abhängt, deren Ausprägung mit bestimmten Inzuchtlinien korreliert [777]. Im Mensch sind insbesondere die negativen Folgen von SNPs, etwa die Korrelation von SNPs in NOD-Genen und der Krankheit Morbus Crohn, bekannt [778].

Dass nicht nur die extrazelluläre sondern auch die intrazelluläre Erkennung von PAMPs Spezies-spezifisch unterschiedlich ausfällt, zeigten die hier dargestellten Versuche mit Muropeptiden, deren Bedeutung für bakterielle Infektionen in Flora und Fauna beschrieben ist [779]. Die prinzipielle Eignung der Untersuchung der NF- κ B Aktivierung zur Analyse der Funktion intrazellulärer NLRs bewiesen frühere Arbeiten von Inohara *et al.* und Ogura *et al.* zur NF- κ B Aktivierung durch NOD1- und NOD2-Bindung von Muropeptiden [780, 781]. Betrachtet man die Reaktion auf diese NOD1- und NOD2-abhängigen Stimulantien und die $\Delta ampG\Delta mppA$ -Doppelmutante, so korrelieren diese mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen bzgl. des Flagellins. Auch hier reagierten wiederum einzig die humanen intestinalen Epithelzellen LoVo und Caco-2 durch eine höhere NF- κ B Aktivierung und Zytokinexpression auf eine extrazelluläre Akkumulation von Muropeptiden bei der $\Delta ampG\Delta mppA$ -Doppelmutante gegenüber dem Wildtyp (siehe Abbildung 28). Eine ähnliche Reaktion der humanen Epithelzellen HeLa und HEK293 wiesen Nigro *et al.* in einem vergleichbaren Ansatz mit *S. flexneri* nach [274]. Dass jedoch prinzipiell alle hier betrachteten Zelllinien extrazelluläre und erst recht intrazelluläre Muropeptide beispielsweise durch NOD-Rezeptoren erkennen, bewiesen entsprechende Versuche mit iE-DAP und M-Tri-DAP (siehe IV.5.1). Über die Wege, die extrazellulär applizierte Muropeptide unabhängig von einer Infektion zu den intrazellulären Rezeptoren nehmen, wird seit einiger Zeit spekuliert. So wurde zum einen die Relevanz zweier Transmembranproteine, PepT1 und PepT2, für die Translokation von iE-DAP und MDP in Epithelzellen beschrieben, die bislang vor allem durch ihre Rolle bei der Nährstoffaufnahme bekannt waren [271, 272, 782]. Aber auch der endozytische Weg über Clathrinummantelte Vesikel kann pH-abhängig dem Import von Muropeptiden dienen [273]. Für den Weg vom frühen Endosomen ins Zytosol sind darüberhinaus wieder Transporter wie das nachgewiesene SLC15A4 notwendig [273]. Somit gelangen extrazelluläre NOD-Liganden intrazellulär an die entsprechenden Rezeptoren und können zu der beschriebenen Aktivierung führen. Welche Rolle sie jedoch bei der Infektion mit invasiven Erregern spielen, ist bislang unklar. Unabhängig davon scheinen im Rahmen einer Infektion, wie zuvor für Flagellin beschrieben, auch Muropeptide ausschließlich bei humanen Epithelzelllinien eine Wirkung zu

entfalten, auch wenn die Relevanz nicht ganz so groß wie beim Flagellin ausfällt. Diskrepanzen in der Erkennung bestimmter Liganden als synthetischer Zusatz und ihrer Rolle während einer Infektion lassen sich durch das komplexe Netzwerk unterschiedlicher Signale, die bei einer Infektion ausgelöst werden, erklären. So wirken bei einer Infektion von *Salmonella* nicht nur Muropeptide sondern auch andere PAMPs wie Flagellin, Nukleinsäuren und LPS sowie eine Reihe verschiedener Effektoren auf zelluläre Signalwege, die zur Aktivierung aber auch Inhibition von NF- κ B führen. Beispielsweise nutzen sowohl TLRs als auch NLRs die Kinase RICK zur Aktivierung des NF- κ B Signalwegs [783], so dass es zu einer Verschaltung der Signale kommen muss. Beispiele zur Wechselwirkung von TLR- und NLR-Signalwegen gibt es viele. Z.B. zeigten Pauleau *et al.*, dass NOD2-defiziente Mäuse nicht mehr auf LPS reagierten [784]. Zudem fanden Netea *et al.*, dass die Funktion von NOD2 zu einer Steigerung der TLR2-Funktion führt und zudem modulierend auf die TLRs 3 und 4, nicht jedoch 5, 7 und 9 wirkt [785]. Synergistische Effekte zwischen TLR- und NOD-Signalling fanden auch Uehara *et al.* in humanen THP-1 Makrophagen [509] und Tada *et al.* in humanen DCs [786]. Neben TLR - NLR Interaktionen dürften auch NLRs andere NLRs über heterologe Interaktionen ihrer CARD-Domänen beeinflussen [787]. So fanden Damiano *et al.*, dass Ipaf (CARD12), welches für die intrazelluläre Flagellin-Erkennung notwendig ist, die NF- κ B aktivierende Funktion der NOD-Rezeptoren inhibieren kann [788]. Eine ähnliche NF- κ B inhibierende Wirkung wurde auch für CARD6 beschrieben, indem es vermutlich mit NOD1 und anderen NF- κ B aktivierenden Adaptorproteinen um die Bindung von RICK konkurriert [789]. Dass diese Konkurrenz um RICK nicht die Wirkung zahlreicher TLRs negativ beeinflusst, zeigten die zuvor beschriebenen Veröffentlichungen zu TLR - NLR - Wechselwirkungen. Warum jedoch in einigen Fällen die Interaktion inhibierend und in anderen Fällen synergistisch wirkt, ist bislang unklar, könnte jedoch von der Expression und damit der Verfügbarkeit zentraler Moleküle wie RICK abhängen, die selbst NF- κ B - oder MAPK-abhängig exprimiert werden. So fanden Chen *et al.* eine vielseitige, von RICK abhängige Funktion von NOD2. Demnach führt NOD2 in Anwesenheit von RICK zu einer Aktivierung von TAK1 und damit zu einer Aktivierung von NF- κ B, während in Abwesenheit von RICK es eine inhibitorische Wirkung auf TAK1 und damit auch NF- κ B entfaltet [790]. Somit entscheidet letztlich die Verfügbarkeit bestimmter zentraler Kinasen über die modulierende Wirkung von NLRs und CARD-Proteinen. In jedem Fall wird hier jedoch die Komplexität des Systems zur Erkennung mikrobieller Strukturen deutlich und klar, warum die Reaktion auf ein bestimmtes synthetisches PAMP allein sich u.U. von der Reaktion infizierter Zellen unterscheidet.

Über Spezies- sowie Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Erkennung von Muropeptiden ist bislang ebenfalls wenig bekannt. So zeigten Magalhaes *et al.*, dass humanes NOD1 Tripeptide, murines NOD1 dagegen Tetrapeptide effizient bindet mit entsprechenden Konsequenzen etwa bei der Erkennung des Trachea Cytotoxins (TCT) von *B. pertussis* [791]. Dass zudem die Expression der Rezeptoren und damit die Erkennung der Liganden jedoch Spezies-, Organ- und Zelltyp-spezifisch sehr unterschiedlich sein kann, zeigten Lech *et al.* in humanem und murinem Blut und Gewebe [792]. Damit ist die unterschiedliche Erkennung von PAMPs und Weiterleitung der Signale jenseits der Abhängigkeit der dafür notwendigen Gene in verschiedenen Wirtsspezies und Zelltypen durchaus möglich und z.T. nachgewiesen. Für eine bedeutende Rolle insbesondere nicht-hämatopoetischer Zellen gegenüber etwa DCs spricht auch eine Arbeit von Fritz *et al.* zur NOD-abhängigen Aktivierung des adaptiven Immunsystems in Mäusen [793].

Abschließend konnte also gezeigt werden, dass einzig die humanen Epithelzelllinien LoVo und Caco-2 sensibel auf PAMPs wie Flagellin oder Muropeptide während einer Infektion reagierten und sich dieser Phänotyp deutlich von der Reaktion der porcinen Epithelzelllinie IPEC-J2 unterschied, die unabhängig von diesen PAMPs auf eine Infektion reagierte. Die verwendeten Makrophagen ermöglichten keine entsprechende Unterscheidung während einer Infektion, obwohl sie unterschiedlich auf die einzelnen Faktoren als solches reagierten. Dazu passt die generell sehr ähnliche Expressionsänderung immunregulatorischer wichtiger Gene humaner und aviärer primärer Makrophagen, die zudem im Menschen weitgehend unabhängig vom infizierenden Serovar war. Damit könnten Serovar- und Wirtsspezies-spezifische Unterschiede sich möglicherweise eher anhand der Reaktion der Epithelzellen als anhand der Makrophagen manifestieren und bemerkbar machen, was diesen Zelltyp in den Fokus möglicher zukünftiger Untersuchungen zur Wirtsadaptation stellt.

V.4. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Salmonella* Serovare entsprechend ihrer Wachstums- und Invasionscharakteristika maßgeblich das Überleben der Wirtszelle und die aus der Infektion resultierende Immunantwort beeinflussen, was mit der jeweiligen Pathogenese *in vivo*, weniger jedoch mit der Wirtsspezifität korrelierte. Die gefundenen Daten legten nahe, diesbezüglich zwischen den Funktionen von Makrophagen und Epithelzellen zu unterscheiden. So reagierten die untersuchten Makrophagen bzgl. ihrer Aktivierung und Expression immunregulatorischer Gene unabhängig ihrer Spezieszugehörigkeit sehr analog auf ihre Infektion. Einzig die Tendenz, auf eine Infektion mit Apoptose, Nekrose oder

Pyroptose zu reagieren, unterschied sich deutlich zwischen den Zelllinien. So deutete sich die Notwendigkeit eines extrem langsamen Wachstums und einer geringen Invasivität der Geflügel-beschränkten Serovare *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* für die Persistenz in sehr sensibel auf die intrazelluläre bakterielle Belastung reagierenden Hühnermakrophagen HD-11 an. Um zu klären, ob die niedrige NF- κ B Aktivierung in HD-11 Zellen durch hoch invasive Serovare tatsächlich auf eine Caspase-abhängige Inhibition des NF- κ B – Signalwegs zurückzuführen ist, bieten sich Versuche unter Caspase - Inhibition an. Dies ließe sich durch siRNAs bewerkstelligen, was jedoch eine vorhergehende Transfektion voraussetzt, die u.U. selbst wieder einen Einfluss auf die NF- κ B - Aktivierung und Apoptose - Regulation hat. Alternativ bieten sich zellpermeable Caspase-Inhibitoren wie die Peptide z-WEHD, -VDVAD-, -DEVD- oder -IETD-fmk an [794]. Resultierend würde man bei den HD-11 Zellen ein ähnliches Bild wie bei den anderen Zelllinien erwarten mit den Breitspektrum-Serovaren als besonders stark NF- κ B aktivierend. Im Gegensatz zu den Hühnermakrophagen stellten sich die porcinen Makrophagen als äußerst robust dar und könnten damit sogar eine längere Persistenz schnell wachsender Serovare tolerieren, wie sie etwa für latente Infektionen mit Breitspektrum-Serovaren im Schwein erforderlich wäre. Ob dieses Verhalten tatsächlich Spezies-spezifisch ist, muss durch die Nutzung geeigneter Modellsysteme getestet werden, die näher an der *in vivo* Situation sind. So würden sich in Anlehnung der hier bereits erprobten Nutzung primärer Zellen z.B. vergleichende Studien mit Primärmakrophagen aus Blut des Huhns, des Schweins und des Menschen anbieten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als Transport-Vehikel der Salmonellen bei einer systemischen Infektion fungieren. Wichtig wäre diesbezüglich vor allem, die benutzten Makrophagen hinsichtlich ihrer Ausstattung und Reife zu überprüfen, da in der Vergangenheit vor allem die Verwendung von Tieren unterschiedlichen Alters und mit entsprechend unterschiedlich ausgereiften Immunsystemen Vergleiche kaum ermöglichten und in Hinsicht auf die unterschiedliche Ausprägung von *Salmonella* Infektionen in juvenilen und adulten Tieren aber dringend nötig wären.

Zur Untersuchung einer Spezies-spezifischen Immunreaktion bieten sich anhand der hier gefundenen Ergebnisse insbesondere die Epithelzellen als eine der frühesten Komponenten im Infektionsprozess an. Ihre regulierende Funktion dürfte entscheidend für die systemische Ausbreitung von *Salmonella* sein und bietet damit die Möglichkeit einer Serovar-spezifischen Diskriminierung. Bedingung für vergleichende Versuche mit Epithelzellen wäre jedoch die Etablierung einer intestinalen Epithelzelllinie aus dem Huhn. Dies wäre von besonderem Interesse, da M-Zellen als Haupteintrittspforte in Säugern sich von äquivalenten Zellen im Huhn unterscheiden [795]. Spezies-spezifische Unterschiede in der Erkennung wichtiger

PAMPs deuteten sich in dieser Arbeit vor allem auf Epithelzellebene an. So bedürfen etwa die Flagellin-abhängigen Unterschiede in der Invasivität von *Salmonella* in humanen und porcinen Zellen der Aufklärung. Danach wäre Flagellin sowohl für die Invasion von *Salmonella* als auch für die induzierte Immunreaktion in humanen nicht jedoch porcinen Epithelzellen wichtig. Bevor jedoch diese Spezies-spezifischen Unterschiede aufgeklärt werden können, muss der zugrunde liegende Mechanismus verstanden werden. Um zu untersuchen, ob die Adhärenz oder die Invasion in humanen Zellen Flagellin-abhängig beeinflusst werden, könnte man etwa nicht-invasive Mutanten (z.B. $\Delta invG$ [796]) erstellen und mit diesen Adhäsionsassays durchführen. Sollten in diesem Fall Wildtyp- und Flagellinmutanten eine unterschiedliche Adhärenz (mit initialem Zentrifugationsschritt) zeigen, so wirkt Flagellin auf die Adhärenz, bei gleicher Adhärenz vermutlich auf den Invasionsprozess. In beiden Fällen müssten erst entsprechende Adaptoren oder Bindungspartner auf der Wirtsseite aufgeklärt werden, bevor über Spezies-spezifische Unterschiede nachgedacht werden kann.

Darüberhinaus interessieren die Ursachen für die wirtsspezifisch unterschiedlichen Immunreaktionen auf Flagellin bzw. nicht-motile *Salmonella* Mutanten sowie auf Muropeptide, die sowohl in der Erkennung, als auch im späteren Verlauf der Signaltransduktion bis zur Aktivierung von NF- κ B begründet sein könnten. Damit bestünden zukünftige Arbeiten zum Verständnis dieser Unterschiede etwa darin, entsprechend der Veröffentlichung von Kestra *et al.* zum Spezies-spezifischen Verhalten von TLR5 Spezies-spezifische Unterschiede auch in der PAMP-Erkennung zwischen Mensch und Schwein aufzuklären und die Arbeit darüberhinaus auf intrazelluläre NLRs auszuweiten [762]. In Anlehnung daran würde die Klonierung von speziefremden TLRs und NLRs beispielsweise in humane Zellen Aufschluss bringen. Die hier etablierten NF- κ B – Reporterzelllinien böten sich als nützliche Grundlage an. Erst nach Klärung dieser Fragen könnte man die von den PRRs ausgehenden Signalwege in ähnlicher Weise untersuchen. Vor allem die Suche möglicher Adaptoren in der NLR-Erkennung beispielsweise über Yeast-Two-Hybrid Systeme oder Pulldown-Assays wäre diesbezüglich interessant. Von zentralem Interesse auch hinsichtlich der Wirtsadaptation von *Salmonella* wäre demnach die Aufklärung Spezies-spezifischer Unterschiede in Pathogen-erkennungsmechanismen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Popoff MY, Le Minor LE:** Genus XXXIII. Salmonella. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2*. Editiert durch Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. New York, NY: Springer; 2005: 764-799
2. The Genus Salmonella Lignieres, 1900. *J Hyg (Lond)* 1934, **34**:333-350.
3. **Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PA, Weill FX:** Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, **161**:26-29.
4. **Le Minor L, Popoff MY:** Designation of Salmonella-Enterica Sp. Nov., Nom. Rev., as the Type and Only Species of the Genus Salmonella. *International journal of systematic bacteriology* 1987, **37**:465-468.
5. **Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ, 3rd:** 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* 1989, **27**:313-320.
6. The type species of the genus Salmonella Lignieres 1900 is Salmonella enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet enterica in Salmonella enterica over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:519-520.
7. **Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzebey JP:** Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:521-524.
8. **Brunner F, Margadant A, Peduzzi R, Piffaretti JC:** The plasmid pattern as an epidemiologic tool for Salmonella typhimurium epidemics: comparison with the lysotype. *The Journal of infectious diseases* 1983, **148**:7-11.
9. **Crump JA, Luby SP, Mintz ED:** The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 2004, **82**:346-353.
10. **Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM:** The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, **50**:882-889.
11. **Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, Farley MM, Shallow S, Marcus R, Cieslak PR, Deneen VC, Tauxe RV:** FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal Salmonella infections in the United States. *Clin Infect Dis* 2004, **38 Suppl 3**:S127-134.
12. **Hartung M:** Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2004. In *BfR Wissenschaft* (Hartung M ed.), vol. 4. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung; 2006:13-118.
13. **Kühn H:** Vorkommen und epidemiologische Verbreitung. In *Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte*. Editiert durch Kühn H, Tschäpe H. München: Medizin Verlag; 1996
14. **RKI:** Salmonellose. In *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009*. Berlin: Robert Koch-Institut; 2010: 167-171

15. **Hartung M, Käsbohrer A:** Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009. In *BfR Wissenschaft* (Hartung M, Käsbohrer A eds.), vol. 1. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung; 2011:55-154.
16. **EFSA:** Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 2010, **8**:23-110.
17. **Ward LR, Threlfall J, Smith HR, O'Brien SJ:** Salmonella enteritidis epidemic. *Science* 2000, **287**:1753-1754.
18. **Switt AI, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M:** Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of Salmonella enterica serotype 4,5,12:i. *Foodborne Pathog Dis* 2009, **6**:407-415.
19. **Threlfall EJ, Ward LR, Rowe B:** Chloramphenicol-resistant S typhimurium. *Vet Rec* 1979, **104**:60-61.
20. **Schelotto F, Rivas C, Alia de Montero CA, Colensky L:** [Characteristics of the multiresistant strains of Salmonella typhimurium causing cross infections in pediatric hospitals]. *Rev Latinoam Microbiol* 1975, **17**:9-16.
21. **Vidon DJ, Jacob S, Ganzenmuller M:** Incidences of simple and transferable drug resistance in Escherichia coli and Salmonella isolated from various foods: identification of a R plasmid in S. saint-paul. *Ann Microbiol (Paris)* 1978, **129**:155-159.
22. **WHO:** Drug-resistant salmonella. In *Fact sheet N°139*. Geneva; 2005.
23. **Marshall BM, Levy SB:** Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 2011, **24**:718-733.
24. **Molbak K:** Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004, **51**:364-369.
25. **Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML:** Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist* 2000, **6**:77-83.
26. **Swartz MN:** Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis* 2002, **34 Suppl 3**:S111-122.
27. **Hogue A, White P, Guard-Petter J, Schlosser W, Gast R, Ebel E, Farrar J, Gomez T, Madden J, Madison M, et al:** Epidemiology and control of egg-associated Salmonella enteritidis in the United States of America. *Rev Sci Tech* 1997, **16**:542-553.
28. **Helms M, Ethelberg S, Molbak K:** International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:859-867.
29. **Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH:** Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *N Engl J Med* 2000, **342**:1242-1249.
30. **Gupta A, Fontana J, Crowe C, Bolstorff B, Stout A, Van Duyne S, Hoekstra MP, Whichard JM, Barrett TJ, Angulo FJ:** Emergence of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. *J Infect Dis* 2003, **188**:1707-1716.

31. **RKI**: Aus der Arbeit des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger. In *Epidemiologisches Bulletin*, vol. 15. Berlin: Robert Koch-Institut; 2010.
32. **Minette HP**: Salmonellosis in the marine environment. A review and commentary. *Int J Zoonoses* 1986, **13**:71-75.
33. **Meerburg BG, Jacobs-Reitsma WF, Wagenaar JA, Kijlstra A**: Presence of Salmonella and Campylobacter spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:960-962.
34. **Nmorsi OP, Agbozele G, Ukwandu NC**: Some aspects of epidemiology of filth flies: *Musca domestica*, *Musca domestica vicina*, *Drosophila melanogaster* and associated bacteria pathogens in Ekpoma, Nigeria. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007, **7**:107-117.
35. **Scheelings TF, Lightfoot D, Holz P**: Prevalence of Salmonella in Australian reptiles. *J Wildl Dis*, **47**:1-11.
36. **Winfield MD, Groisman EA**: Role of nonhost environments in the lifestyles of Salmonella and Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**:3687-3694.
37. **Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M**: Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 1995, **3**:253-255.
38. **Tauxe RV**: Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis* 1997, **3**:425-434.
39. **Davies RH, Wray C**: Observations on disinfection regimens used on Salmonella enteritidis infected poultry units. *Poult Sci* 1995, **74**:638-647.
40. **Baloda SB, Christensen L, Trajcevska S**: Persistence of a Salmonella enterica serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with Salmonella-contaminated slurry. *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:2859-2862.
41. **Counter DE, Gibson EA**: Salmonella dublin infection in self contained dairy herds in East Anglia: excretion at calving. *Vet Rec* 1980, **107**:191-193.
42. **Brown DJ, Olsen JE, Bisgaard M**: Salmonella enterica: infection, cross infection and persistence within the environment of a broiler parent stock unit in Denmark. *Zentralbl Bakteriol* 1992, **277**:129-138.
43. **Gray JT, Fedorka-Cray PJ, Stabel TJ, Ackermann MR**: Influence of inoculation route on the carrier state of Salmonella choleraesuis in swine. *Vet Microbiol* 1995, **47**:43-59.
44. **Sandvang D, Jensen LB, Baggesen DL, Baloda SB**: 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* 2000, **187**:21-25.
45. **Monaghan P, Shedden CB, Ensor K, Fricker CR, Girdwood RWA**: Salmonella Carriage by Herring-Gulls in the Clyde Area of Scotland in Relation to Their Feeding Ecology. *Journal of Applied Ecology* 1985, **22**:669-680.
46. **Davies RH, Wray C**: Seasonal variations in the isolation of Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Bacillus cereus and Clostridium perfringens from environmental samples. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996, **43**:119-127.

47. **Mian LS, Maag H, Tacal JV:** Isolation of Salmonella from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino County, California. *J Vector Ecol* 2002, **27**:82-85.
48. **Greenberg B, Klowden M:** Enteric bacterial interactions in insects. *Am J Clin Nutr* 1972, **25**:1459-1466.
49. **Cherry WB, Hanks JB, Thomason BM, Murlin AM, Biddle JW, Croom JM:** Salmonellae as an index of pollution of surface waters. *Appl Microbiol* 1972, **24**:334-340.
50. **Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P:** Diversity of Salmonella strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:1544-1552.
51. **Chao WL, Ding RJ, Chen RS:** Survival of pathogenic bacteria in environmental microcosms. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 1987, **20**:339-348.
52. **Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F:** Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev* 2009, **33**:718-738.
53. **Schoeni JL, Glass KA, McDermott JL, Wong AC:** Growth and penetration of Salmonella enteritidis, Salmonella heidelberg and Salmonella typhimurium in eggs. *Int J Food Microbiol* 1995, **24**:385-396.
54. **Enriquez C, Nwachuku N, Gerba CP:** Direct exposure to animal enteric pathogens. *Rev Environ Health* 2001, **16**:117-131.
55. **Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH:** Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2004, **54**:321-332.
56. **Behravesh CB, Ferraro A, Deasy M, 3rd, Dato V, Moll M, Sandt C, Rea NK, Rickert R, Marriott C, Warren K, et al:** Human Salmonella infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008. *Pediatrics*, **126**:477-483.
57. **Sanyal D, Douglas T, Roberts R:** Salmonella infection acquired from reptilian pets. *Arch Dis Child* 1997, **77**:345-346.
58. **Aiken AM, Lane C, Adak GK:** Risk of Salmonella infection with exposure to reptiles in England, 2004-2007. *Euro Surveill*, **15**:19581.
59. **Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE:** Host adapted serotypes of Salmonella enterica. *Epidemiol Infect* 2000, **125**:229-255.
60. **RKI:** Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis). In *RKI-Ratgeber für Ärzte*. Berlin: Robert Koch-Institut; 2011.
61. Summary of notifiable diseases: United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011, **58**:1-100.
62. **Lynch MF, Blanton EM, Bulens S, Polyak C, Vojdani J, Stevenson J, Medalla F, Barzilay E, Joyce K, Barrett T, Mintz ED:** Typhoid fever in the United States, 1999-2006. *JAMA* 2009, **302**:859-865.
63. **Fierer J, Guiney DG:** Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *J Clin Invest* 2001, **107**:775-780.

64. **Wollin R:** A study of invasiveness of different Salmonella serovars based on analysis of the Enter-net database. *Euro Surveill* 2007, **12**:E070927 070923.
65. **al-Nakhli HM, al-Ogaily ZH, Nassar TJ:** Representative Salmonella serovars isolated from poultry and poultry environments in Saudi Arabia. *Rev Sci Tech* 1999, **18**:700-709.
66. **Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, Gheesling LL:** Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2001, **152**:907-909.
67. **Miko A, Guerra B, Schroeter A, Dorn C, Helmuth R:** Molecular characterization of multiresistant d-tartrate-positive Salmonella enterica serovar paratyphi B isolates. *J Clin Microbiol* 2002, **40**:3184-3191.
68. **van Pelt W, van der Zee H, Wannet WJ, van de Giessen AW, Mevius DJ, Bolder NM, Komijn RE, van Duynhoven YT:** Explosive increase of Salmonella Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. *Euro Surveill* 2003, **8**:31-35.
69. **Chart H:** The pathogenicity of strains of Salmonella paratyphi B and Salmonella java. *J Appl Microbiol* 2003, **94**:340-348.
70. **D'Aoust J-Y:** Salmonella. In *Foodborne bacterial pathogens*. Editiert durch Doyle MP. New York: M. Dekker; 1989: 327-445
71. **Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, Medus C, Cronquist A, Angulo FJ:** Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* 2008, **198**:109-114.
72. **Graham SM:** Nontyphoidal salmonellosis in Africa. *Curr Opin Infect Dis*, **23**:409-414.
73. **Cummings KJ, Warnick LD, Elton M, Grohn YT, McDonough PL, Siler JD:** The effect of clinical outbreaks of salmonellosis on the prevalence of fecal Salmonella shedding among dairy cattle in New York. *Foodborne Pathog Dis*, **7**:815-823.
74. **Leonard J, Marshall JK, Moayyedi P:** Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol* 2007, **102**:2047-2056; quiz 2057.
75. **Blaser MJ, Newman LS:** A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis* 1982, **4**:1096-1106.
76. **Fontaine RE, Cohen ML, Martin WT, Vernon TM:** Epidemic salmonellosis from cheddar cheese: surveillance and prevention. *Am J Epidemiol* 1980, **111**:247-253.
77. **Kapperud G, Gustavsen S, Hellesnes I, Hansen AH, Lassen J, Hirn J, Jahkola M, Montenegro MA, Helmuth R:** Outbreak of Salmonella typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *J Clin Microbiol* 1990, **28**:2597-2601.
78. **Vought KJ, Tatini SR:** Salmonella enteritidis contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *J Food Prot* 1998, **61**:5-10.
79. **Cohen JI, Bartlett JA, Corey GR:** Extra-intestinal manifestations of salmonella infections. *Medicine (Baltimore)* 1987, **66**:349-388.
80. **Ternhag A, Torner A, Svensson A, Ekdahl K, Giesecke J:** Short- and long-term effects of bacterial gastrointestinal infections. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:143-148.

81. **Townes JM:** Reactive arthritis after enteric infections in the United States: the problem of definition. *Clin Infect Dis*, **50**:247-254.
82. **Buchwald DS, Blaser MJ:** A review of human salmonellosis: II. Duration of excretion following infection with nontyphi Salmonella. *Rev Infect Dis* 1984, **6**:345-356.
83. **Bohme H, Fruth A, Rabsch W:** Reptile-associated Salmonellosis in Infants in Germany. *Klin Padiatr* 2009, **221**:60-64.
84. **Dixon JM:** Effect of antibiotic treatment on duration of excretion of Salmonella typhimurium by children. *Br Med J* 1965, **2**:1343-1345.
85. **Aserkoff B, Bennett JV:** Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of salmonellae. *N Engl J Med* 1969, **281**:636-640.
86. **Rubenstein AD, Feemster RF, Smith HM:** Salmonellosis as a Public Health Problem in Wartime. *Am J Public Health Nations Health* 1944, **34**:841-853.
87. **Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ:** Typhoid fever. *N Engl J Med* 2002, **347**:1770-1782.
88. **Vogelsang TM, Boe J:** Temporary and chronic carriers of Salmonella typhi and Salmonella paratyphi B. *J Hyg (Lond)* 1948, **46**:252-261.
89. **Schioler H, Christiansen ED, Hoybye G, Rasmussen SN, Greibe J:** Biliary calculi in chronic Salmonella carriers and healthy controls: a controlled study. *Scand J Infect Dis* 1983, **15**:17-19.
90. **Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F:** Non-typhoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 2008, **130**:1-19.
91. **Waldmann KH, Plonait H:** Erkrankungen der Verdauungsorgane und des Abdomens. In *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*. Editiert durch Waldmann KH, Wendt M. Stuttgart: Parey Verlag; 2004: 344-348
92. **Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C:** Salmonella Infections in Pigs. In *Salmonella in domestic animals*. Editiert durch Wray C, Wray A. Wallingford: CABI Publishing; 2000: 191-208
93. **Sojka WJ, Wray C, Shreeve J, Benson AJ:** Incidence of salmonella infection in animals in England and Wales 1968--1974. *J Hyg (Lond)* 1977, **78**:43-56.
94. **Baggensen DL, Christensen J:** Distribution of Salmonella enterica serovars and phage types in Danish pig herds. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. pp. 107-109. Copenhagen; 1997:107-109.
95. **Wilcock BP, Schwartz K:** Salmonellosis. In *Diseases of Swine. Volume 7*. Editiert durch Leman AD, Straw BE, Mengeling WE, D'Allaire S, Taylor DJ. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1992: 570-583
96. **Laval A, Morvan H, Despez G, Corbion B:** Salmonellosis in swine. In *Reports and Communications, Salmonella and Salmonellosis*. Ploufragan/Saint-Brieuc; 1992: 164-175
97. **Selander RK, Beltran P, Smith NH, Helmuth R, Rubin FA, Kopecko DJ, Ferris K, Tall BD, Cravioto A, Musser JM:** Evolutionary genetic relationships of clones of

- Salmonella serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect Immun* 1990, **58**:2262-2275.
98. **Uzzau S, Hovi M, Stocker BA**: 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* 1999, **123**:37-46.
99. **Davies RH, Wray C**: Distribution of Salmonella on 23 pig farms in the UK. In *Proceedings of the 2nd International Symposium on Epidemiology and Control of Salmonella in Pork*. Copenhagen; 1997: 137-141
100. **Ferris KE, Miller DA**: Salmonella serovars from animals and related sources reported during July 1997-June 1998. In *Proceedings Annual Meeting US Animal Health Association*. Minneapolis, Minnesota; 1998: 584-605
101. **Smith HW, Jones JE**: Observations on experimental oral infection with Salmonella dublin in calves and Salmonella choleraesuis in pigs. *J Pathol Bacteriol* 1967, **93**:141-156.
102. **Gutzmann F, Layton H, Simkins K, Jarolmen H**: Influence of antibiotic-supplemented feed on occurrence and persistence of Salmonella typhimurium in experimentally infected swine. *Am J Vet Res* 1976, **37**:649-655.
103. **Loynachan AT, Harris DL**: Dose determination for acute Salmonella infection in pigs. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2753-2755.
104. **Oliveira CJ, Carvalho LF, Garcia TB**: Experimental airborne transmission of Salmonella Agona and Salmonella Typhimurium in weaned pigs. *Epidemiol Infect* 2006, **134**:199-209.
105. **Oliveira CJ, Garcia TB, Carvalho LF, Givisiez PE**: Nose-to-nose transmission of Salmonella Typhimurium between weaned pigs. *Vet Microbiol* 2007, **125**:355-361.
106. **Scherer K, Szabo I, Rosler U, Appel B, Hensel A, Nockler K**: 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* 2008, **71**:699-705.
107. **Klein E**: Über eine epidemische Krankheit der Hühner, verursacht durch einen Bacillus, Bacillus gallinarum. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 1889, **5**:689-693.
108. **Rettger LF**: Fatal septicaemia among young chicks. *New York Medical Journal* 1900, **71**:803-805.
109. **Snoeyenbos GH, Williams JE**: Salmonellosis. In *Diseases of Poultry*. Editiert durch Calnek BW. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1991: 73-99
110. **Barrow PA, Freitas Neto OC**: Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathol*, **40**:1-13.
111. **Chishti MA, Khan MZ, Siddique M**: Incidence of salmonellosis in chicken in and around Faisalabad. *Pakistan Veterinary Journal* 1985, **5**:79-82.
112. **Hossain A, Reisbig MD, Hanson ND**: Plasmid-encoded functions compensate for the biological cost of AmpC overexpression in a clinical isolate of Salmonella typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 2004, **53**:964-970.

113. **Pan Z, Wang X, Zhang X, Geng S, Chen X, Pan W, Cong Q, Liu X, Jiao X:** Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Pullorum isolates in China from 1962 to 2007. *Vet Microbiol* 2009, **136**:387-392.
114. **Kwon YK, Kim A, Kang MS, Her M, Jung BY, Lee KM, Jeong W, An BK, Kwon JH:** Prevalence and characterization of *Salmonella Gallinarum* in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poult Sci*, **89**:236-242.
115. **Sato Y, Sato G, Tuchili L, Pandey GS, Nakajima A, Chimana H, Sinsungwe H:** Status of *Salmonella gallinarum*-pullorum infections in poultry in Zambia. *Avian Dis* 1997, **41**:490-495.
116. **Mbukio IJ, Raji MA, Ameh J, Saidu L, Musa WI, Abdul PA:** Prevalence and seasonality of fowl typhoid disease in Zaria-Kaduna State, Nigeria. *Journal of Bacteriology Research* 2009, **1**:1-5.
117. **Quiroz-Santiago C, Rodas-Suarez OR, Carlos RV, Fernandez FJ, Quinones-Ramirez EI, Vazquez-Salinas C:** Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *J Food Prot* 2009, **72**:1279-1282.
118. **Simko S:** [Incidence of salmonellae in domestic fowl in Slovakia from 1971 to 1980]. *Vet Med (Praha)* 1984, **29**:113-119.
119. **Buchholz PS, Fairbrother A:** Pathogenicity of *Salmonella pullorum* in northern bobwhite quail and mallard ducks. *Avian Dis* 1992, **36**:304-312.
120. **Sharp MW, Laing PW:** *Salmonella pullorum* infection and pheasants. *Vet Rec* 1993, **133**:460.
121. **Butron O, Brightsmith DJ:** Testing for salmonella spp. In released parrots, wild parrots, and domestic fowl in lowland peru. *J Wildl Dis*, **46**:718-723.
122. **Hinz KH, Janssen W, Poppel M:** [*Salmonella gallinarum* biovar *gallinarum* as the cause of a highly acute septicemic disease in adult laying hens kept in battery cages]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1989, **96**:421-423.
123. **Anderson DA:** The 1990-1991 *Salmonella pullorum* outbreak: overview and evaluation. *Animal Health Insight* 1992:1-12.
124. **Salem M, Odor EM, Pope C:** Pullorum disease in Delaware roasters. *Avian Dis* 1992, **36**:1076-1080.
125. **Waltman WD, Horne AM:** Isolation of *Salmonella* from chickens reacting in the pullorum-typhoid agglutination test. *Avian Dis* 1993, **37**:805-810.
126. **Christensen JP, Skov MN, Hinz KH, Bisgaard M:** *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovar *gallinarum* in layers: epidemiological investigations of a recent outbreak in Denmark. *Avian Pathol* 1994, **23**:489-501.
127. **Erbeck DH, McLaughlin BG, Singh SN:** Pullorum disease with unusual signs in two backyard chicken flocks. *Avian Dis* 1993, **37**:895-897.
128. **Wunderwald C, Hoop RK:** Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks. *Avian Pathol* 2002, **31**:157-162.
129. **Anderson LA, Miller DA, Trampel DW:** Epidemiological investigation, cleanup, and eradication of pullorum disease in adult chickens and ducks in two small-farm flocks. *Avian Dis* 2006, **50**:142-147.

130. **Cox NA, Williams JE:** A simplified biochemical system to screen Salmonella isolates from poultry for serotyping. *Poult Sci* 1976, **55**:1968-1971.
131. **Ryll M, Bisgaard M, Christensen JP, Hinz KH:** Differentiation of Salmonella gallinarum and Salmonella pullorum by their whole-cell fatty acid methyl ester profiles. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996, **43**:357-363.
132. **Shivaprasad HL:** Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech* 2000, **19**:405-424.
133. **Snoeyenbos GH:** Pullorum disease. In *Diseases of Poultry. Volume 8*. Editiert durch Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1984: 66–79
134. **Christensen JP, Olsen JE, Bisgaard M:** Ribotypes of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovars gallinarum and pullorum. *Avian Pathol* 1993, **22**:725-738.
135. **Grimont PAD, Weill F:** Antigenic formulae of the Salmonella serovars. vol. 9. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella; 2007.
136. **Beaudette FR:** The possible transmission of fowl typhoid through the egg. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1925, **67**:741-745.
137. **Doyle TM:** The method of transmission of avian typhoid. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1926, **39**:137-140.
138. **Hall WJ, Legenhausen DH, Macdonald AD:** Studies on Fowl Typhoid .1. Nature and Dissemination. *Poultry Science* 1949, **28**:344-362.
139. **Poppe C:** Salmonella infection in the Domestic Fowl. In *Salmonella in Domestic animal*. Editiert durch Wray C, Wray A. Wallingfort: CABI Publishing; 2000: 107-132
140. **Fanelli MJ, Sadler WW, Franti CE, Brownell JR:** Localization of salmonellae within the intestinal tract of chickens. *Avian Dis* 1971, **15**:366-375.
141. **Xu YM, Pearson GR, Hinton M:** The colonization of the alimentary tract and visceral organs of chicks with salmonellas following challenge via the feed: bacteriological findings. *Br Vet J* 1988, **144**:403-410.
142. **Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA:** Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infect Immun* 1994, **62**:4602-4610.
143. **Hart L, Hungerford TG:** Septicaemic Pullorum Disease in a Flock of Adult Fowls. *Australian Veterinary Journal* 1936, **12**:17-20.
144. **Hutt FB, Crawford RD:** On breeding chicks resistant to pullorum disease without exposure thereto. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 1960, **2**:357-370.
145. **Bumstead N, Barrow P:** Resistance to Salmonella gallinarum, S. pullorum, and S. enteritidis in inbred lines of chickens. *Avian Dis* 1993, **37**:189-193.
146. **Gast RK, Beard CW:** Isolation of Salmonella enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis* 1990, **34**:991-993.
147. **El Sergany MA, Mohammed MA:** The pathology of the ovary of fowls naturally and experimentally infected with Salmonella gallinarum-pullorum. *Revue de Médecine Vétérinaire* 1973, **3**:243-249.

148. **Wigley P, Berchieri A, Jr., Page KL, Smith AL, Barrow PA:** Salmonella enterica serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. *Infect Immun* 2001, **69**:7873-7879.
149. **Wigley P, Hulme SD, Powers C, Beal RK, Berchieri A, Jr., Smith A, Barrow P:** Infection of the reproductive tract and eggs with Salmonella enterica serovar pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. *Infect Immun* 2005, **73**:2986-2990.
150. **Bullis KL:** The history of avian medicine in the U.S. III. Salmonellosis. *Avian Dis* 1977, **21**:430-435.
151. **Saeed AM:** *Salmonella enterica Serovar enteritidis in Humans and Animals: Epidemiology, Pathogenesis and Control*. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1999.
152. **Sadler WW, Brownell JR, Fanelli MJ:** Influence of age and inoculum level on shed pattern of Salmonella typhimurium in chickens. *Avian Dis* 1969, **13**:793-803.
153. **Padron M:** Salmonella typhimurium outbreak in broiler chicken flocks in Mexico. *Avian Dis* 1990, **34**:221-223.
154. **Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE:** Invasiveness and persistence of Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, and a genetically defined S. enteritidis aroA strain in young chickens. *Infect Immun* 1994, **62**:4739-4746.
155. **McIlroy SG, McCracken RM, Neill SD, O'Brien JJ:** Control, prevention and eradication of Salmonella enteritidis infection in broiler and broiler breeder flocks. *Vet Rec* 1989, **125**:545-548.
156. **Hinton M, Pearson GR, Threlfall EJ, Rowe B, Woodward M, Wray C:** Experimental Salmonella enteritidis infection in chicks. *Vet Rec* 1989, **124**:223.
157. **Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA, Simpson JM:** Observations on the pathogenesis of experimental Salmonella typhimurium infection in chickens. *Res Vet Sci* 1987, **42**:194-199.
158. **Humphrey TJ, Chart H, Baskerville A, Rowe B:** The influence of age on the response of SPF hens to infection with Salmonella enteritidis PT4. *Epidemiol Infect* 1991, **106**:33-43.
159. **Shen L:** Functional morphology of the gastrointestinal tract. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009, **337**:1-35.
160. **Guarner F:** Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006, **73 Suppl 1**:5-12.
161. **Jedlicka P, Sui X, Sussel L, Gutierrez-Hartmann A:** Ets transcription factors control epithelial maturation and transit and crypt-villus morphogenesis in the mammalian intestine. *Am J Pathol* 2009, **174**:1280-1290.
162. **Karam SM:** Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 1999, **4**:D286-298.
163. **Carraway KL, Hull SR:** Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* 1991, **1**:131-138.
164. **Macfarlane S, Woodmansey EJ, Macfarlane GT:** Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:7483-7492.

165. **McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH:** Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol*, **9**:265-278.
166. **Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL:** Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003, **422**:522-526.
167. **Elphick DA, Mahida YR:** Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 2005, **54**:1802-1809.
168. **Moghaddami M, Cummins A, Mayrhofer G:** Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the Mukosa of the human small intestine. *Gastroenterology* 1998, **115**:1414-1425.
169. **Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, et al:** Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 2002, **168**:57-64.
170. **Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newberry RD:** Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J Immunol* 2003, **170**:5475-5482.
171. **Stokes CR, Bailey M, Wilson AD:** Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet Immunol Immunopathol* 1994, **43**:143-150.
172. **Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J:** Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol* 1980, **125**:2626-2632.
173. **Casteleyn C, Doom M, Lambrechts E, Van den Broeck W, Simoens P, Cornillie P:** Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. *Avian Pathol*, **39**:143-150.
174. **Burns RB, Maxwell MH:** Ultrastructure of Peyer's patches in the domestic fowl and turkey. *J Anat* 1986, **147**:235-243.
175. **Bye WA, Allan CH, Trier JS:** Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 1984, **86**:789-801.
176. **Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP:** Collaboration of epithelial cells with organized Mukosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2001, **2**:1004-1009.
177. **Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W:** Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J Gastroenterol* 2007, **13**:1477-1486.
178. **Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, Niu XD, Chen SC, Manfra DJ, Wiekowski MT, et al:** CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in Mukosal tissue. *Immunity* 2000, **12**:495-503.
179. **Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA:** Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol* 1998, **160**:5815-5825.
180. **Wershil BK, Furuta GT:** 4. Gastrointestinal Mukosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**:S380-383; quiz S415.

181. **Niess JH, Reinecker HC:** Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005, **21**:687-691.
182. **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P:** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001, **2**:361-367.
183. **Mazzucchelli L, Hauser C, Zgraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA, Mueller C:** Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* 1994, **144**:997-1007.
184. **Z'Graggen K, Walz A, Mazzucchelli L, Strieter RM, Mueller C:** The C-X-C chemokine ENA-78 is preferentially expressed in intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997, **113**:808-816.
185. **Kobayashi SD, Voyich JM, Somerville GA, Braughton KR, Malech HL, Musser JM, DeLeo FR:** An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003, **73**:315-322.
186. **El Kebir D, Filep JG:** Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*, **10**:1731-1748.
187. **Dunlap NE, Benjamin WH, Jr., Berry AK, Eldridge JH, Briles DE:** A 'safe-site' for *Salmonella typhimurium* is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb Pathog* 1992, **13**:181-190.
188. **Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W:** Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 2008, **213**:183-191.
189. **Kossack RE, Guerrant RL, Densen P, Schadelin J, Mandell GL:** Diminished neutrophil oxidative metabolism after phagocytosis of virulent *Salmonella typhi*. *Infect Immun* 1981, **31**:674-678.
190. **Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH:** Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003, **424**:88-93.
191. **Yamamoto M, Kweon MN, Rennert PD, Hiroi T, Fujihashi K, McGhee JR, Kiyono H:** Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J Immunol* 2004, **173**:762-769.
192. **Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, Stoklasek T, Yadav R, Williams IR, Gu X, et al:** CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 2006, **24**:623-632.
193. **Hashizume T, Togawa A, Nochi T, Igarashi O, Kweon MN, Kiyono H, Yamamoto M:** Peyer's patches are required for intestinal immunoglobulin A responses to *Salmonella* spp. *Infect Immun* 2008, **76**:927-934.
194. **Crowe PT, Marsh MN:** Morphometric analysis of intestinal Mukosa. VI--Principles in enumerating intra-epithelial lymphocytes. *Virchows Arch* 1994, **424**:301-306.
195. **Poussier P, Julius M:** Maturation of T cells in the intestinal epithelium. *Immunol Today* 1993, **14**:140-141.
196. **Cheroutre H, Madakamutil L:** Acquired and natural memory T cells join forces at the Mukosal front line. *Nat Rev Immunol* 2004, **4**:290-300.

197. **Lundqvist C, Melgar S, Yeung MM, Hammarstrom S, Hammarstrom ML:** Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 1996, **157**:1926-1934.
198. **Chott A, Gerdes D, Spooner A, Mosberger I, Kummer JA, Ebert EC, Blumberg RS, Balk SP:** Intraepithelial lymphocytes in normal human intestine do not express proteins associated with cytolytic function. *Am J Pathol* 1997, **151**:435-442.
199. **Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G:** Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003, **125**:345-356.
200. **Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R:** Protection of the intestinal Mukosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:14338-14343.
201. **Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacheruvu KR, Vaerman JP, Lamm ME:** The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:8796-8800.
202. **Fagarasan S, Honjo T:** Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:63-72.
203. **Rose ME, Orlans E, Payne AW, Hesketh P:** The origin of IgA in chicken bile: its rapid active transport from blood. *Eur J Immunol* 1981, **11**:561-564.
204. **Mestecky J, Russell MW, Elson CO:** Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest Mukosal surface. *Gut* 1999, **44**:2-5.
205. **Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R, Olivo-Marin JC, Sansonetti PJ, Phalipon A:** Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity* 2003, **18**:739-749.
206. **Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA:** Innate secretory antibodies protect against natural Salmonella typhimurium infection. *J Exp Med* 2006, **203**:21-26.
207. **Brandtzaeg P, Farstad IN, Helgeland L:** Phenotypes of T cells in the gut. *Chem Immunol* 1998, **71**:1-26.
208. **Grogan JL, Locksley RM:** T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol* 2002, **14**:366-372.
209. **Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG:** A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997, **389**:737-742.
210. **Mills KH, McGuirk P:** Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol* 2004, **16**:107-117.
211. **Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M:** CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004, **173**:3119-3130.
212. **Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S:** T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 1997, **41**:215-220.

213. **Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone F:** Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 1998, **42**:643-649.
214. **Zeitz M, Quinn TC, Graeff AS, James SP:** Mukosal T cells provide helper function but do not proliferate when stimulated by specific antigen in lymphogranuloma venereum proctitis in nonhuman primates. *Gastroenterology* 1988, **94**:353-366.
215. **Stadnyk AW:** Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 1994, **8**:1041-1047.
216. **Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J:** Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993, **61**:4569-4574.
217. **McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL:** Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993, **123**:895-907.
218. **Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE:** Effects of Salmonella enterica serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, Lactobacillus reuteri and Bacillus licheniformis on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Vet Immunol Immunopathol* 2007, **115**:299-308.
219. **Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF:** A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995, **95**:55-65.
220. **Weinstein DL, O'Neill BL, Metcalf ES:** Salmonella typhi stimulation of human intestinal epithelial cells induces secretion of epithelial cell-derived interleukin-6. *Infect Immun* 1997, **65**:395-404.
221. **Lu H, Shen C, Brunham RC:** Chlamydia trachomatis infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J Immunol* 2000, **165**:1463-1469.
222. **Bahrami B, Macfarlane S, Macfarlane GT:** Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *J Appl Microbiol*, **110**:353-363.
223. **Fantini J, Bolmont C, Yahi N:** Tumor necrosis factor-alpha stimulates both apical and basal production of HIV in polarized human intestinal HT29 cells. *Immunol Lett* 1992, **34**:85-90.
224. **Raitano AB, Korc M:** Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin 1 is associated with enhanced expression of gamma-interferon receptors. *Cancer Res* 1993, **53**:636-640.
225. **Yan SR, Joseph RR, Wang J, Stadnyk AW:** Differential pattern of inflammatory molecule regulation in intestinal epithelial cells stimulated with IL-1. *J Immunol* 2006, **177**:5604-5611.
226. **Phillips JO, Everson MP, Moldoveanu Z, Lue C, Mestecky J:** Synergistic effect of IL-4 and IFN-gamma on the expression of polymeric Ig receptor (secretory component) and IgA binding by human epithelial cells. *J Immunol* 1990, **145**:1740-1744.
227. **Ullmann CD, Schlom J, Greiner JW:** Interleukin-6 increases carcinoembryonic antigen and histocompatibility leukocyte antigen expression on the surface of human colorectal carcinoma cells. *J Immunother (1991)* 1992, **12**:231-241.

228. **Das KM, Squillante L, Robertson FM:** Amplified expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and M(r) 40K protein by DLD-1 colon tumor cells by interferon-gamma. *Cell Immunol* 1993, **147**:215-221.
229. **Mulder KM, Zhong Q, Choi HG, Humphrey LE, Brattain MG:** Inhibitory effects of transforming growth factor beta 1 on mitogenic response, transforming growth factor alpha, and c-myc in quiescent, well-differentiated colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1990, **50**:7581-7586.
230. **Foster SL, Richardson SH, Failla ML:** Elevated iron status increases bacterial invasion and survival and alters cytokine/chemokine mRNA expression in Caco-2 human intestinal cells. *J Nutr* 2001, **131**:1452-1458.
231. **Allez M, Brimnes J, Dotan I, Mayer L:** Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2002, **123**:1516-1526.
232. **Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L:** Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev* 2007, **215**:243-253.
233. **Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM:** The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol*, **300**:41-48.
234. **Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S:** Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000, **47**:79-87.
235. **Borrueel N, Casellas F, Antolin M, Llopis M, Carol M, Espiin E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR:** Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal Mukosa. *Am J Gastroenterol* 2003, **98**:865-870.
236. **Serhan CN, Savill J:** Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005, **6**:1191-1197.
237. **Campbell N, Yio XY, So LP, Li Y, Mayer L:** The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the Mukosal immune system. *Immunol Rev* 1999, **172**:315-324.
238. **Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L:** Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991, **100**:3-12.
239. **Nakazawa A, Watanabe M, Kanai T, Yajima T, Yamazaki M, Ogata H, Ishii H, Azuma M, Hibi T:** Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic Mukosa. *Gastroenterology* 1999, **117**:536-545.
240. **Lee SH, Starkey PM, Gordon S:** Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. *J Exp Med* 1985, **161**:475-489.
241. **Gordon S:** The macrophage. *Bioessays* 1995, **17**:977-986.
242. **Varol C, Landsman L, Fogg DK, Greenshtein L, Gildor B, Margalit R, Kalchenko V, Geissmann F, Jung S:** Monocytes give rise to Mukosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007, **204**:171-180.
243. **Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE:** Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005, **206**:149-159.

244. **Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H:** Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol* 2001, **167**:2651-2656.
245. **Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD:** Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005, **115**:66-75.
246. **Kanai T, Iiyama R, Ishikura T, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Watanabe M:** Role of the innate immune system in the development of chronic colitis. *J Gastroenterol* 2002, **37 Suppl 14**:38-42.
247. **Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H:** Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of Mukosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997, **112**:1493-1505.
248. **Smythies LE, Maheshwari A, Clements R, Eckhoff D, Novak L, Vu HL, Mosteller-Barnum LM, Sellers M, Smith PD:** Mukosal IL-8 and TGF-beta recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 2006, **80**:492-499.
249. **Allison MC, Poulter LW:** Changes in phenotypically distinct Mukosal macrophage populations may be a prerequisite for the development of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1991, **85**:504-509.
250. **Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF:** Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease Mukosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1995, **100**:291-297.
251. **Ulloa L, Doody J, Massague J:** Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 1999, **397**:710-713.
252. **Verrecchia F, Pessah M, Atfi A, Mauviel A:** Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem* 2000, **275**:30226-30231.
253. **Cavaillon JM:** Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 1994, **48**:445-453.
254. **Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G:** Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002, **122**:1987-2000.
255. **Sawada-Hase N, Kiyohara T, Miyagawa J, Ueyama H, Nishibayashi H, Murayama Y, Kashihara T, Nakahara M, Miyazaki Y, Kanayama S, et al:** An increased number of CD40-high monocytes in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000, **95**:1516-1523.
256. **Tessarz AS, Cerwenka A:** The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett* 2008, **116**:111-116.
257. **Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H:** Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect Immun* 1997, **65**:2932-2940.

258. **MacFarlane AS, Schwacha MG, Eisenstein TK:** In vivo blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium*, potentiates *Salmonella* infection, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. *Infect Immun* 1999, **67**:891-898.
259. **Hold GL, Mukhopadhyaya I, Monie TP:** Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clin Dev Immunol*, **2011**:579650.
260. **Raetz CR, Whitfield C:** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:635-700.
261. **Gewurz H, Mergenhagen SE, Nowotny A, Phillips JK:** Interactions of the complement system with native and chemically modified endotoxins. *J Bacteriol* 1968, **95**:397-405.
262. **Reynolds BL, Pruul H:** Protective role of smooth lipopolysaccharide in the serum bactericidal reaction. *Infect Immun* 1971, **4**:764-771.
263. **Rahman MM, Guard-Petter J, Carlson RW:** A virulent isolate of *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella typhi*-like lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1997, **179**:2126-2131.
264. **Guard-Petter J:** Variants of smooth *Salmonella enterica* serovar Enteritidis that grow to higher cell density than the wild type are more virulent. *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**:2166-2172.
265. **Bravo D, Silva C, Carter JA, Hoare A, Alvarez SA, Blondel CJ, Zaldivar M, Valvano MA, Contreras I:** Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of *Salmonella*. *J Med Microbiol* 2008, **57**:938-946.
266. **Mutharia LM, Crockford G, Bogard WC, Jr., Hancock RE:** Monoclonal antibodies specific for *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide: cross-reaction with other gram-negative bacterial species. *Infect Immun* 1984, **45**:631-636.
267. **Alexander C, Rietschel ET:** Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001, **7**:167-202.
268. **Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R:** Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 2001, **276**:34686-34694.
269. **Dziarski R, Gupta D:** Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res* 2005, **11**:304-310.
270. **Girardin SE, Travassos LH, Herve M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D:** Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 2003, **278**:41702-41708.
271. **Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, Merlin D, Schneewind O, Chang EB:** hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 2004, **127**:1401-1409.
272. **Swaan PW, Bensman T, Bahadduri PM, Hall MW, Sarkar A, Bao S, Khantwal CM, Ekins S, Knoell DL:** Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **39**:536-542.

273. **Lee J, Tattoli I, Wojtal KA, Vavricka SR, Philpott DJ, Girardin SE:** pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J Biol Chem* 2009, **284**:23818-23829.
274. **Nigro G, Fazio LL, Martino MC, Rossi G, Tattoli I, Liparoti V, De Castro C, Molinaro A, Philpott DJ, Bernardini ML:** Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* 2008, **10**:682-695.
275. **Goodell EW, Schwarz U:** Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1985, **162**:391-397.
276. **Sinha RK, Rosenthal RS:** Release of soluble peptidoglycan from growing conococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments. *Infect Immun* 1980, **29**:914-925.
277. **Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, et al:** Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004, **5**:1166-1174.
278. **Quintela JC, de Pedro MA, Zollner P, Allmaier G, Garcia-del Portillo F:** Peptidoglycan structure of *Salmonella typhimurium* growing within cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* 1997, **23**:693-704.
279. **Iyer JK, Coggeshall KM:** Cutting edge: primary innate immune cells respond efficiently to polymeric peptidoglycan, but not to peptidoglycan monomers. *J Immunol*, **186**:3841-3845.
280. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A:** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001, **410**:1099-1103.
281. **Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, et al:** Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006, **7**:576-582.
282. **Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A:** Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 2006, **7**:569-575.
283. **Sun YH, Rolan HG, Tsolis RM:** Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Biol Chem* 2007, **282**:33897-33901.
284. **Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL:** Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001, **167**:1882-1885.
285. **Zeng H, Carlson AQ, Guo Y, Yu Y, Collier-Hyams LS, Madara JL, Gewirtz AT, Neish AS:** Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 2003, **171**:3668-3674.
286. **Lyons S, Wang L, Casanova JE, Sitaraman SV, Merlin D, Gewirtz AT:** *Salmonella typhimurium* transcytoses flagellin via an SPI2-mediated vesicular transport pathway. *J Cell Sci* 2004, **117**:5771-5780.
287. **de Zoete MR, Kestra AM, Wagenaar JA, van Putten JP:** Reconstitution of a functional Toll-like receptor 5 binding site in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem*, **285**:12149-12158.

288. **Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM, Jr.:** Helicobacter pylori flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 2004, **189**:1914-1920.
289. **Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C:** Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* 2003, **5**:1345-1356.
290. **Watson RO, Galan JE:** Signal transduction in Campylobacter jejuni-induced cytokine production. *Cell Microbiol* 2005, **7**:655-665.
291. **Winter SE, Raffatellu M, Wilson RP, Russmann H, Baumler AJ:** The Salmonella enterica serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cell Microbiol* 2008, **10**:247-261.
292. **Li J, Smith NH, Nelson K, Crichton PB, Old DC, Whittam TS, Selander RK:** Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *J Med Microbiol* 1993, **38**:129-139.
293. **Kwon HJ, Park KY, Yoo HS, Park JY, Park YH, Kim SJ:** Differentiation of Salmonella enterica serotype gallinarum biotype pullorum from biotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). *J Microbiol Methods* 2000, **40**:33-38.
294. **Gay NJ, Keith FJ:** Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991, **351**:355-356.
295. **Takeda K, Akira S:** TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004, **16**:3-9.
296. **Carpenter S, O'Neill LA:** How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol* 2007, **9**:1891-1901.
297. **Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF:** A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:588-593.
298. **Werling D, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ:** Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol* 2009, **30**:124-130.
299. **Testro AG, Visvanathan K:** Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009, **24**:943-954.
300. **Balaram P, Kien PK, Ismail A:** Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int J Med Microbiol* 2009, **299**:177-185.
301. **Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y:** Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003, **170**:3977-3985.
302. **Hopkins PA, Sriskandan S:** Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005, **140**:395-407.
303. **Zhang G, Ghosh S:** Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002, **277**:7059-7065.
304. **Otte JM, Cario E, Podolsky DK:** Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004, **126**:1054-1070.
305. **Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT:** Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 2004, **10**:406-412.

306. **Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA:** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001, **413**:732-738.
307. **Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S:** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004, **303**:1526-1529.
308. **Blasius AL, Beutler B:** Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, **32**:305-315.
309. **Kawai T, Akira S:** TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006, **13**:816-825.
310. **Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN:** Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001, **69**:1477-1482.
311. **Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ:** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001, **412**:346-351.
312. **Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S:** Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002, **169**:6668-6672.
313. **Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S:** TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003, **4**:1144-1150.
314. **Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S:** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003, **301**:640-643.
315. **Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT:** LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003, **198**:1043-1055.
316. **Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG:** The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006, **7**:1074-1081.
317. **Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S:** Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002, **169**:10-14.
318. **Gazzinelli RT, Denkers EY:** Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:895-906.
319. **Land WG:** Injury to allografts: innate immune pathways to acute and chronic rejection. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005, **16**:520-539.
320. **Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S:** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000, **408**:740-745.
321. **Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M:** TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004, **21**:107-119.

322. **Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A:** Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* 2004, **172**:4463-4469.
323. **Kumar H, Kawai T, Akira S:** Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, **30**:16-34.
324. **Creagh EM, O'Neill LA:** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006, **27**:352-357.
325. **Kufer TA:** Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors. *Mol Biosyst* 2008, **4**:380-386.
326. **Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G:** Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 2007, **27**:549-559.
327. **Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ:** Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* 2003, **5**:581-592.
328. **Le Bourhis L, Magalhaes JG, Selvanantham T, Travassos LH, Geddes K, Fritz JH, Viala J, Tedin K, Girardin SE, Philpott DJ:** Role of Nod1 in Mukosal dendritic cells during Salmonella pathogenicity island 1-independent Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2009, **77**:4480-4486.
329. **Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK:** CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003, **124**:993-1000.
330. **Lightfield KL, Persson J, Trinidad NJ, Brubaker SW, Kofoed EM, Sauer JD, Dunipace EA, Warren SE, Miao EA, Vance RE:** Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infect Immun*, **79**:1606-1614.
331. **Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM:** Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004, **430**:213-218.
332. **Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Flavell RA, Galan JE:** Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis. *J Exp Med* 2006, **203**:1407-1412.
333. **Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM:** Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J Exp Med*, **207**:1745-1755.
334. **Spehlmann ME, Eckmann L:** Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, **25**:92-99.
335. **Neumann M, Naumann M:** Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* 2007, **21**:2642-2654.
336. **Karin M:** How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999, **18**:6867-6874.
337. **Pahl HL:** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999, **18**:6853-6866.
338. **Natoli G:** Tuning up inflammation: how DNA sequence and chromatin organization control the induction of inflammatory genes by NF-kappaB. *FEBS Lett* 2006, **580**:2843-2849.

339. **Naumann M, Wessler S, Bartsch C, Wieland B, Meyer TF:** Neisseria gonorrhoeae epithelial cell interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB and activator protein 1 and the induction of inflammatory cytokines. *J Exp Med* 1997, **186**:247-258.
340. **Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA, et al:** An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008, **320**:226-230.
341. **Egan LJ, Eckmann L, Greten FR, Chae S, Li ZW, Myhre GM, Robine S, Karin M, Kagnoff MF:** IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:2452-2457.
342. **Steinbrecher KA, Harmel-Laws E, Sitcheran R, Baldwin AS:** Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol* 2008, **180**:2588-2599.
343. **Vijay-Kumar M, Wu H, Jones R, Grant G, Babbitt B, King TP, Kelly D, Gewirtz AT, Neish AS:** Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am J Pathol* 2006, **169**:1686-1700.
344. **Palmer LE, Hobbie S, Galan JE, Bliska JB:** YopJ of Yersinia pseudotuberculosis is required for the inhibition of macrophage TNF-alpha production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol Microbiol* 1998, **27**:953-965.
345. **Schesser K, Spiik AK, Dukuzumuremyi JM, Neurath MF, Pettersson S, Wolf-Watz H:** The yopJ locus is required for Yersinia-mediated inhibition of NF-kappaB activation and cytokine expression: YopJ contains a eukaryotic SH2-like domain that is essential for its repressive activity. *Mol Microbiol* 1998, **28**:1067-1079.
346. **Schesser K, Dukuzumuremyi JM, Cilio C, Borg S, Wallis TS, Pettersson S, Galyov EE:** The Salmonella YopJ-homologue AvrA does not possess YopJ-like activity. *Microb Pathog* 2000, **28**:59-70.
347. **Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, Madara JL, Orth K, Neish AS:** Cutting edge: Salmonella AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2002, **169**:2846-2850.
348. **Du F, Galan JE:** Selective inhibition of type III secretion activated signaling by the Salmonella effector AvrA. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000595.
349. **Le Negrate G, Faustin B, Welsh K, Loeffler M, Krajewska M, Hasegawa P, Mukherjee S, Orth K, Krajewski S, Godzik A, et al:** Salmonella secreted factor L deubiquitinase of Salmonella typhimurium inhibits NF-kappaB, suppresses IkappaBalpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J Immunol* 2008, **180**:5045-5056.
350. **Murphy KM, Travers P, Walport M:** *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
351. **Eckmann L, Smith JR, Housley MP, Dwinell MB, Kagnoff MF:** Analysis by high density cDNA arrays of altered gene expression in human intestinal epithelial cells in response to infection with the invasive enteric bacteria Salmonella. *J Biol Chem* 2000, **275**:14084-14094.

352. **Eckmann L, Kagnoff MF:** Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect* 2001, **3**:1191-1200.
353. **Zlotnik A, Yoshie O:** Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000, **12**:121-127.
354. **Nauciel C, Espinasse-Maes F:** Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* 1992, **60**:450-454.
355. **Jouanguy E, Doffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL:** IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol* 1999, **11**:346-351.
356. **Caron G, Duluc D, Fremaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y:** Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2005, **175**:1551-1557.
357. **Stockbruegger RW:** Bacterial overgrowth as a consequence of reduced gastric acidity. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985, **111**:7-16.
358. **Cunningham R, Dale B, Undy B, Gaunt N:** Proton pump inhibitors as a risk factor for Clostridium difficile diarrhoea. *J Hosp Infect* 2003, **54**:243-245.
359. **Canani RB, Cirillo P, Roggero P, Romano C, Malamisura B, Terrin G, Passariello A, Manguso F, Morelli L, Guarino A:** Therapy with gastric acidity inhibitors increases the risk of acute gastroenteritis and community-acquired pneumonia in children. *Pediatrics* 2006, **117**:e817-820.
360. **Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H:** Stomach NO synthesis. *Nature* 1994, **368**:502.
361. **Dykhuisen RS, Frazer R, Duncan C, Smith CC, Golden M, Benjamin N, Leifert C:** Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defense. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:1422-1425.
362. **Foster JW, Hall HK:** Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium. *J Bacteriol* 1990, **172**:771-778.
363. **Foster JW:** The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* 1993, **175**:1981-1987.
364. **Lee IS, Lin J, Hall HK, Bearson B, Foster JW:** The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* 1995, **17**:155-167.
365. **Hall HK, Foster JW:** The role of fur in the acid tolerance response of Salmonella typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* 1996, **178**:5683-5691.
366. **Bearson BL, Wilson L, Foster JW:** A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 1998, **180**:2409-2417.
367. **Bang IS, Kim BH, Foster JW, Park YK:** OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol* 2000, **182**:2245-2252.

368. **Bourret TJ, Porwollik S, McClelland M, Zhao R, Greco T, Ischiropoulos H, Vazquez-Torres A:** Nitric oxide antagonizes the acid tolerance response that protects *Salmonella* against innate gastric defenses. *PLoS One* 2008, **3**:e1833.
369. **Carter PB, Collins FM:** The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* 1974, **139**:1189-1203.
370. **Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR:** Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1992, **60**:1786-1792.
371. **Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ:** Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* 1992, **118**:929-936.
372. **Prouty AM, Brodsky IE, Manos J, Belas R, Falkow S, Gunn JS:** Transcriptional regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004, **41**:177-185.
373. **Santaolalla R, Fukata M, Abreu MT:** Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*, **27**:125-131.
374. **Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL:** Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000, **47**:646-652.
375. **O'Hara AM, Shanahan F:** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006, **7**:688-693.
376. **Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penades JR, Lasa I:** BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 2005, **58**:1322-1339.
377. **Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD, Hensel M:** *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 2007, **9**:1834-1850.
378. **Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F:** Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1996, **64**:1862-1865.
379. **Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Baumler AJ:** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* 2002, **43**:895-905.
380. **Wagner C, Hensel M:** Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol*, **715**:17-34.
381. **Kukkonen M, Raunio T, Virkola R, Lahteenmaki K, Makela PH, Klemm P, Clegg S, Korhonen TK:** Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol* 1993, **7**:229-237.
382. **Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW:** Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J Bacteriol* 1993, **175**:12-18.
383. **Dorsey CW, Laarakker MC, Humphries AD, Weening EH, Baumler AJ:** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* 2005, **57**:196-211.

-
- 384. Edwards RA, Olsen GJ, Maloy SR:** Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol* 2002, **10**:94-99.
- 385. Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE:** Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infect Immun* 2003, **71**:6446-6452.
- 386. Baumler AJ, Tsois RM, Heffron F:** The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:279-283.
- 387. Baumler AJ, Tsois RM, Heffron F:** Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv Exp Med Biol* 1997, **412**:149-158.
- 388. Sukupolvi S, Lorenz RG, Gordon JI, Bian Z, Pfeifer JD, Normark SJ, Rhen M:** Expression of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella typhimurium* SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1997, **65**:5320-5325.
- 389. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC:** Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999, **401**:804-808.
- 390. Jones BD, Ghorri N, Falkow S:** *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994, **180**:15-23.
- 391. Neutra MR, Kraehenbuhl JP:** Transepithelial transport and Mukosal defence I: the role of M cells. *Trends Cell Biol* 1992, **2**:134-138.
- 392. Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL, Galan JE:** Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1994, **76**:717-724.
- 393. Galan JE:** Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, **209**:43-60.
- 394. Hansen-Wester I, Hensel M:** *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001, **3**:549-559.
- 395. Kimbrough TG, Miller SI:** Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:11008-11013.
- 396. Kimbrough TG, Miller SI:** Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* 2002, **4**:75-82.
- 397. Miao EA, Miller SI:** A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:7539-7544.
- 398. Lee SH, Galan JE:** *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* 2004, **51**:483-495.
- 399. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE:** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998, **93**:815-826.

400. **Bakshi CS, Singh VP, Wood MW, Jones PW, Wallis TS, Galyov EE:** Identification of SopE2, a Salmonella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 2000, **182**:2341-2344.
401. **Zhou D, Chen LM, Hernandez L, Shears SB, Galan JE:** A Salmonella inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 2001, **39**:248-259.
402. **Hayward RD, Koronakis V:** Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella. *EMBO J* 1999, **18**:4926-4934.
403. **Zhou D, Mooseker MS, Galan JE:** Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 1999, **283**:2092-2095.
404. **Takeuchi A:** Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am J Pathol* 1967, **50**:109-136.
405. **Bakowski MA, Cirulis JT, Brown NF, Finlay BB, Brummell JH:** SopD acts cooperatively with SopB during Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* 2007, **9**:2839-2855.
406. **Fu Y, Galan JE:** The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998, **27**:359-368.
407. **Kubori T, Galan JE:** Temporal regulation of salmonella virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* 2003, **115**:333-342.
408. **Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL:** Rapid disruption of epithelial barrier function by Salmonella typhimurium is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun* 1995, **63**:356-359.
409. **Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S, Wallis TS:** A secreted effector protein of Salmonella dublin is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal Mucosa. *Mol Microbiol* 1997, **25**:903-912.
410. **Eckmann L, Rudolf MT, Ptasznik A, Schultz C, Jiang T, Wolfson N, Tsien R, Fierer J, Shears SB, Kagnoff MF, Traynor-Kaplan AE:** D-myo-Inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to Salmonella invasion inhibits phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:14456-14460.
411. **Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW:** SopB, a protein required for virulence of Salmonella dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:14057-14059.
412. **Hashim S, Mukherjee K, Raje M, Basu SK, Mukhopadhyay A:** Live Salmonella modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* 2000, **275**:16281-16288.
413. **Drecktrah D, Knodler LA, Howe D, Steele-Mortimer O:** Salmonella trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic* 2007, **8**:212-225.

414. **Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB:** Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1999, **1**:33-49.
415. **Smith AC, Cirulis JT, Casanova JE, Scidmore MA, Brumell JH:** Interaction of the Salmonella-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J Biol Chem* 2005, **280**:24634-24641.
416. **Garcia-del Portillo F, Finlay BB:** Targeting of Salmonella typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* 1995, **129**:81-97.
417. **Meresse S, Steele-Mortimer O, Finlay BB, Gorvel JP:** The rab7 GTPase controls the maturation of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in HeLa cells. *EMBO J* 1999, **18**:4394-4403.
418. **Meena LS, Rajni:** Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Febs J*, **277**:2416-2427.
419. **Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S:** Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages. *Infect Immun* 1996, **64**:2765-2773.
420. **Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI:** Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:10079-10083.
421. **Vescovi EG, Ayala YM, Di Cera E, Groisman EA:** Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Biol Chem* 1997, **272**:1440-1443.
422. **Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S:** Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell* 2006, **17**:498-510.
423. **Prost LR, Sanowar S, Miller SI:** Salmonella sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev* 2007, **219**:55-65.
424. **Steele-Mortimer O, St-Louis M, Olivier M, Finlay BB:** Vacuole acidification is not required for survival of Salmonella enterica serovar typhimurium within cultured macrophages and epithelial cells. *Infect Immun* 2000, **68**:5401-5404.
425. **Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC:** Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol Microbiol* 2003, **47**:103-118.
426. **Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI:** Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. *Science* 1997, **276**:250-253.
427. **Gibbons HS, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CR:** Role of Mg²⁺ and pH in the modification of Salmonella lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. *Mol Microbiol* 2005, **55**:425-440.
428. **Ernst RK, Guina T, Miller SI:** Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* 2001, **3**:1327-1334.

429. **Adams P, Fowler R, Kinsella N, Howell G, Farris M, Coote P, O'Connor CD:** Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of Salmonella motility. *Proteomics* 2001, **1**:597-607.
430. **Muller SI, Valdebenito M, Hantke K:** Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of Salmonella. *Biometals* 2009, **22**:691-695.
431. **Blanc-Potard AB, Groisman EA:** The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J* 1997, **16**:5376-5385.
432. **Papp-Wallace KM, Maguire ME:** Regulation of CorA Mg²⁺ channel function affects the virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium. *J Bacteriol* 2008, **190**:6509-6516.
433. **Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A:** High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of Salmonella enterica. *Infect Immun* 2007, **75**:5867-5876.
434. **Parra-Lopez C, Lin R, Aspedon A, Groisman EA:** A Salmonella protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *EMBO J* 1994, **13**:3964-3972.
435. **Haraga A, Ohlson MB, Miller SI:** Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:53-66.
436. **Kuhle V, Hensel M:** SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell Microbiol* 2002, **4**:813-824.
437. **Salcedo SP, Holden DW:** SseG, a virulence protein that targets Salmonella to the Golgi network. *EMBO J* 2003, **22**:5003-5014.
438. **Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW, Meresse S:** The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* 2006, **74**:6965-6972.
439. **Abrahams GL, Hensel M:** Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular Salmonella enterica and its host cells. *Cell Microbiol* 2006, **8**:728-737.
440. **Garcia-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB:** Salmonella induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:10544-10548.
441. **Drecktrah D, Levine-Wilkinson S, Dam T, Winfree S, Knodler LA, Schroer TA, Steele-Mortimer O:** Dynamic behavior of Salmonella-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* 2008, **9**:2117-2129.
442. **Brumell JH, Goosney DL, Finlay BB:** SifA, a type III secreted effector of Salmonella typhimurium, directs Salmonella-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic* 2002, **3**:407-415.
443. **Beuzon CR, Meresse S, Unsworth KE, Ruiz-Albert J, Garvis S, Waterman SR, Ryder TA, Boucrot E, Holden DW:** Salmonella maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 2000, **19**:3235-3249.

444. **Koupal LR, Deibel RH:** Assay, characterization, and localization of an enterotoxin produced by Salmonella. *Infect Immun* 1975, **11**:14-22.
445. **Chopra AK, Houston CW, Peterson JW, Prasad R, Mekalanos JJ:** Cloning and expression of the Salmonella enterotoxin gene. *J Bacteriol* 1987, **169**:5095-5100.
446. **Dinjus U, Hanel I, Muller W, Bauerfeind R, Helmuth R:** Detection of the induction of Salmonella enterotoxin gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 1997, **146**:175-179.
447. **Rahman H:** Prevalence of enterotoxin gene (stn) among different serovars of Salmonella. *Indian J Med Res* 1999, **110**:43-46.
448. **Watson PR, Galyov EE, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS:** Mutation of invH, but not stn, reduces Salmonella-induced enteritis in cattle. *Infect Immun* 1998, **66**:1432-1438.
449. **Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S:** Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:9833-9838.
450. **Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthoft T, Kagnoff MF:** Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* 1998, **102**:1815-1823.
451. **Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A:** The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:2396-2401.
452. **Brennan MA, Cookson BT:** Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 2000, **38**:31-40.
453. **Fink SL, Cookson BT:** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005, **73**:1907-1916.
454. **Paesold G, Guiney DG, Eckmann L, Kagnoff MF:** Genes in the Salmonella pathogenicity island 2 and the Salmonella virulence plasmid are essential for Salmonella-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002, **4**:771-781.
455. **Dreher D, Kok M, Obregon C, Kiama SG, Gehr P, Nicod LP:** Salmonella virulence factor SipB induces activation and release of IL-18 in human dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2002, **72**:743-751.
456. **van der Velden AW, Velasquez M, Starnbach MN:** Salmonella rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* 2003, **171**:6742-6749.
457. **Guiney DG:** The role of host cell death in Salmonella infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005, **289**:131-150.
458. **McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL:** Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1995, **63**:2302-2309.
459. **Tsolis RM, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ:** Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 1999, **67**:4879-4885.

460. **Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymenis H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsohis RM, Adams LG, Baumler AJ:** Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003, **71**:1-12.
461. **Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI:** *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 1994, **179**:601-608.
462. **Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S:** Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol Lett* 1994, **124**:1-9.
463. **Taira S, Heiskanen P, Hurme R, Heikkila H, Riikonen P, Rhen M:** Evidence for functional polymorphism of the *spvR* gene regulating virulence gene expression in *Salmonella*. *Mol Gen Genet* 1995, **246**:437-444.
464. **Montenegro MA, Morelli G, Helmuth R:** Heteroduplex analysis of *Salmonella* virulence plasmids and their prevalence in isolates of defined sources. *Microb Pathog* 1991, **11**:391-397.
465. **Helmuth R, Stephan R, Bunge C, Hoog B, Steinbeck A, Bulling E:** Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 1985, **48**:175-182.
466. **Heiskanen P, Taira S, Rhen M:** Role of *rpoS* in the regulation of *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994, **123**:125-130.
467. **Guiney DG, Libby S, Fang FC, Krause M, Fierer J:** Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol* 1995, **3**:275-279.
468. **Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, Binns MM:** Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 1987, **55**:388-392.
469. **Libby SJ, Adams LG, Ficht TA, Allen C, Whitford HA, Buchmeier NA, Bossie S, Guiney DG:** The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect Immun* 1997, **65**:1786-1792.
470. **Kowarz L, Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F:** The *Salmonella typhimurium katF* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J Bacteriol* 1994, **176**:6852-6860.
471. **Guilloteau LA, Wallis TS, Gautier AV, MacIntyre S, Platt DJ, Lax AJ:** The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect Immun* 1996, **64**:3385-3393.
472. **Hackett J, Wyk P, Reeves P, Mathan V:** Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J Infect Dis* 1987, **155**:540-549.
473. **Friedrich MJ, Kinsey NE, Vila J, Kadner RJ:** Nucleotide sequence of a 13.9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. *Mol Microbiol* 1993, **8**:543-558.
474. **Woodward MJ, Allen-Vercoe E, Redstone JS:** Distribution, gene sequence and expression in vivo of the plasmid encoded fimbrial antigen of *Salmonella* serotype Enteritidis. *Epidemiol Infect* 1996, **117**:17-28.

475. **Rychlik I, Lovell MA, Barrow PA:** The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* and *faeI* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998, **159**:255-260.
476. **Baumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG:** Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 1998, **66**:4579-4587.
477. **Steinbach G, Helmuth R, Koch H, Methner U, Meyer H:** Importance of the serovar-specific plasmid for virulence of salmonella strains in calves. *Zentralbl Bakteriol* 1997, **286**:371-382.
478. **Barrow PA, Lovell MA:** Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. *Infect Immun* 1989, **57**:3136-3141.
479. **Haghjoo E, Galan JE:** *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:4614-4619.
480. **Spano S, Ugalde JE, Galan JE:** Delivery of a *Salmonella Typhi* exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 2008, **3**:30-38.
481. **Grossman N, Joiner KA, Frank MM, Leive L:** C3b binding, but not its breakdown, is affected by the structure of the O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide from *Salmonellae*. *J Immunol* 1986, **136**:2208-2215.
482. **Collins FM:** Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl alcohol-killed vaccines. *J Bacteriol* 1969, **97**:676-683.
483. **Chadfield MS, Brown DJ, Aabo S, Christensen JP, Olsen JE:** Comparison of intestinal invasion and macrophage response of *Salmonella Gallinarum* and other host-adapted *Salmonella enterica* serovars in the avian host. *Vet Microbiol* 2003, **92**:49-64.
484. **Bolton AJ, Osborne MP, Wallis TS, Stephen J:** Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum in vivo. *Microbiology* 1999, **145 (Pt 9)**:2431-2441.
485. **Uzzau S, Leori GS, Petrucci V, Watson PR, Schianchi G, Bacciu D, Mazzarello V, Wallis TS, Rubino S:** *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infect Immun* 2001, **69**:3092-3099.
486. **Sundstrom C, Nilsson K:** Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976, **17**:565-577.
487. **Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K:** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980, **26**:171-176.
488. **Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ, Trujillo JM:** Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 1976, **36**:467-475.
489. **Jumarie C, Malo C:** Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 1991, **149**:24-33.
490. **Weingartl HM, Sabara M, Pasick J, van Moorlehem E, Babiuk L:** Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility. *J Virol Methods* 2002, **104**:203-216.

491. **Berschneider HM:** In *Abstract of the annual meeting of the American Gastroenterological Association*; 1989.
492. **Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, et al:** Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 2006, **125**:293-305.
493. **Brosnahan AJ, Brown DR:** Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Vet Microbiol* 2011.
494. **Beug H, von Kirchbach A, Doderlein G, Conscience JF, Graf T:** Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* 1979, **18**:375-390.
495. **Qureshi MA, Miller L, Lillehoj HS, Ficken MD:** Establishment and characterization of a chicken mononuclear cell line. *Vet Immunol Immunopathol* 1990, **26**:237-250.
496. **Fan X, Sibalic V, Niederer E, Wuthrich RP:** The proinflammatory cytokine interleukin-12 occurs as a cell membrane-bound form on macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **225**:1063-1067.
497. **Huang ZL, Failla ML:** Copper deficiency suppresses effector activities of differentiated U937 cells. *J Nutr* 2000, **130**:1536-1542.
498. **Pedrinaci S, Ruiz-Cabello F, Gomez O, Collado A, Garrido F:** Protein kinase C-mediated regulation of the expression of CD14 and CD11/CD18 in U937 cells. *Int J Cancer* 1990, **45**:294-298.
499. **Schiller C, Spittler A, Willheim M, Szepefalusi Z, Agis H, Koller M, Peterlik M, Boltz-Nitulescu G:** Influence of suramin on the expression of Fc receptors and other markers on human monocytes and U937 cells, and on their phagocytic properties. *Immunology* 1994, **81**:598-604.
500. **Chen YH, Bock G, Vornhagen R, Steindl F, Katinger H, Dierich MP:** HIV-1 gp41 enhances major histocompatibility complex class I and ICAM-1 expression on H9 and U937 cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1994, **104**:227-231.
501. **Spittler A, Willheim M, Leutmezer F, Ohler R, Krugluger W, Reissner C, Lucas T, Brodowicz T, Roth E, Boltz-Nitulescu G:** Effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines on the expression of MHC antigens, complement receptors and other antigens on human blood monocytes and U937 cells: role in cell differentiation, activation and phagocytosis. *Immunology* 1997, **90**:286-293.
502. **Xiong F, Wang XB, Zhang JH, Liu W, Sun S, Liu LQ, Wang P, Huang SA:** [Expression and role of toll-like receptors in U937 cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007, **15**:449-453.
503. **Chavez-Sanchez L, Madrid-Miller A, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Tesoro-Cruz E, Blanco-Favela F:** Activation of TLR2 and TLR4 by minimally modified low-density lipoprotein in human macrophages and monocytes triggers the inflammatory response. *Hum Immunol* 2010, **71**:737-744.
504. **Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL, Misfeldt ML:** Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am J Reprod Immunol* 2004, **52**:67-73.
505. **Kim HG, Kim NR, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, Kim JY, Han SH, Chung DK:** Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits

- lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol* 2008, **180**:2553-2561.
- 506. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF:** Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun* 2004, **72**:1487-1495.
- 507. Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S:** Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* 1996, **397**:269-272.
- 508. Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke AC, Zahlten J, Slevogt H, N'Guessan P D, Gunther S, Schmeck B, Hippenstiel S, et al:** NAIP and Ipaf control Legionella pneumophila replication in human cells. *J Immunol* 2008, **180**:6808-6815.
- 509. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, Sugawara S, Takada H:** Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol* 2005, **7**:53-61.
- 510. Fleit HB, Kobasiuk CD:** The human monocyte-like cell line THP-1 expresses Fc gamma RI and Fc gamma RII. *J Leukoc Biol* 1991, **49**:556-565.
- 511. Tamai R, Sugawara S, Takeuchi O, Akira S, Takada H:** Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. *J Endotoxin Res* 2003, **9**:145-153.
- 512. Hijiya N, Miyake K, Akashi S, Matsuura K, Higuchi Y, Yamamoto S:** Possible involvement of toll-like receptor 4 in endothelial cell activation of larger vessels in response to lipopolysaccharide. *Pathobiology* 2002, **70**:18-25.
- 513. Akhtar M, Watson JL, Nazli A, McKay DM:** Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J* 2003, **17**:1319-1321.
- 514. Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I:** High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* 2008, **57**:3090-3098.
- 515. Cho HY, Choi EK, Lee SW, Kim KH, Park SJ, Lee CK:** All-trans retinoic acid induces TLR-5 expression and cell differentiation and promotes flagellin-mediated cell functions in human THP-1 cells. *Immunol Lett* 2011, **136**:97-107.
- 516. Abdul M, Hoosein N:** Relationship of the interleukin-1 system with neuroendocrine and exocrine markers in human colon cancer cell lines. *Cytokine* 2002, **18**:86-91.
- 517. Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, Itoh H, Saito S, Kobayashi N, Yagi T, Tanaka N:** Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. *J Int Med Res* 2001, **29**:409-420.
- 518. Abreu MT:** Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010, **10**:131-144.
- 519. Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N:** Impaired expression of proteasome

- subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2003, **18**:32-40.
- 520. Volf J, Boyen F, Faldyna M, Pavlova B, Navratilova J, Rychlik I:** Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella enterica* serovar typhimurium and its hilA and ssrA mutants. *Zoonoses Public Health* 2007, **54**:286-293.
- 521. Rupa P, Monedero V, Wilkie BN:** Expression of bioactive porcine interferon-gamma by recombinant *Lactococcus lactis*. *Vet Microbiol* 2008, **129**:197-202.
- 522. Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE:** Effects of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, **111**:199-209.
- 523. Arce C, Ramirez-Boo M, Lucena C, Garrido JJ:** 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* 2010, **33**:161-174.
- 524. Devriendt B, Stuyven E, Verdonck F, Goddeeris BM, Cox E:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. *Dev Comp Immunol* 2010, **34**:1175-1182.
- 525. Burkey TE, Skjolaas KA, Dritz SS, Minton JE:** 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* 2009, **130**:96-101.
- 526. Mariani V, Palermo S, Fiorentini S, Lanubile A, Giuffra E:** Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol* 2009, **131**:278-284.
- 527. Laurent F, Mancassola R, Lacroix S, Menezes R, Naciri M:** Analysis of chicken Mukosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect Immun* 2001, **69**:2527-2534.
- 528. Gyorfy Z, Ohnemus A, Kaspers B, Duda E, Staeheli P:** Truncated chicken interleukin-1beta with increased biologic activity. *J Interferon Cytokine Res* 2003, **23**:223-228.
- 529. Lam KM:** *Mycoplasma gallisepticum*--induced alterations in cytokine genes in chicken cells and embryos. *Avian Dis* 2004, **48**:215-219.
- 530. Hussain I, Qureshi MA:** Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poult Sci* 1997, **76**:1524-1530.
- 531. Cieszynski JA, Qureshi MA, Taylor RL, Jr.:** Calcium dependency of interleukin-1 secretion by a chicken macrophage cell line. *Poult Sci* 1999, **78**:70-74.
- 532. Dil N, Qureshi MA:** Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor kappa B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **88**:149-161.
- 533. Lavric M, Bencina D, Kothlow S, Kaspers B, Narat M:** *Mycoplasma synoviae* lipoprotein MSPB, the N-terminal part of VIhA haemagglutinin, induces secretion of nitric oxide, IL-6 and IL-1beta in chicken macrophages. *Vet Microbiol* 2007, **121**:278-287.

534. **Ikeda JS, Schmitt CK, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, Adams P, O'Connor CD, O'Brien AD:** Flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. *Infect Immun* 2001, **69**:3021-3030.
535. **Datsenko KA, Wanner BL:** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640-6645.
536. **Cherepanov PP, Wackernagel W:** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995, **158**:9-14.
537. **Schmieger H:** Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* 1972, **119**:75-88.
538. **Shervington A, Patel R:** Differential hTERT mRNA processing between young and older glioma patients. *FEBS Lett* 2008, **582**:1707-1710.
539. **Pichowski JS, Cumberbatch M, Dearman, Basketter DA, Kimber I:** Investigation of induced changes in interleukin 1beta mRNA expression by cultured human dendritic cells as an in vitro approach to skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 2000, **14**:351-360.
540. **Salinthon S, Singer CA, Gerthoffer WT:** Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **287**:G627-637.
541. **Kapitein B, Tiemessen MM, Liu WM, van Ieperen-van Dijk AG, Hoekstra MO, van Hoffen E, Knol EF:** The interleukin-10 inducing effect of transforming growth factor-beta on human naive CD4+ T cells from cord blood is restricted to the TH1 subset. *Clin Exp Immunol* 2007, **147**:352-358.
542. **Di Sabatino A, Pickard KM, Gordon JN, Salvati V, Mazzarella G, Beattie RM, Vossenkaemper A, Rovedatti L, Leakey NA, Croft NM, et al:** Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology* 2007, **133**:1175-1187.
543. **Rautenschlein S, von Samson-Himmelstjerna G, Haase C:** A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Vet Immunol Immunopathol* 2007, **115**:251-260.
544. **Sambrook J, Russell DW:** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
545. **Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccarini M:** Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 1999, **181**:3433-3437.
546. **Kusters JG, Mulders-Kremers GA, van Doornik CE, van der Zeijst BA:** 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* 1993, **61**:5013-5020.
547. **Molina NC, Peterson JW:** Cholera toxin-like toxin released by *Salmonella* species in the presence of mitomycin C. *Infect Immun* 1980, **30**:224-230.

548. **Lesnick ML, Guiney DG:** The best defense is a good offense--Salmonella deploys an ADP-ribosylating toxin. *Trends Microbiol* 2001, **9**:2-4; discussion 4-5.
549. **Hernandez LD, Pypaert M, Flavell RA, Galan JE:** A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol* 2003, **163**:1123-1131.
550. **Vaux DL, Cory S, Adams JM:** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988, **335**:440-442.
551. **Harris CC:** Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996, **88**:1442-1455.
552. **Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM:** Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:259-268.
553. **Legrand-Poels S, Maniglia S, Boelaert JR, Piette J:** Activation of the transcription factor NF-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated U937 cells. *Biochem Pharmacol* 1997, **53**:339-346.
554. **Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nunez G:** NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* 2008, **20**:377-382.
555. **van Asten FJ, Hendriks HG, Koninkx JF, van Dijk JE:** Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for Salmonella serotype Enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. *Int J Med Microbiol* 2004, **294**:395-399.
556. **Iida K, Hirota Y, Schwarz U:** Mutants of Escherichia coli defective in penicillin-insensitive murein DD-endopeptidase. *Mol Gen Genet* 1983, **189**:215-221.
557. **Firczuk M, Bochtler M:** Mutational analysis of peptidoglycan amidase MepA. *Biochemistry* 2007, **46**:120-128.
558. **Cheng Q, Park JT:** Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J Bacteriol* 2002, **184**:6434-6436.
559. **Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT:** Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J* 1994, **13**:4684-4694.
560. **Park JT, Raychaudhuri D, Li H, Normark S, Mengin-Lecreux D:** MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J Bacteriol* 1998, **180**:1215-1223.
561. **Kunsch C, Rosen CA:** NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 1993, **13**:6137-6146.
562. **Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, de Veer MJ, DiDonato JA:** Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* 2004, **4**:33.
563. **Breithaupt U:** Genexpressionsanalysen der frühen angeborenen Immunantwort des Haushuhns induziert durch eine Infektion mit Salmonella enteritidis mit Hilfe der Microarray Technologie. *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität, Tierärztliche Fakultät; 2011.
564. **Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, Romero R:** A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res* 2007, **17**:1537-1545.

565. **Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D:** PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett* 2004, **574**:37-41.
566. **Loke P, Allison JP:** PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:5336-5341.
567. **Paun A, Pitha PM:** The IRF family, revisited. *Biochimie* 2007, **89**:744-753.
568. **Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H:** The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002, **23**:89-96.
569. **Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S:** Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci (Lond)* 1999, **97**:247-251.
570. **Coon C, Beagley KW, Bao S:** The role of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in gastrointestinal immunity to salmonellosis. *Scand J Immunol* 2009, **70**:106-115.
571. **Wegener HC, Hald T, Lo Fo Wong D, Madsen M, Korsgaard H, Bager F, Gerner-Smidt P, Molbak K:** Salmonella control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**:774-780.
572. **EFSA:** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, **10**.
573. **Rodriguez A, Pangloli P, Richards HA, Mount JR, Draughon FA:** Prevalence of Salmonella in diverse environmental farm samples. *J Food Prot* 2006, **69**:2576-2580.
574. **Threlfall EJ, Hall ML, Rowe B:** Salmonella bacteraemia in England and Wales, 1981-1990. *J Clin Pathol* 1992, **45**:34-36.
575. **Chiu CH, Su LH, Chu C:** Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**:311-322.
576. **Chen YH, Chen TP, Tsai JJ, Hwang KP, Lu PL, Cheng HH, Peng CF:** Epidemiological study of human salmonellosis during 1991-1996 in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 1999, **15**:127-136.
577. **Hendriksen RS, Bangtrakulnonth A, Pulsrikarn C, Pornruangwong S, Noppornphan G, Emborg HD, Aarestrup FM:** Risk factors and epidemiology of the ten most common Salmonella serovars from patients in Thailand: 2002-2007. *Foodborne Pathog Dis* 2009, **6**:1009-1019.
578. **Kumar Y, Sharma A, Sehgal R, Kumar S:** Distribution trends of Salmonella serovars in India (2001-2005). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009, **103**:390-394.
579. **Kwon YK, Kim A, Kang MS, Her M, Jung BY, Lee KM, Jeong W, An BK, Kwon JH:** Prevalence and characterization of Salmonella Gallinarum in the chicken in Korea during 2000 to 2008. *Poult Sci* 2010, **89**:236-242.
580. **Carrique-Mas JJ, Willmington JA, Papadopoulou C, Watson EN, Davies RH:** Salmonella infection in cattle in Great Britain, 2003 to 2008. *Vet Rec* 2010, **167**:560-565.
581. **Foley SL, Lynne AM, Nayak R:** Salmonella challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Anim Sci* 2008, **86**:E149-162.

582. **Chiu CH, Wu TL, Su LH, Chu C, Chia JH, Kuo AJ, Chien MS, Lin TY:** The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype choleraesuis. *N Engl J Med* 2002, **346**:413-419.
583. **Gordon MA:** *Salmonella* infections in immunocompromised adults. *J Infect* 2008, **56**:413-422.
584. **Dhanoa A, Fatt QK:** Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009, **8**:15.
585. **Weinberger M, Andorn N, Agmon V, Cohen D, Shohat T, Pitlik SD:** Blood invasiveness of *Salmonella enterica* as a function of age and serotype. *Epidemiol Infect* 2004, **132**:1023-1028.
586. **Watson KG, Holden DW:** Dynamics of growth and dissemination of *Salmonella* in vivo. *Cell Microbiol* 2010, **12**:1389-1397.
587. **Baker S, Dougan G:** The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clin Infect Dis* 2007, **45 Suppl 1**:S29-33.
588. **Weinstein DL, O'Neill BL, Hone DM, Metcalf ES:** Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1998, **66**:2310-2318.
589. **Bohnhoff M, Miller CP:** Enhanced susceptibility to *Salmonella* infection in streptomycin-treated mice. *J Infect Dis* 1962, **111**:117-127.
590. **Miller CP, Bohnhoff M:** Changes in the Mouse's Enteric Microflora Associated with Enhanced Susceptibility to *Salmonella* Infection Following Streptomycin Treatment. *J Infect Dis* 1963, **113**:59-66.
591. **Que JU, Hentges DJ:** Effect of streptomycin administration on colonization resistance to *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 1985, **48**:169-174.
592. **Wells CL, Maddaus MA, Jechorek RP, Simmons RL:** Role of intestinal anaerobic bacteria in colonization resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988, **7**:107-113.
593. **Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Russmann H, Hardt WD:** Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003, **71**:2839-2858.
594. **Kaiser P, Diard M, Stecher B, Hardt WD:** The streptomycin mouse model for *Salmonella* diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's Mucosal immune response. *Immunol Rev* 2012, **245**:56-83.
595. **Hapfelmeier S, Hardt WD:** A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* 2005, **13**:497-503.
596. **Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA:** Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 1991, **72**:65-72.
597. **Modi WS, Yoshimura T:** Isolation of novel GRO genes and a phylogenetic analysis of the CXC chemokine subfamily in mammals. *Mol Biol Evol* 1999, **16**:180-193.
598. **Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ:** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 2001, **3**:1335-1344.

-
599. **Jahn KA, Biazik JM, Braet F:** GM1 expression in caco-2 cells: characterisation of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. *J Pharm Sci* 2011, **100**:3751-3762.
600. **Peiser C, Riebe-Imre M, Emura M, Mohr U:** Influence of culture passages on growth kinetics, xenobiotic metabolism, chromosomal stability and transformation in a clonal fetal hamster lung epithelial cell line. *Mutat Res* 1993, **289**:281-290.
601. **Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, Lewis D:** Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *Altern Lab Anim* 2002, **30**:407-414.
602. **Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, Baumler AJ:** The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal Mucosa. *Infect Immun* 2005, **73**:3367-3374.
603. **Yang SK, Eckmann L, Panja A, Kagnoff MF:** Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 1997, **113**:1214-1223.
604. **Cheminay C, Chakravortty D, Hensel M:** Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun* 2004, **72**:468-477.
605. **Pashenkov MV, Popilyuk SF, Alkhazova BI, L'Vov V L, Murugin VV, Fedenko ES, Khaitov RM, Pinegin BV:** Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2010, **10**:875-882.
606. **Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F:** *Salmonella typhimurium* disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:17915-17920.
607. **Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F:** Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**:5189-5193.
608. **Casado JL, Navas E, Frutos B, Moreno A, Martin P, Hermida JM, Guerrero A:** *Salmonella* lung involvement in patients with HIV infection. *Chest* 1997, **112**:1197-1201.
609. **Genzen JR, Towle DM, Kravetz JD, Campbell SM:** *Salmonella typhimurium* pulmonary infection in an immunocompetent patient. *Conn Med* 2008, **72**:139-142.
610. **Turk JR, Fales WH, Maddox C, Miller M, Pace L, Fischer J, Kreeger J, Johnson G, Turnquist S, Ramos JA, et al.:** Pneumonia associated with *Salmonella choleraesuis* infection in swine: 99 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992, **201**:1615-1616.
611. **Fedorka-Cray PJ, Kelley LC, Stabel TJ, Gray JT, Laufer JA:** Alternate routes of invasion may affect pathogenesis of *Salmonella typhimurium* in swine. *Infect Immun* 1995, **63**:2658-2664.
612. **Proux K, Cariolet R, Fravallo P, Houdayer C, Keranflech A, Madec F:** Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella Typhimurium*. *Vet Res* 2001, **32**:591-600.
613. **Winkler GC:** Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. *Am J Anat* 1988, **181**:217-234.

614. **Boyd EF, Wang FS, Beltran P, Plock SA, Nelson K, Selander RK:** Salmonella reference collection B (SARB): strains of 37 serovars of subspecies I. *J Gen Microbiol* 1993, **139 Pt 6**:1125-1132.
615. **Paulin SM, Jagannathan A, Campbell J, Wallis TS, Stevens MP:** Net replication of Salmonella enterica serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal Mukosa and nodes is associated with their differential virulence. *Infect Immun* 2007, **75**:3950-3960.
616. **Bolton AJ, Osborne MP, Stephen J:** 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* 2000, **49**:503-511.
617. **Mills SD, Finlay BB:** Comparison of Salmonella typhi and Salmonella typhimurium invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microb Pathog* 1994, **17**:409-423.
618. **Pullinger GD, Dziva F, Charleston B, Wallis TS, Stevens MP:** Identification of Salmonella enterica serovar Dublin-specific sequences by subtractive hybridization and analysis of their role in intestinal colonization and systemic translocation in cattle. *Infect Immun* 2008, **76**:5310-5321.
619. **Richardson EJ, Limaye B, Inamdar H, Datta A, Manjari KS, Pullinger GD, Thomson NR, Joshi RR, Watson M, Stevens MP:** Genome sequences of Salmonella enterica serovar typhimurium, Choleraesuis, Dublin, and Gallinarum strains of well-defined virulence in food-producing animals. *J Bacteriol* 2011, **193**:3162-3163.
620. **Watson PR, Paulin SM, Jones PW, Wallis TS:** Interaction of Salmonella serotypes with porcine macrophages in vitro does not correlate with virulence. *Microbiology* 2000, **146 (Pt 7)**:1639-1649.
621. **Gordon MA, Jack DL, Dockrell DH, Lee ME, Read RC:** Gamma interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of Salmonella enterica serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infect Immun* 2005, **73**:3445-3452.
622. **Ishibashi Y, Arai T:** A possible mechanism for host-specific pathogenesis of Salmonella serovars. *Microb Pathog* 1996, **21**:435-446.
623. **Gondwe EN, Molyneux ME, Goodall M, Graham SM, Mastroeni P, Drayson MT, MacLennan CA:** Importance of antibody and complement for oxidative burst and killing of invasive nontyphoidal Salmonella by blood cells in Africans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:3070-3075.
624. **Eriksson S, Chambers BJ, Rhen M:** Nitric oxide produced by murine dendritic cells is cytotoxic for intracellular Salmonella enterica sv. Typhimurium. *Scand J Immunol* 2003, **58**:493-502.
625. **Martin E, Nathan C, Xie QW:** Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1994, **180**:977-984.
626. **Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC:** Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* 2000, **192**:227-236.
627. **Suar M, Jantsch J, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Barrow PA, Hardt WD:** Virulence of broad- and narrow-host-range Salmonella enterica serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infect Immun* 2006, **74**:632-644.

628. **Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA, Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP:** Differential responses of macrophages to Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium. *Vet Immunol Immunopathol* 2005, **107**:327-335.
629. **Schmidt LD, Kohrt LJ, Brown DR:** Comparison of growth phase on Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) and Mukosal explants from porcine small intestine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2008, **31**:63-69.
630. **Kihlstrom E:** Infection of HeLa cells with Salmonella typhimurium 395 MS and MR10 bacteria. *Infect Immun* 1977, **17**:290-295.
631. **Prager R, Miroid S, Tietze E, Strutz U, Knuppel B, Rabsch W, Hardt WD, Tschape H:** Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of Salmonella enterica. *Int J Med Microbiol* 2000, **290**:605-617.
632. **Rahman H, Streckel W, Prager R, Tschape H:** Presence of sopE gene & its phenotypic expression among different serovars of Salmonella isolated from man & animals. *Indian J Med Res* 2004, **120**:35-38.
633. **Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt WD:** SopE and SopE2 from Salmonella typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 2001, **276**:34035-34040.
634. **Streckel W, Wolff AC, Prager R, Tietze E, Tschape H:** Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1, and AvrA differ with systemic, enteric, and epidemic strains of Salmonella enterica. *Mol Nutr Food Res* 2004, **48**:496-503.
635. **Hardt WD, Urlaub H, Galan JE:** A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of Salmonella typhimurium is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:2574-2579.
636. **Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Edwards MH, Galyov EE:** SopE, a secreted protein of Salmonella dublin, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol* 1996, **22**:327-338.
637. **Wilson RL, Elthon J, Clegg S, Jones BD:** Salmonella enterica serovars gallinarum and pullorum expressing Salmonella enterica serovar typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. *Infect Immun* 2000, **68**:4782-4785.
638. **Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD:** Role of the Salmonella pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 2004, **72**:795-809.
639. **Clark L, Perrett CA, Malt L, Harward C, Humphrey S, Jepson KA, Martinez-Argudo I, Carney LJ, La Ragione RM, Humphrey TJ, Jepson MA:** Differences in Salmonella enterica serovar Typhimurium strain invasiveness are associated with heterogeneity in SPI-1 gene expression. *Microbiology* 2011, **157**:2072-2083.
640. **Bolton AJ, Martin GD, Osborne MP, Wallis TS, Stephen J:** Invasiveness of Salmonella serotypes Typhimurium, Choleraesuis and Dublin for rabbit terminal ileum in vitro. *J Med Microbiol* 1999, **48**:801-810.

641. **Pascopella L, Raupach B, Ghori N, Monack D, Falkow S, Small PL:** Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun* 1995, **63**:4329-4335.
642. **Paulin SM, Watson PR, Benmore AR, Stevens MP, Jones PW, Villarreal-Ramos B, Wallis TS:** Analysis of *Salmonella enterica* serotype-host specificity in calves: avirulence of *S. enterica* serotype gallinarum correlates with bacterial dissemination from mesenteric lymph nodes and persistence in vivo. *Infect Immun* 2002, **70**:6788-6797.
643. **Jones B, Pascopella L, Falkow S:** Entry of Microbes into the Host - Using M-Cells to Break the Mucosal Barrier. *Current Opinion in Immunology* 1995, **7**:474-478.
644. **Murray RA, Lee CA:** Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that salmonella pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect Immun* 2000, **68**:5050-5055.
645. **Lodge JM, Bolton AJ, Martin GD, Osborne MP, Ketley JM, Stephen J:** A histotoxin produced by *Salmonella*. *J Med Microbiol* 1999, **48**:811-818.
646. **Zahrt TC, Deretic V:** Mycobacterium tuberculosis signal transduction system required for persistent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:12706-12711.
647. **Eriksson S, Bjorkman J, Borg S, Syk A, Pettersson S, Andersson DI, Rhen M:** *Salmonella typhimurium* mutants that downregulate phagocyte nitric oxide production. *Cell Microbiol* 2000, **2**:239-250.
648. **Sheppard M, Webb C, Heath F, Mallows V, Emilianus R, Maskell D, Mastroeni P:** Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* 2003, **5**:593-600.
649. **Monack DM, Bouley DM, Falkow S:** *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* 2004, **199**:231-241.
650. **Vladoianu IR, Chang HR, Pechere JC:** Expression of host resistance to *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*: bacterial survival within macrophages of murine and human origin. *Microb Pathog* 1990, **8**:83-90.
651. **Schwan WR, Huang XZ, Hu L, Kopecko DJ:** Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. *Infect Immun* 2000, **68**:1005-1013.
652. **Bueno SM, Gonzalez PA, Carreno LJ, Tobar JA, Mora GC, Pereda CJ, Salazar-Onfray F, Kalergis AM:** The capacity of *Salmonella* to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology* 2008, **124**:522-533.
653. **Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, Kagnoff MF:** NF- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* 1999, **163**:1457-1466.
654. **Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE:** 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* 1997, **159**:5550-5559.

655. **Maruyama K, Sano G, Ray N, Takada Y, Matsuo K:** c-Fos-deficient mice are susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2007, **75**:1520-1523.
656. **Seong J, Piao HH, Ryu PY, Kim YU, Choy HE, Hong Y:** Expression of c-Myc is related to host cell death following *Salmonella typhimurium* infection in macrophage. *J Microbiol* 2009, **47**:214-219.
657. **Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M:** Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 1999, **19**:6742-6753.
658. **Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K:** The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999, **398**:252-256.
659. **Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ:** TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* 2000, **68**:909-915.
660. **Montagne A, Menanteau P, Boivin R, Bernard S, Lantier F, Lalmanach AC:** 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* 2001, **82**:257-272.
661. **O'Brien EJ, Bennett PM:** Structure of straight flagella from a mutant *Salmonella*. *J Mol Biol* 1972, **70**:133-152.
662. **Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A:** Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 2003, **4**:1247-1253.
663. **Andersen-Nissen E, Smith KD, Bonneau R, Strong RK, Aderem A:** A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp Med* 2007, **204**:393-403.
664. **Coers J, Vance RE, Fontana MF, Dietrich WF:** Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol* 2007, **9**:2344-2357.
665. **Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sougawa N, Matsui H, Kuwata H, et al:** Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006, **7**:868-874.
666. **Hapfelmeier S, Muller AJ, Stecher B, Kaiser P, Barthel M, Endt K, Eberhard M, Robbiani R, Jacobi CA, Heikenwalder M, et al:** Microbe sampling by Mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *J Exp Med* 2008, **205**:437-450.
667. **Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, et al:** A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003, **198**:1563-1572.
668. **Dunstan SJ, Hawn TR, Hue NT, Parry CP, Ho VA, Vinh H, Diep TS, House D, Wain J, Aderem A, et al:** Host susceptibility and clinical outcomes in toll-like

- receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam. *J Infect Dis* 2005, **191**:1068-1071.
- 669. Levkau B, Scatena M, Giachelli CM, Ross R, Raines EW:** Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* 1999, **1**:227-233.
- 670. Tang G, Yang J, Minemoto Y, Lin A:** Blocking caspase-3-mediated proteolysis of IKKbeta suppresses TNF-alpha-induced apoptosis. *Mol Cell* 2001, **8**:1005-1016.
- 671. Karin M, Lin A:** NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002, **3**:221-227.
- 672. Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A:** The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* 2000, **19**:3325-3336.
- 673. Hanson PJ, Moran AP, Butler K:** Paracellular permeability is increased by basal lipopolysaccharide in a primary culture of colonic epithelial cells; an effect prevented by an activator of Toll-like receptor-2. *Innate Immun* 2011, **17**:269-282.
- 674. Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S, Beyaert R:** Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *J Exp Med* 2008, **205**:1967-1973.
- 675. Deveraux QL, Reed JC:** IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999, **13**:239-252.
- 676. Burstein E, Duckett CS:** Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**:732-737.
- 677. He KL, Ting AT:** A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 2002, **22**:6034-6045.
- 678. Zeng H, Wu H, Sloane V, Jones R, Yu Y, Lin P, Gewirtz AT, Neish AS:** Flagellin/TLR5 responses in epithelia reveal intertwined activation of inflammatory and apoptotic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, **290**:G96-G108.
- 679. Jones RM, Wu H, Wentworth C, Luo L, Collier-Hyams L, Neish AS:** Salmonella AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe* 2008, **3**:233-244.
- 680. Liao AP, Petrof EO, Kuppireddi S, Zhao Y, Xia Y, Claud EC, Sun J:** Salmonella type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2008, **3**:e2369.
- 681. Wu H, Jones RM, Neish AS:** The Salmonella effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. *Cell Microbiol* 2012, **14**:28-39.
- 682. Rytkonen A, Poh J, Garmendia J, Boyle C, Thompson A, Liu M, Freemont P, Hinton JC, Holden DW:** SseL, a Salmonella deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:3502-3507.
- 683. Haraga A, Miller SI:** A Salmonella enterica serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun* 2003, **71**:4052-4058.

- 684. Haraga A, Miller SI:** A Salmonella type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol* 2006, **8**:837-846.
- 685. Licht TR, Krogfelt KA, Cohen PS, Poulsen LK, Urbance J, Molin S:** Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by Salmonella typhimurium studied by in situ hybridization. *Infect Immun* 1996, **64**:3811-3817.
- 686. Kelly NM, Young L, Cross AS:** Differential induction of tumor necrosis factor by bacteria expressing rough and smooth lipopolysaccharide phenotypes. *Infect Immun* 1991, **59**:4491-4496.
- 687. Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, et al:** Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infect Immun* 2005, **73**:2344-2350.
- 688. Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P:** Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis and Salmonella gallinarum. *Microbiology* 2000, **146 Pt 12**:3217-3226.
- 689. Roudier C, Krause M, Fierer J, Guiney DG:** Correlation between the presence of sequences homologous to the vir region of Salmonella dublin plasmid pSDL2 and the virulence of twenty-two Salmonella serotypes in mice. *Infect Immun* 1990, **58**:1180-1185.
- 690. Dibb-Fuller MP, Allen-Vercoe E, Thorns CJ, Woodward MJ:** Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by Salmonella enteritidis. *Microbiology* 1999, **145 (Pt 5)**:1023-1031.
- 691. Newell DG, McBride H, Dolby JM:** Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with Campylobacter jejuni and attachment of Campylobacter jejuni to human epithelial cell lines. *J Hyg (Lond)* 1985, **95**:217-227.
- 692. Moens S, Vanderleyden J:** Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol* 1996, **22**:67-100.
- 693. Savelkoul PH, de Kerf DP, Willems RJ, Mooi FR, van der Zeijst BA, Gaastra W:** Characterization of the fim2 and fim3 fimbrial subunit genes of Bordetella bronchiseptica: roles of Fim2 and Fim3 fimbriae and flagella in adhesion. *Infect Immun* 1996, **64**:5098-5105.
- 694. Zgair AK, Chhibber S:** Adhesion of Stenotrophomonas maltophilia to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J Med Microbiol* 2011, **60**:1032-1037.
- 695. Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CE, Rees CE, Waites WM:** Effect of flagella on initial attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:860-863.
- 696. Roy K, Hilliard GM, Hamilton DJ, Luo J, Ostmann MM, Fleckenstein JM:** Enterotoxigenic Escherichia coli EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. *Nature* 2009, **457**:594-598.
- 697. Schmitt C, Turner D, Boesl M, Abele M, Frosch M, Kurzai O:** A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of Neisseria meningitidis to epithelial cells. *J Bacteriol* 2007, **189**:7968-7976.

698. **Gal-Mor O, Gibson DL, Baluta D, Vallance BA, Finlay BB:** A novel secretion pathway of *Salmonella enterica* acts as an antivirulence modulator during salmonellosis. *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000036.
699. **Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG:** Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* 1999, **32**:691-701.
700. **Young GM, Schmiel DH, Miller VL:** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:6456-6461.
701. **Huang FC, Werne A, Li Q, Galyov EE, Walker WA, Cherayil BJ:** Cooperative interactions between flagellin and SopE2 in the epithelial interleukin-8 response to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun* 2004, **72**:5052-5062.
702. **Rostagno MH, Eicher SD, Lay DC, Jr.:** Immunological, physiological, and behavioral effects of *Salmonella enterica* carriage and shedding in experimentally infected finishing pigs. *Foodborne Pathog Dis* 2011, **8**:623-630.
703. **Dantzer R:** Innate immunity at the forefront of psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 2004, **18**:1-6.
704. **Nollet N, Maes D, Duchateau L, Hautekiet V, Houf K, Van Hoof J, De Zuttera L, De Kruif A, Geers R:** Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet Res* 2005, **36**:545-555.
705. **Perron GG, Quessy S, Bell G:** A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. *PLoS One* 2008, **3**:e3749.
706. **Kishima M, Uchida I, Namimatsu T, Osumi T, Takahashi S, Tanaka K, Aoki H, Matsuura K, Yamamoto K:** Nationwide surveillance of salmonella in the faeces of pigs in Japan. *Zoonoses Public Health* 2008, **55**:139-144.
707. **Botteldoorn N, Heyndrickx M, Rijpens N, Grijspeerdt K, Herman L:** *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. *J Appl Microbiol* 2003, **95**:891-903.
708. **Splichal I, Trebichavsky I, Muneta Y, Mori Y:** Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Vet Res* 2002, **33**:291-297.
709. **Hyland KA, Kohrt L, Vulchanova L, Murtaugh MP:** Mucosal innate immune response to intragastric infection by *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Mol Immunol* 2006, **43**:1890-1899.
710. **Niewold TA, Veldhuizen EJ, van der Meulen J, Haagsman HP, de Wit AA, Smits MA, Tersteeg MH, Hulst MM:** The early transcriptional response of pig small intestinal Mucosa to invasion by *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Mol Immunol* 2007, **44**:1316-1322.
711. **Meurens F, Berri M, Auray G, Melo S, Levast B, Virlogeux-Payant I, Chevalyere C, Gerdts V, Salmon H:** Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. *Vet Res* 2009, **40**:5.

712. **du Manoir JM, Albright BN, Stevenson G, Thompson SH, Mitchell GB, Clark ME, Caswell JL:** Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **89**:175-186.
713. **Sutherland MA, Rodriguez-Zas SL, Ellis M, Salak-Johnson JL:** Breed and age affect baseline immune traits, cortisol, and performance in growing pigs. *J Anim Sci* 2005, **83**:2087-2095.
714. **Stadnyk AW:** Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002, **16**:241-246.
715. **Pitman RS, Blumberg RS:** First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the Mucosal immune system. *J Gastroenterol* 2000, **35**:805-814.
716. **Reinecker HC, Podolsky DK:** Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:8353-8357.
717. **McGee DW, Vitkus SJ, Lee P:** The effect of cytokine stimulation on IL-1 receptor mRNA expression by intestinal epithelial cells. *Cell Immunol* 1996, **168**:276-280.
718. **Smythies LE, Shen R, Bimczok D, Novak L, Clements RH, Eckhoff DE, Bouchard P, George MD, Hu WK, Dandekar S, Smith PD:** Inflammation anergy in human intestinal macrophages is due to Smad-induced IkappaBalpha expression and NF-kappaB inactivation. *J Biol Chem* 2010, **285**:19593-19604.
719. **Rydstrom A, Wick MJ:** Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral Salmonella infection. *J Immunol* 2007, **178**:5789-5801.
720. **Wick MJ:** Monocyte and dendritic cell recruitment and activation during oral Salmonella infection. *Immunol Lett* 2007, **112**:68-74.
721. **Schuetze N, Schoeneberger S, Mueller U, Freudenberg MA, Alber G, Straubinger RK:** IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by Salmonella enteritidis and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol* 2005, **17**:649-659.
722. **Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, et al:** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000, **13**:715-725.
723. **Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, et al:** A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 2002, **168**:5699-5708.
724. **Grohmann U, Belladonna ML, Vacca C, Bianchi R, Fallarino F, Orabona C, Fioretti MC, Puccetti P:** Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma. *J Immunol* 2001, **167**:221-227.
725. **Ottenhoff TH, de Boer T, Verhagen CE, Verreck FA, van Dissel JT:** Human deficiencies in type 1 cytokine receptors reveal the essential role of type 1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Microbes Infect* 2000, **2**:1559-1566.
726. **van de Vosse E, Ottenhoff TH:** Human host genetic factors in mycobacterial and Salmonella infection: lessons from single gene disorders in IL-12/IL-23-dependent

- signaling that affect innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2006, **8**:1167-1173.
- 727. Miller MD, Krangel MS:** The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:2950-2954.
- 728. Selvan RS, Zhou LJ, Krangel MS:** Regulation of I-309 gene expression in human monocytes by endogenous interleukin-1. *Eur J Immunol* 1997, **27**:687-694.
- 729. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV:** Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990, **347**:669-671.
- 730. Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM:** CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J Immunol* 1999, **162**:186-194.
- 731. Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, Caux C:** Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 1999, **66**:252-262.
- 732. Gangur V, Birmingham NP, Thanavorakul S:** Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2002, **86**:127-136.
- 733. Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ:** Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993, **177**:1809-1814.
- 734. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B:** Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996, **184**:963-969.
- 735. Loetscher P, Pellegrino A, Gong JH, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Baggiolini M, Clark-Lewis I:** The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 2001, **276**:2986-2991.
- 736. Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, Baumler AJ:** Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infect Immun* 2003, **71**:4795-4803.
- 737. Winter SE, Thiennimitr P, Nuccio SP, Haneda T, Winter MG, Wilson RP, Russell JM, Henry T, Tran QT, Lawhon SD, et al:** Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infect Immun* 2009, **77**:1904-1916.
- 738. Wang Y, Qu L, Uthe JJ, Bearson SM, Kuhar D, Lunney JK, Couture OP, Nettleton D, Dekkers JC, Tuggle CK:** Global transcriptional response of porcine mesenteric lymph nodes to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genomics* 2007, **90**:72-84.
- 739. Fahy OL, Townley SL, Coates NJ, Clark-Lewis I, McColl SR:** Control of *Salmonella* dissemination in vivo by macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha/CCL20. *Lab Invest* 2004, **84**:1501-1511.

740. **Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF:** Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating Mukosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **280**:G710-719.
741. **Vinay DS, Kwon BS:** Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* 1998, **10**:481-489.
742. **LeBlanc HN, Ashkenazi A:** Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 2003, **10**:66-75.
743. **Sander J:** [Pathogenesis of salmonella infections in humans]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1993, **100**:283-285.
744. **Duchet-Suchaux M, Lechopier P, Marly J, Bernardet P, Delaunay R, Pardon P:** Quantification of experimental Salmonella enteritidis carrier state in B13 leghorn chicks. *Avian Dis* 1995, **39**:796-803.
745. **Sadeyen JR, Trotureau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC:** Salmonella carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect* 2004, **6**:1278-1286.
746. **Guard-Petter J:** The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. *Environ Microbiol* 2001, **3**:421-430.
747. **RKI:** Zu einem nosokomialen Ausbruch durch S. Enteritidis in Fulda. In *Epidemiologisches Bulletin* (Koch-Institut R ed., vol. 48. Berlin: Robert Koch-Institut; 2007.
748. **Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, Hughes S, Goodchild M, Morrell S, Watson M, et al:** A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res* 2005, **25**:467-484.
749. **Gibson MS, Kaiser P, Fife M:** Identification of chicken granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF/CSF3): the previously described myelomonocytic growth factor is actually CSF3. *J Interferon Cytokine Res* 2009, **29**:339-343.
750. **Kaiser P, Rothwell L, Goodchild M, Bumstead N:** The chicken proinflammatory cytokines interleukin-1beta and interleukin-6: differences in gene structure and genetic location compared with their mammalian orthologues. *Anim Genet* 2004, **35**:169-175.
751. **Lam KM:** The macrophage inflammatory protein-1beta in the supernatants of Mycoplasma gallisepticum-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 2002, **26**:85-93.
752. **Munoz I, Berges M, Bonsergent C, Cormier-Aline F, Quere P, Sibille P:** Cloning, expression and functional characterization of chicken CCR6 and its ligand CCL20. *Mol Immunol* 2009, **47**:551-559.
753. **Arathy DS, Nair S, Soman SS, Issac A, Sreekumar E:** Functional characterization of the CC chemokine RANTES from Pekin duck (*Anas platyrhynchos*). *Dev Comp Immunol* 2011, **35**:142-150.
754. **Poh TY, Pease J, Young JR, Bumstead N, Kaiser P:** Re-evaluation of chicken CXCR1 determines the true gene structure: CXCL1 (K60) and CXCL2 (CAF/interleukin-8) are ligands for this receptor. *J Biol Chem* 2008, **283**:16408-16415.

755. **Ciraci C, Tuggle CK, Wannemuehler MJ, Nettleton D, Lamont SJ:** Unique genome-wide transcriptome profiles of chicken macrophages exposed to Salmonella-derived endotoxin. *BMC Genomics* 2010, **11**:545.
756. **Kothlow S, Morgenroth I, Tregaskes CA, Kaspers B, Young JR:** CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture. *Dev Comp Immunol* 2008, **32**:1015-1026.
757. **Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR:** Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res* 1996:39-46.
758. **Zara JN, Siu RK, Zhang X, Shen J, Ngo R, Lee M, Li W, Chiang M, Chung J, Kwak J, et al:** High doses of bone morphogenetic protein 2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 2011, **17**:1389-1399.
759. **Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH:** Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:11740-11744.
760. **Uthe JJ, Royae A, Lunney JK, Stabel TJ, Zhao SH, Tuggle CK, Bearson SM:** Porcine differential gene expression in response to Salmonella enterica serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol Immunol* 2007, **44**:2900-2914.
761. **Rossi O, van Baarlen P, Wells JM:** Host-Recognition of Pathogens and Commensals in the Mammalian Intestine. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011.
762. **Keestra AM, de Zoete MR, van Aubel RA, van Putten JP:** Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Mol Immunol* 2008, **45**:1298-1307.
763. **Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A:** The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:9577-9582.
764. **Temperley ND, Berlin S, Paton IR, Griffin DK, Burt DW:** Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics* 2008, **9**:62.
765. **Rebl A, Goldammer T, Seyfert HM:** Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet Immunol Immunopathol* 2010, **134**:139-150.
766. **Menzies M, Ingham A:** Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, **109**:23-30.
767. **Turin L, Riva F:** Toll-like receptor family in domestic animal species. *Crit Rev Immunol* 2008, **28**:513-538.
768. **Tamai R, Asai Y, Hashimoto M, Fukase K, Kusumoto S, Ishida H, Kiso M, Ogawa T:** Cell activation by monosaccharide lipid A analogues utilizing Toll-like receptor 4. *Immunology* 2003, **110**:66-72.
769. **Lohmann KL, Vandenplas ML, Barton MH, Bryant CE, Moore JN:** The equine TLR4/MD-2 complex mediates recognition of lipopolysaccharide from Rhodobacter sphaeroides as an agonist. *J Endotoxin Res* 2007, **13**:235-242.
770. **Keestra AM, van Putten JP:** Unique properties of the chicken TLR4/MD-2 complex: selective lipopolysaccharide activation of the MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 2008, **181**:4354-4362.

771. **Shinkai H, Muneta Y, Suzuki K, Eguchi-Ogawa T, Awata T, Uenishi H:** Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Mol Immunol* 2006, **43**:1474-1480.
772. **Ogura Y, Saab L, Chen FF, Benito A, Inohara N, Nunez G:** Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. *Genomics* 2003, **81**:369-377.
773. **Bergman IM, Rosengren JK, Edman K, Edfors I:** European wild boars and domestic pigs display different polymorphic patterns in the Toll-like receptor (TLR) 1, TLR2, and TLR6 genes. *Immunogenetics* 2010, **62**:49-58.
774. **Kojima-Shibata C, Shinkai H, Morozumi T, Jozaki K, Toki D, Matsumoto T, Kadowaki H, Suzuki E, Uenishi H:** Differences in distribution of single nucleotide polymorphisms among intracellular pattern recognition receptors in pigs. *Immunogenetics* 2009, **61**:153-160.
775. **Uenishi H, Shinkai H:** Porcine Toll-like receptors: the front line of pathogen monitoring and possible implications for disease resistance. *Dev Comp Immunol* 2009, **33**:353-361.
776. **Jozaki K, Shinkai H, Tanaka-Matsuda M, Morozumi T, Matsumoto T, Toki D, Okumura N, Eguchi-Ogawa T, Kojima-Shibata C, Kadowaki H, et al:** Influence of polymorphisms in porcine NOD2 on ligand recognition. *Mol Immunol* 2009, **47**:247-252.
777. **Chausse AM, Grepinet O, Bottreau E, Le Vern Y, Menanteau P, Trotureau J, Robert V, Wu Z, Kerboeuf D, Beaumont C, Velge P:** Expression of Toll-like receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to Salmonella carrier state. *Infect Immun* 2011, **79**:3445-3454.
778. **Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, et al:** Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003, **124**:140-146.
779. **Cloud-Hansen KA, Peterson SB, Stabb EV, Goldman WE, McFall-Ngai MJ, Handelsman J:** Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol* 2006, **4**:710-716.
780. **Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G:** Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999, **274**:14560-14567.
781. **Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G:** Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001, **276**:4812-4818.
782. **Ismair MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE:** hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 2006, **84**:1313-1319.
783. **Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, Medzhitov R, Flavell RA:** RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002, **416**:194-199.
784. **Pauleau AL, Murray PJ:** Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7531-7539.

785. **Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, et al:** Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol* 2005, **174**:6518-6523.
786. **Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H:** Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005, **73**:7967-7976.
787. **Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T:** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:9-20.
788. **Damiano JS, Oliveira V, Welsh K, Reed JC:** Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J* 2004, **381**:213-219.
789. **Stehlik C, Hayashi H, Pio F, Godzik A, Reed JC:** CARD6 is a modulator of NF-kappa B activation by Nod1- and Cardiak-mediated pathways. *J Biol Chem* 2003, **278**:31941-31949.
790. **Chen CM, Gong Y, Zhang M, Chen JJ:** Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. *J Biol Chem* 2004, **279**:25876-25882.
791. **Magalhaes JG, Philpott DJ, Nahori MA, Jehanno M, Fritz J, Le Bourhis L, Viala J, Hugot JP, Giovannini M, Bertin J, et al:** Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep* 2005, **6**:1201-1207.
792. **Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders HJ:** Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol* 2010, **22**:717-728.
793. **Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, Collins C, Viala J, Ferrero RL, Girardin SE, Philpott DJ:** Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* 2007, **26**:445-459.
794. **Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA:** Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 1998, **273**:32608-32613.
795. **Kato A, Hashimoto Y, Kon Y, Sugimura M:** Are there M cells in the cecal tonsil of chickens? *J Vet Med Sci* 1992, **54**:999-1006.
796. **Kaniga K, Bossio JC, Galan JE:** The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. *Mol Microbiol* 1994, **13**:555-568.

VII. WEITERE VERZEICHNISSE

VII.1. Abkürzungsverzeichnis

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abb.	Abbildung
ACR	acid tolerance response
AP-1	activating protein-1
APC	antigen-presenting cell
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Adenosintriphosphatase
AvrA	avirulence gene/protein A
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	caspase-activating and recruitment domain
CCL20	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 20
CD	cluster of differentiation
Cdc42	cell division cycle 42
cDNA	complementary DNA oder copy DNA (äquivalent cRNA)
cfu	colony-forming units
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CpG-DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanin – DNA
CR	complement receptor
C_t	cycle threshold
CTP	Cytidintriphosphat
Cy3	Cyanin-3
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	dendritische Zellen
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
dsDNA	double-stranded DNA (äquivalent dsRNA)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DT	definitive type
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethyleneglycoltetraacetic acid
EFSA	European Food Safety Authority
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FC	fold change
FcR	Fc-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
FU Berlin	Freie Universität Berlin
GALT	gut-associated lymphoid tissue
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
ggfs.	gegebenenfalls
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycophosphatidylinositol
GRO	growth-related oncogene
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
His	Histidin
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	high-performance liquid chromatography
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HZI	Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
iE-DAP	γ -D-Glu-mDAP
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IF	impact factor
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IKK	I κ B-Kinase

IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Ipaf	ICE protease activating factor
IPEC-J2	intestinal porcine epithelial cell - jejunum 2
IRAK	IL-1 receptor - associated kinase
IRF	IFN regulatory factor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Km	Kanamycin
LB	lysogeny broth, Luria-Bertani broth, luria broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine-rich repeat
MAPK	mitogen-activated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MD2	myeloid differentiation factor 2
mDAP	meso-Diaminopimelinsäure
MDP	Muramyl-dipeptide (N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin)
MDR	multi drug resistant
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
MLN	mesenteriale Lymphknoten
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
M-Tri-DAP	MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-mDAP
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
M-Zellen	microfold cells
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBD	nucleotide-binding domain
NC	needle complex
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCSU	North Carolina State University
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	nuclear factor - kappa B
NK	Negativkontrolle
NLR	NOD-like receptor

NLRC4	NLR family, CARD domain-containing protein 4
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
Nramp-1	natural resistance-associated macrophage protein 1
NRL	Nationales Referenzlabor
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OD	optische Dichte
p-Wert	probability value, Wahrscheinlichkeitswert
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pef	plasmid-encoded fimbriae
PGN	Peptidoglycan
PGRP	peptidoglycan recognition protein
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP	Peyer'sche Plaques, auch Polypropylen
PRR	pathogen recognition receptor
PT	Phagentyp
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription - PCR
Rac1	rat sarcoma (Ras)-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RICK	receptor-interacting serine/threonine kinase
RIN	RNA-Integritätsnummer
RIP1	receptor-interacting protein 1
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
rpoS	RNA polymerase sigma factor
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription oder Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription – PCR
s.	siehe
S.	<i>Salmonella</i>
SARB	<i>Salmonella</i> -Referenzsammlung B

SARM	sterile α - and armadillo-motif-containing protein
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	<i>Salmonella</i> -containing vacuole
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serovar Enteritidis (beispielhaft für alle Serovare)
Sif	<i>Salmonella</i> -induced filament
Sip	<i>Salmonella</i> invasion protein
SNP	single nucleotide polymorphism
Sop	<i>Salmonella</i> outer protein
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
SptP	<i>Salmonella</i> protein tyrosine phosphatase
spv	<i>Salmonella</i> plasmid for virulence
SSC	saline-sodium citrate
<i>S. scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
Sse	secretion system effector
ssp.	Subspezies
SspH	<i>Salmonella</i> secreted protein H
ssRNA	single-stranded RNA (äquivalent ssDNA)
Std.	Stunden
Str	Streptomycin
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem (äquivalent auch T4SS)
Tab.	Tabelle
TAB1,2,3	TAK1-binding protein
TAK1	TGF- β -aktivierte Kinase 1
TBE	Pufferlösung (Tris/Borat/EDTA)
TCR	T-cell receptor
TF	Transferrin
TGF- β	transforming growth factor- β
TIR	Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPS	two partner secretion
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAF6	TNF-receptor associated receptor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett

var.	Variante
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
YopJ	<i>Yersinia</i> outer protein J
Y.	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten sowie zugehörige Präfixe wurden nach Möglichkeit entsprechend dem SI (Système international d'unités) angegeben und abgekürzt. Chemische Elemente und Verbindungen wurden entsprechend den Empfehlungen der Internationalen Vereinigung für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) abgekürzt.

VII.2. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i> Verteilung der häufigsten Serovare humaner Infektionen in der EU 2008 und in Deutschland 2009 _____	11
<i>Abb. 2:</i> Erkennung von <i>Salmonella</i> -assoziierten molekularen Mustern durch Toll- und NOD-ähnliche Rezeptoren (TLR, NLR) mit den anschließenden Signalwegen ____	33
<i>Abb. 3:</i> Wachstumskurven verschiedener <i>Salmonella</i> Stämme bei 37°C bzw. 42°C in LB-Medium_____	79
<i>Abb. 4:</i> Generationszeiten verschiedener <i>Salmonella</i> Stämme bei 37°C bzw. 42°C _____	79
<i>Abb. 5:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der porcinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2. Dargestellt ist die mittlere relative Invasivität eines Serovars im Verhältnis zu <i>S. Typhimurium</i> SL1344 sowie die relative Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl eines Serovars im Verhältnis zur Vervielfachung von <i>S. Typhimurium</i> SL1344 über einen Zeitraum von 24 Std. ____	81
<i>Abb. 6:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der porcinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31 _____	82
<i>Abb. 7:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie HD-11 des Huhns_____	83
<i>Abb. 8:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der Makrophagen-ähnlichen Zelllinie MQ-NCSU des Huhns _____	83
<i>Abb. 9:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der humanen intestinalen Epithelzelllinie LoVo _____	84
<i>Abb. 10:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der humanen intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 _____	85
<i>Abb. 11:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 _____	86
<i>Abb. 12:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie U937 nach Aktivierung mit PMA _____	86
<i>Abb. 13:</i> Invasivität und Persistenz der <i>Salmonella</i> Serovare in humanen Primärblutmakrophagen _____	87
<i>Abb. 14:</i> Invasion und intrazelluläre Persistenz verschiedener <i>Salmonella</i> Serovare in Epithel- und Makrophagenzelllinien aus dem Menschen (Caco-2, LoVo, THP-1, PM (Primärmakrophagen)), dem Schwein (IPEC-J2, 3D4/31) und dem Huhn (HD-11, MQ-NCSU) _____	88

<i>Abb. 15:</i> Intrazelluläre Persistenz verschiedener <i>Salmonella</i> Serovare in Epithel- und Makrophagenzelllinien aus dem Menschen (Caco-2, LoVo, THP-1, PM (Primärmakrophagen)), dem Schwein (IPEC-J2, 3D4/31) und dem Huhn (HD-11, MQ-NCSU) _____	89
<i>Abb. 16:</i> Intrazelluläre Persistenz von <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>S. Enteritidis</i> (SE), <i>S. Choleraesuis</i> SARB4 (SC SARB) und <i>S. Dublin</i> (SD) über 24 Std. in HD-11 und MQ-NCSU Makrophagen bei 37°C und 42°C _____	90
<i>Abb. 17:</i> Durch <i>Salmonella</i> verursachte zytoxische Effekte sortiert nach den verwendeten Zelllinien bzw. den verwendeten <i>Salmonella</i> Serovaren. _____	92
<i>Abb. 18:</i> Durch <i>Salmonella</i> verursachte zytoxische Effekte in porcinen und humanen Epithel-Zelllinien bei einer MOI von 5 bzw. von 50 _____	93
<i>Abb. 19:</i> Durch <i>Salmonella</i> verursachte zytoxische Effekte in porcinen Epithel- (IPEC-J2) und Makrophagen-Zelllinien (3D4/31) _____	94
<i>Abb. 20:</i> Durch <i>Salmonella</i> verursachte zytoxische Effekte in Hühner-Makrophagen HD-11 _____	95
<i>Abb. 21:</i> Durch <i>Salmonella</i> verursachte zytoxische Effekte in humanen Epithel- (Caco-2; LoVo) und Makrophagen-Zelllinien (THP-1) _____	96
<i>Abb. 22:</i> Darstellung des Schwarmverhaltens des <i>Salmonella</i> Typhimurium SL1344 Wildtyps (WT) sowie der in dieser Arbeit erzeugten Mutanten mit Deletionen der Gene <i>fliC</i> oder <i>fljB</i> , <i>fliC</i> und <i>fljB</i> sowie <i>fliD</i> _____	97
<i>Abb. 23:</i> Aktivierung des Transkriptionsregulators NF-κB in porcinen (3D4/31), humanen (THP-1), aviären (HD-11) Reporter-Makrophagenzelllinien als Antwort auf eine Stimulation mit TNFα (3D4/31, THP-1) bzw. LPS von <i>S. Typhimurium</i> (HD-11) _____	99
<i>Abb. 24:</i> Aktivierung von NF-κB in porcinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen (3D4/31; PLN-C2) als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs _____	100
<i>Abb. 25:</i> Aktivierung von NF-κB in den Hühnermakrophagen-ähnlichen Zellen HD-11 als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs _____	100
<i>Abb. 26:</i> Aktivierung von NF-κB in humanen intestinalen Epithelzellen (LoVo) und Makrophagen (THP-1) als Antwort auf die Inkubation mit verschiedenen PAMPs _____	101
<i>Abb. 27:</i> Invasionsraten der Flagellindoppelmutante (<i>ΔfliC ΔfljB</i>) von <i>S. Typhimurium</i> im Verhältnis zum Wildtyp <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in den humanen Epithelzelllinien LoVo und Caco-2, der porcinen Epithelzelllinie IPEC-J2 sowie den Makrophagen-ähnlichen Zelllinien humanen (THP-1), porcinen (3D4/31) und aviären (HD-11) Ursprungs _____	103

- Abb. 28:* Aktivierung von NF- κ B in den humanen Zelllinien Caco-2, LoVo und THP-1, in den porcinen Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 und der Hühnerzelllinie HD-11 nach Infektion mit *S. Typhimurium* Deletionsmutanten für *mepA*, *fliC* und *fljB*, *ampG* und *mppA* im Verhältnis zu *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-infizierten Zellen _____ 103
- Abb. 29:* Aktivierung von NF- κ B in porcinen Makrophagen (3D4/31) und intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren _____ 105
- Abb. 30:* Aktivierung von NF- κ B in den Hühner-Makrophagen HD-11 als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren _____ 106
- Abb. 31:* Aktivierung von NF- κ B in humanen Makrophagen (THP-1) und intestinalen Epithelzellen (LoVo) als Antwort auf eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella* Serovaren _____ 107
- Abb. 32:* Relative Genexpression des Chemokins IL-8 infolge einer Infektion der humanen Epithelzelllinie LoVo und HD-11 mit dem *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-Stamm und Mutanten bestimmter Flagellengene (*fliC* und *fljB* bzw. *fliD*) _____ 109
- Abb. 33:* Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β und IL-8 infolge einer Infektion der humanen Epithelzelllinie LoVo mit dem *S. Typhimurium* SL1344 Wildtyp-Stamm und einer $\Delta ampG \Delta mppA$ Mutante _____ 110
- Abb. 34:* Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12p40 sowie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) infolge einer Infektion der Hühnermakrophagen HD-11 mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP) _____ 111
- Abb. 35:* Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 und TNF α infolge einer Infektion der humanen Makrophagen THP-1 mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP) _____ 111
- Abb. 36:* Relative Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 und TNF α infolge einer Infektion humaner Primärmakrophagen mit den *Salmonella enterica* Serovaren Typhimurium (ST), Enteritidis (SE), Choleraesuis SARB4 (SC SARB4) und A50 (SC A50), Dublin (SD), Gallinarum (SG) und Pullorum (SP) _____ 112
- Abb. 37:* Eingesanntes Bild eines von vier 44K Arrays als Beispiel uninfizierter Makrophagen _____ 114

-
- Abb. 38:* Schematische Darstellung der im Toll-like Rezeptor Signalweg hoch- bzw. herunterregulierten Gene infolge einer Infektion humaner Primärmakrophagen mit *S. Typhimurium* SL1344 _____ 117
- Abb. 39:* Venn-Diagramme unterschiedlich regulierter Gene bei einer Infektion humaner Primärmakrophagen im Vergleich zweier verschiedener Serovare ____ 121

VII.3. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1:</i> Beispiel der Antigenformel einiger in dieser Arbeit verwendeten Serovare _____	8
<i>Tab. 2:</i> An die Enter-net Datenbank übermittelte <i>Salmonella</i> Serovare mit Anzahl der Gesamtisolate und speziell aus dem Blut isolierten Stämme zwischen 1994 – 2004 sowie dem Quotienten dieser Werte _____	13
<i>Tab. 3:</i> Humane Toll-like Rezeptoren mit den wichtigsten Liganden _____	31
<i>Tab. 4:</i> Übersicht zur Herkunft der verwendeten Zelllinien _____	47
<i>Tab. 5:</i> Charakteristika der verwendeten Zelllinien _____	49
<i>Tab. 6:</i> Verwendete Bakterienstämme _____	51
<i>Tab. 7:</i> Für die Mutagenese nach Wanner verwendete Plasmide _____	51
<i>Tab. 8:</i> Oligonukleotide, die zum Nachweis der mRNA bestimmter Zytokine in der qRT-PCR genutzt wurden _____	52
<i>Tab. 9:</i> Oligonukleotide, die zur Herstellung und Überprüfung der <i>Salmonella</i> Mutanten im Rahmen der Mutagenese nach Wanner & Datsenko genutzt wurden _____	53
<i>Tab. 10:</i> Auflistung der eingesetzten Zellkulturplatten, Bakterienkonzentrationen und daraus folgender MOIs für bestimmte Anwendungen _____	67
<i>Tab. 11:</i> Anzahl unterschiedlich regulierter Gene nach einer Infektion mit den <i>Salmonella</i> Serovaren Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis oder Gallinarum _____	115
<i>Tab. 12:</i> Rangliste bei einer <i>S. Typhimurium</i> Infektion humaner Primärmakrophagen betroffener Wirtssignalwege _____	116
<i>Tab. 13:</i> Genexpressionsänderungen ausgewählter immunrelevanter Faktoren in mit <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>S. Enteritidis</i> (SE), <i>S. Choleraesuis</i> A50 (SC), <i>S. Dublin</i> (SD) oder <i>S. Gallinarum</i> (SG) infizierten humanen Primärmakrophagen _____	120
<i>Tab. 14:</i> Genexpressionsänderungen (FC) ausgewählter immunrelevanter Faktoren in mit <i>S. Typhimurium</i> (ST) und <i>S. Enteritidis</i> (SE) infizierten Primärmakrophagen aus humanem Blut und Hühnerblut _____	150

VIII. ANHANG

VIII.1. Zusätzliche Daten

Kurzbezeichnung	Sequenz Code (Agilent)	FC	p-Wert (2sT Einzel-experimente)	p-Wert (1sT ratios)	Beschreibung
ADAMTSL5	A_33_P3245489	2,87	0,00695	0,0018	Homo sapiens ADAMTS-like 5 (ADAMTSL5), [NM_213604]
ADORA2A	A_24_P237270	2,16	0,00825	0,00002	Homo sapiens adenosine A2a receptor (ADORA2A), [NM_000675]
AIF1L	A_33_P3260053	2,56	0,00274	0,00219	Homo sapiens allograft inflammatory factor 1-like (AIF1L), transcript variant 1, [NM_031426]
AK124996	A_33_P3412375	2,15	0,00056	0,00049	Homo sapiens cDNA FLJ43006 fis, clone BRTHA2013707, [AK124996]
AK125786	A_33_P3211977	3,07	0,00044	0,00299	Homo sapiens cDNA FLJ43798 fis, clone TESTI4000250, [AK125786]
API5	A_24_P312692	-2,26	0,00386	0,00004	Homo sapiens apoptosis inhibitor 5 (API5), transcript variant 2, [NM_006595]
ARHGAP21	A_23_P115608	-2,31	0,0011	0,00002	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21), [NM_020824]
ARHGEF4	A_23_P253221	2,60	0,00318	0,00016	Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 (ARHGEF4), transcript variant 2, [NM_032995]
ATMIN	A_24_P176493	-2,46	0,00354	0,00015	Homo sapiens ATM interactor (ATMIN), [NM_015251]
AX746964	A_33_P3393751	2,65	0,00799	0,00186	Sequence 489 from Patent EP1308459, [AX746964]
AX747135	A_33_P3257817	2,64	0,00588	0,00174	Sequence 660 from Patent EP1308459, [AX747135]
AX747935	A_33_P3878681	2,12	0,00088	0,00527	Sequence 1460 from Patent EP1308459, [AX747935]
B3GNT2	A_23_P500956	-2,09	0,00281	0,00012	Homo sapiens UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GNT2), mRNA [NM_006577]
BARX1	A_23_P32279	2,32	0,00034	0,00228	Homo sapiens BARX homeobox 1 (BARX1), mRNA [NM_021570]
BAZ2B	A_23_P120048	-2,18	0,00394	0,00001	Homo sapiens bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B (BAZ2B), mRNA [NM_013450]
BG288911	A_32_P218025	2,15	0,00241	0,00128	602383859F1 NIH_MGC_93 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4512783 5', sequence [BG288911]
BLZF1	A_24_P119259	-2,66	0,00777	0,00012	Homo sapiens basic leucine zipper nuclear factor 1 (BLZF1), [NM_003666]
BUB3	A_23_P320658	-2,02	0,00274	0,00011	Homo sapiens budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast) (BUB3), transcript variant 1, [NM_004725]
BX106347	A_33_P3842629	4,22	0,00386	0,00874	BX106347 NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:9981212230, sequence [BX106347]
C12orf11	A_23_P36464	-2,16	0,00921	0,0001	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 11 (C12orf11), [NM_018164]
C12orf74	A_24_P838483	3,37	0,0018	0,00092	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 74 (C12orf74), [NM_001037671]
C14orf106	A_23_P364107	-2,14	0,00649	0,00004	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 106 (C14orf106), [NM_018353]
C14orf181	A_33_P3355717	2,76	0,00213	0,00149	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 181 (C14orf181), [NM_207442]
C17orf69	A_33_P3318053	2,04	0,00846	0,00189	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 69 (C17orf69), transcript variant 2, non-coding RNA [NR_026906]
C1orf152	A_33_P3345743	-2,24	0,00984	0,00011	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 152 (C1orf152), non-coding RNA [NR_003242]
C1orf167	A_33_P3340055	2,02	0,00208	0,00311	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 167, (cDNA clone IMAGE:40108753), partial cds. [BC128092]

C3orf23	A_23_P319874	-2,85	0,00931	0,00017	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 23 (C3orf23), transcript variant 3, [NM_001029840]
C4orf10	A_33_P3374264	2,78	0,00711	0,00388	Homo sapiens chromosome 4 open reading frame 10 (C4orf10), non-coding RNA [NR_015453]
C9orf85	A_33_P3409506	-2,20	0,00551	0,00005	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 85 (C9orf85), [NM_182505]
CAB39	A_23_P79426	-2,33	0,0074	0,00002	Homo sapiens calcium binding protein 39 (CAB39), transcript variant 1, [NM_016289]
CALY	A_33_P3318646	2,18	0,00134	0,00201	Homo sapiens calcyon neuron-specific vesicular protein (CALY), [NM_015722]
CASKIN1	A_33_P3349552	2,06	0,00961	0,00764	Homo sapiens CASK interacting protein 1 (CASKIN1), [NM_020764]
CASP3	A_33_P3278118	-2,26	0,00065	0,00002	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP3), transcript variant alpha, [NM_004346]
CCBL2	A_33_P3318696	-2,08	0,00189	0,00036	Homo sapiens cysteine conjugate-beta lyase 2 (CCBL2), transcript variant 1, [NM_001008661]
CCNT2	A_24_P174341	-2,85	0,00274	0,00002	Homo sapiens cyclin T2 (CCNT2), transcript variant b, [NM_058241]
CD46	A_23_P35230	-2,37	0,00618	0,00003	Homo sapiens CD46 molecule, complement regulatory protein (CD46), transcript variant n, [NM_172350]
CDC27	A_33_P3360718	-2,26	0,00263	0,00002	Homo sapiens cell division cycle 27 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC27), transcript variant 1, [NM_001114091]
CDC73	A_33_P3219770	-2,00	0,00833	0,00016	Homo sapiens cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC73), [NM_024529]
CDRT1	A_23_P352426	2,09	0,00451	0,00131	Homo sapiens CMT1A duplicated region transcript 1 (CDRT1), [NM_006382]
CEBPD	A_33_P3253804	2,48	0,00876	0,00432	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta (CEBPD), [NM_005195]
CEP170	A_24_P36944	-2,35	0,0017	0,00002	Homo sapiens centrosomal protein 170kDa (CEP170), transcript variant alpha, [NM_014812]
CISD3	A_33_P3362636	3,01	0,00154	0,00146	Homo sapiens CDGSH iron sulfur domain 3 (CISD3), [NM_001136498]
COL11A1	A_33_P3259339	-2,18	0,0051	0,00035	Homo sapiens collagen, type XI, alpha 1 (COL11A1), transcript variant B, [NM_080629]
CRY1	A_24_P407235	-2,73	0,0018	0,00008	Homo sapiens cryptochrome 1 (photolyase-like) (CRY1), [NM_004075]
CT47A11	A_32_P207124	2,68	0,00296	0,00127	Homo sapiens cancer/testis antigen family 47, member A11 (CT47A11), [NM_173571]
CXCL17	A_23_P50269	2,40	0,00039	0,00134	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 17 (CXCL17), [NM_198477]
CYP19A1	A_32_P86289	3,43	0,00016	0,00027	Homo sapiens cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), transcript variant 2, [NM_031226]
CYP4F2	A_23_P50710	2,14	0,00732	0,0028	Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2 (CYP4F2), [NM_001082]
CYP4Z2P	A_24_P145529	2,11	0,00679	0,0007	Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 2 pseudogene (CYP4Z2P), non-coding RNA [NR_002788]
DCK	A_24_P89080	-3,78	0,00304	0,00021	Homo sapiens deoxycytidine kinase (DCK), [NM_000788]
DEFB116	A_33_P3278689	3,26	0,00503	0,00617	Homo sapiens defensin, beta 116 (DEFB116), [NM_001037731]
DEFB127	A_23_P385843	2,87	0,00089	0,00414	Homo sapiens defensin, beta 127 (DEFB127), [NM_139074]
DMD	A_33_P3297813	4,72	0,00839	0,00008	Homo sapiens dystrophin, (cDNA clone IMAGE:5274415), complete cds. [BC036103]
DNAJB4	A_24_P393958	-2,75	0,00625	0,00002	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4), [NM_007034]

DNAJC25	A_23_P397019	-2,13	0,00618	0,00003	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C , member 25 (DNAJC25), [NM_001015882]
EIF2AK3	A_23_P135857	-2,20	0,00754	0,0012	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (EIF2AK3), [NM_004836]
EIF4E	A_32_P203300	-2,10	0,00236	0,00005	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), transcript variant 2, [NM_001130679]
ELAVL1	A_23_P388681	-2,02	0,00625	0,00004	Homo sapiens ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R) (ELAVL1), [NM_001419]
EML4	A_23_P143127	-2,07	0,00034	0,00003	Homo sapiens echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4), transcript variant 1, [NM_019063]
EN2	A_23_P134433	2,58	0,0036	0,00387	Homo sapiens engrailed homeobox 2 (EN2), [NM_001427]
ENST00000302153	A_33_P3421907	2,40	0,00232	0,00204	Putative uncharacterized protein ENSP00000305638 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:B6ZDQ1] [ENST00000302153]
ENST00000344692	A_33_P3285715	2,30	0,00497	0,00483	zinc finger protein 41 homolog (mouse) [Source:HGNC Symbol;Acc:26786] [ENST00000344692]
ENST00000370177	A_33_P3218797	2,47	0,00189	0,001	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog (zebrafish) [Source:HGNC Symbol;Acc:16142] [ENST00000370177]
ENST00000373815	A_33_P3218787	2,50	0,0028	0,00083	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) [Source:HGNC Symbol;Acc:494] [ENST00000373815]
ENST00000373844	A_33_P3257558	-3,37	0,00156	0,00018	centrosomal protein 110kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:1858] [ENST00000373844]
ENST00000377293	A_33_P3395798	2,40	0,00417	0,00196	Uncharacterized protein C20orf26 [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q8NHU2] [ENST00000377293]
ENST00000378430	A_33_P3417222	2,48	0,00218	0,00201	CD72 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:1696] [ENST00000378430]
ENST00000379848	A_23_P316085	2,05	0,00303	0,00013	Q9HIT1_HUMAN (Q9HIT1) O1THUMP00000018258, complete [THC2708636]
ENST00000390293	A_33_P3398719	2,08	0,00873	0,00481	immunoglobulin lambda variable 5-48 (non-functional) [Source:HGNC Symbol;Acc:5925] [ENST00000390293]
ENST00000411873	A_23_P333129	2,12	0,00374	0,00283	D4S2463 homeobox-like Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q13060] [ENST00000411873]
ENST00000416328	A_33_P3212769	2,28	0,00203	0,00436	LOC100132686 protein [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:Q8NEQ1] [ENST00000416328]
EXOC8	A_33_P3397051	-2,08	0,00198	0,00023	Homo sapiens exocyst complex component 8 (EXOC8), [NM_175876]
FAM122B	A_33_P3691860	-2,01	0,00552	0,00027	Homo sapiens family with sequence similarity 122B (FAM122B), transcript variant 2, [NM_001166599]
FAM5B	A_23_P35277	2,16	0,00081	0,00288	Homo sapiens family with sequence similarity 5, member B (FAM5B), [NM_021165]
FBXO11	A_24_P357536	-2,03	0,00757	0,0001	Homo sapiens F-box protein 11 (FBXO11), transcript variant 3, [NM_012167]
FGF20	A_23_P395404	2,04	0,00964	0,00468	Homo sapiens fibroblast growth factor 20 (FGF20), [NM_019851]
FGFR1OP2	A_33_P3369262	-2,32	0,00679	0,00018	Homo sapiens FGFR1 oncogene partner 2 (FGFR1OP2), transcript variant 1, [NM_015633]
FLJ43860	A_33_P3227686	2,32	0,00074	0,00032	Homo sapiens FLJ43860 protein (FLJ43860), [NM_207414]
FOXE1	A_33_P3226357	2,69	0,00399	0,00142	Homo sapiens forkhead box E1 (thyroid transcription factor 2) (FOXE1), [NM_004473]
GAPDHS	A_23_P67646	4,59	0,00713	0,00618	Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic (GAPDHS), [NM_014364]
GBAP1	A_32_P512061	2,11	0,00263	0,00001	Homo sapiens glucosidase, beta, acid pseudogene 1 (GBAP1), non-coding RNA [NR_002188]

GMFB	A_23_P205611	-2,12	0,00605	0,00014	Homo sapiens glia maturation factor, beta (GMFB), [NM_004124]
GOLGA5	A_23_P3193	-2,14	0,0021	0,00002	Homo sapiens golgin A5 (GOLGA5), [NM_005113]
GPLD1	A_33_P3375467	2,22	0,00189	0,00384	Homo sapiens glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1 (GPLD1), transcript variant 2, [NM_177483]
GREB1L	A_33_P3271470	2,12	0,00088	0,00724	Homo sapiens growth regulation by estrogen in breast cancer-like (GREB1L), [NM_001142966]
H2AFV	A_23_P316487	-2,62	0,0049	0,00005	Homo sapiens H2A histone family, member V (H2AFV), transcript variant 2, [NM_138635]
hCG_1814486	A_32_P200308	2,16	0,00091	0,00252	full-length cDNA clone CSODH002YE19 of T cells (Jurkat cell line) of Homo sapiens (human). [CR600271]
HERC4	A_23_P202408	-2,13	0,00373	0,00004	Homo sapiens hect domain and RLD 4 (HERC4), transcript variant 1, [NM_022079]
HIF1A	A_33_P3231277	-2,68	0,00074	0,00008	Homo sapiens hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A), transcript variant 2, [NM_181054]
HIF3A	A_33_P3338152	2,63	0,00578	0,00577	Homo sapiens HIF-3A4 for hypoxia-inducible factor-3 alpha 4, complete cds. [AB118749]
HIRA	A_23_P154938	-2,33	0,00461	0,00001	Homo sapiens HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae) (HIRA), [NM_003325]
HISPPD1	A_23_P213661	-2,06	0,00576	0,00003	Homo sapiens histidine acid phosphatase domain containing 1 (HISPPD1), [NM_015216]
HMG20B	A_33_P3394599	2,38	0,00766	0,00111	Homo sapiens high-mobility group 20B (HMG20B), [NM_006339]
HNRNPH2	A_33_P3255647	-2,23	0,00596	0,00222	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H') (HNRNPH2), transcript variant 1, [NM_019597]
HOXA10	A_33_P3288649	3,80	0,00431	0,00421	Homo sapiens homeobox A10 (HOXA10), transcript variant 1, [NM_018951]
HPS3	A_23_P40821	-2,27	0,0051	0,00006	Homo sapiens Hermansky-Pudlak syndrome 3 (HPS3), [NM_032383]
HPVC1	A_33_P3390955	2,65	0,00444	0,00056	Homo sapiens human papillomavirus (type 18) E5 central sequence-like 1 (HPVC1), non-coding RNA [NR_004422]
HTN3	A_23_P212945	2,00	0,00304	0,00492	Homo sapiens histatin 3 (HTN3), [NM_000200]
IHH	A_33_P3338698	2,09	0,00272	0,00038	Homo sapiens Indian hedgehog homolog (Drosophila) (IHH), [NM_002181]
IMPA1	A_33_P3370109	-3,78	0,00114	0,00002	Homo sapiens inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (IMPA1), transcript variant 3, [NM_001144879]
IQSEC3	A_33_P3209581	3,84	0,00113	0,00075	Homo sapiens IQ motif and Sec7 domain 3 (IQSEC3), transcript variant 1, [NM_001170738]
KAT2B	A_32_P159651	-2,03	0,00238	0,00002	Homo sapiens K(lysine) acetyltransferase 2B (KAT2B), [NM_003884]
KCNK12	A_33_P3256510	2,10	0,00703	0,00009	Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 12 (KCNK12), [NM_022055]
KDM4C	A_23_P112201	-2,24	0,00035	0,00001	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 4C (KDM4C), transcript variant 1, [NM_015061]
LCE1A	A_23_P404685	2,22	0,00347	0,00333	Homo sapiens late cornified envelope 1A (LCE1A), [NM_178348]
LEPR	A_24_P231104	-2,98	0,00431	0,00015	Homo sapiens leptin receptor (LEPR), transcript variant 3, [NM_001003679]
LOC100128107	A_33_P3272347	2,47	0,0097	0,00454	Homo sapiens cDNA FLJ41726 fis, clone HLUNG2014449. [AK123720]
LOC100129196	A_33_P3387170	2,37	0,0051	0,0045	Homo sapiens, clone IMAGE:6042806, . [BC044253]
LOC100129235	A_33_P3234764	2,03	0,00909	0,00457	Homo sapiens cDNA FLJ27410 fis, clone WMC04875. [AK130920]
LOC100129702	A_33_P3374365	2,37	0,00034	0,00003	PREDICTED: Homo sapiens similar to RAB40A, member RAS oncogene family, [XM_001717980]
LOC100131830	A_33_P3421178	2,25	0,0021	0,00585	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100131830, [XM_001718976]

LOC100287699	A_33_P3261433	2,32	0,00605	0,00317	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC100287699, [XM_002342211]
LOC253573	A_33_P3804022	2,02	0,0036	0,002	Homo sapiens cDNA FLJ32735 fis, clone TESTI2001229. [AK057297]
LOC285768	A_33_P3773168	2,03	0,00152	0,00144	Homo sapiens hypothetical LOC285768, non-coding RNA [NR_027115]
LOC388564	A_33_P3362153	2,57	0,00237	0,00314	Homo sapiens hypothetical gene supported by BC052596, (cDNA clone IMAGE:6728287). [BC052596]
LOC644070	A_33_P3275893	2,91	0,00034	0,0004	Putative germ cell-specific gene 1-like protein 2 Precursor (GSG1-like protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:A8MUP6] [ENST00000399363]
LOC644794	A_33_P3360863	2,08	0,00449	0,0008	Homo sapiens cDNA FLJ52613 complete cds. [AK301184]
LOC728142	A_32_P167396	-2,08	0,0011	0,00002	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5300185. [BC039399]
LOC729082	A_24_P655268	-2,08	0,00081	0,00004	Homo sapiens hypothetical protein LOC729082, non-coding RNA [NR_026757]
LRRC31	A_24_P240259	2,14	0,00618	0,00434	Homo sapiens leucine rich repeat containing 31 (LRRC31), [NM_024727]
MACF1	A_23_P391778	-2,09	0,0004	0,00006	Homo sapiens microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1), transcript variant 2, [NM_033044]
MAPK6	A_24_P333663	-3,02	0,00234	0,00012	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 6 (MAPK6), [NM_002748]
MAT2B	A_33_P3246543	-2,09	0,00485	0,00188	Homo sapiens methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B), transcript variant 2, [NM_182796]
MED30	A_23_P31866	-2,56	0,00035	0,00008	Homo sapiens mediator complex subunit 30 (MED30), [NM_080651]
MGEA5	A_24_P67898	-2,02	0,00221	0,00079	Homo sapiens meningioma-expressed antigen 5s splice variant , complete cds. [AF307332]
MOP-1	A_24_P419028	4,39	0,0069	0,00135	Homo sapiens for MOP-1, complete cds. [AB014771]
MTR	A_23_P200936	-2,08	0,00035	0,00002	Homo sapiens 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR), [NM_000254]
MYC	A_23_P215956	-2,06	0,00253	0,00002	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC), [NM_002467]
MYH14	A_23_P78734	2,65	0,0062	0,00141	Homo sapiens myosin, heavy chain 14, non-muscle (MYH14), transcript variant 1, [NM_001077186]
NUDCD1	A_24_P106794	-2,72	0,00551	0,00003	Homo sapiens NudC domain containing 1 (NUDCD1), transcript variant 1, [NM_032869]
OR10A6	A_33_P3418527	2,10	0,00132	0,00024	Homo sapiens olfactory receptor, family 10, subfamily A, member 6 (OR10A6), [NM_001004461]
OSBPL8	A_33_P3254191	-2,38	0,0008	0,00006	Homo sapiens oxysterol binding protein-like 8 (OSBPL8), transcript variant 1, [NM_020841]
OTOR	A_33_P3311830	2,39	0,00143	0,00567	Homo sapiens otoraplin (OTOR), [NM_020157]
OXSRI	A_23_P418413	-2,00	0,00002	0,00002	Homo sapiens oxidative-stress responsive 1 (OXSRI), [NM_005109]
PDIA4	A_23_P42802	-2,03	0,00563	0,00002	Homo sapiens protein disulfide isomerase family A, member 4 (PDIA4), [NM_004911]
PGM2	A_23_P7172	-2,15	0,00172	0,00004	Homo sapiens phosphoglucomutase 2 (PGM2), [NM_018290]
PHF3	A_23_P70371	-2,02	0,00432	9,80E-06	Homo sapiens PHD finger protein 3 (PHF3), [NM_015153]
PKHD1	A_33_P3387420	2,06	0,00437	0,00044	Homo sapiens polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive) (PKHD1), transcript variant 1, [NM_138694]
PLCH1	A_23_P339240	2,17	0,00418	0,0074	Homo sapiens phospholipase C, eta 1 (PLCH1), transcript variant 2, [NM_014996]
POLI	A_23_P306890	-2,11	0,00143	0,00009	Homo sapiens polymerase (DNA directed) iota (POLI), [NM_007195]
PPP1R2	A_33_P3306964	-2,04	0,00727	0,00076	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2 (PPP1R2), [NM_006241]

PRKDC	A_33_P3337599	-3,37	0,00364	0,00004	Homo sapiens protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide (PRKDC), transcript variant 1, [NM_006904]
PRPF8	A_23_P38219	2,14	0,00114	0,0001	Homo sapiens PRP8 pre-processing factor 8 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (PRPF8), [NM_006445]
PRPS2	A_23_P96641	-2,04	0,00049	0,00004	Homo sapiens phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2 (PRPS2), transcript variant 1, [NM_001039091]
PSMB11	A_33_P3229375	2,12	0,00419	0,00012	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 11 (PSMB11), [NM_001099780]
PTMS	A_33_P3333038	2,46	0,00046	0,00044	Homo sapiens parathyrosin (PTMS), [NM_002824]
PTP4A1	A_23_P81770	-2,52	0,00034	0,00004	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), [NM_003463]
PTP4A1	A_24_P252043	-2,09	0,00154	0,00004	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), [NM_003463]
PUM2	A_24_P71439	-2,04	0,00896	0,00002	Homo sapiens pumilio homolog 2 (<i>Drosophila</i>) (PUM2), [NM_015317]
RAB18	A_33_P3299754	-2,03	0,00637	0,00021	Homo sapiens RAB18, member RAS oncogene family (RAB18), [NM_021252]
RAPGEF6	A_23_P144999	-3,32	0,00656	0,00002	Homo sapiens Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6 (RAPGEF6), transcript variant 2, [NM_016340]
RBM16	A_23_P111303	-2,29	0,00074	9,56E-06	Homo sapiens RNA binding motif protein 16 (RBM16), [NM_014892]
RBM22	A_23_P92895	-2,27	0,00034	0,00022	Homo sapiens RNA binding motif protein 22 (RBM22), [NM_018047]
RC3H1	A_33_P3288774	-2,23	0,00213	0,00009	Homo sapiens ring finger and CCCH-type zinc finger domains 1 (RC3H1), [NM_172071]
RFK	A_23_P216708	-2,13	0,00044	0,00004	Homo sapiens riboflavin kinase (RFK), [NM_018339]
RNF165	A_24_P348083	2,14	0,00684	0,00568	Homo sapiens cDNA FLJ90080 fis, clone HEMBA1004797. [AK074561]
RRP7B	A_24_P242036	2,18	0,00313	0,00111	Homo sapiens ribosomal RNA processing 7 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (RRP7B), non-coding RNA [NR_002184]
RWDD3	A_23_P933	-2,05	0,00785	0,00014	Homo sapiens RWD domain containing 3 (RWDD3), transcript variant 1, [NM_015485]
S100A10	A_23_P137984	-2,07	0,00379	0,00005	Homo sapiens S100 calcium binding protein A10 (S100A10), [NM_002966]
SCGB1D1	A_23_P127781	3,17	0,00085	0,00043	Homo sapiens secretoglobin, family 1D, member 1 (SCGB1D1), [NM_006552]
SCGB3A1	A_33_P3210379	2,36	0,00649	0,00637	Homo sapiens secretoglobin, family 3A, member 1 (SCGB3A1), [NM_052863]
SCYL2	A_33_P3292829	-2,14	0,00208	0,00002	Homo sapiens SCY1-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (SCYL2), [NM_017988]
SEC24B	A_23_P69683	-2,85	0,00087	9,41E-06	Homo sapiens SEC24 family, member B (<i>S. cerevisiae</i>) (SEC24B), transcript variant 1, [NM_006323]
SECISBP2L	A_24_P82135	-2,20	0,00986	0,00014	Homo sapiens SECIS binding protein 2-like (SECISBP2L), [NM_014701]
SIM2	A_23_P301886	3,60	0,0021	0,00587	Homo sapiens single-minded homolog 2 (<i>Drosophila</i>) (SIM2), transcript variant SIM2s, [NM_009586]
SLC18A2	A_23_P52499	2,35	0,00088	0,00264	Homo sapiens solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 (SLC18A2), [NM_003054]
SLC22A3	A_32_P309404	2,82	0,00155	0,00997	Homo sapiens solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3 (SLC22A3), [NM_021977]
SLC25A43	A_23_P125668	-2,50	0,00753	9,80E-06	Homo sapiens solute carrier family 25, member 43 (SLC25A43), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_145305]
SLC33A1	A_33_P3251108	-2,22	0,00734	0,00002	Homo sapiens solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1 (SLC33A1), [NM_004733]
SLC38A2	A_23_P218079	-2,41	0,00828	0,00004	Homo sapiens solute carrier family 38, member 2 (SLC38A2), [NM_018976]

SMAD4	A_23_P27346	-2,37	0,00035	0,00003	Homo sapiens SMAD family member 4 (SMAD4), [NM_005359]
SMARCA5	A_23_P256716	-3,17	0,00074	9,80E-06	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 (SMARCA5), [NM_003601]
SNORD3B-1	A_33_P3252333	-2,08	0,00074	0,00005	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 (SNORD3B-1), small nucleolar RNA [NR_003271]
SNRPE	A_33_P3320152	-2,15	0,00753	0,00048	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E (SNRPE), [NM_003094]
SORBS3	A_33_P3409625	2,53	0,00525	0,00179	Homo sapiens sorbin and SH3 domain containing 3 (SORBS3), transcript variant 1, [NM_005775]
SPINK7	A_23_P213832	3,27	0,00078	0,00015	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative) (SPINK7), [NM_032566]
SPTY2D1	A_23_P328237	-2,11	0,00678	0,00002	Homo sapiens SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (SPTY2D1), [NM_194285]
SPTY2D1	A_23_P429082	-2,56	0,00146	0,00018	Homo sapiens SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (SPTY2D1), [NM_194285]
SRPK2	A_23_P406438	-2,05	0,00311	0,00002	Homo sapiens SFRS protein kinase 2 (SRPK2), transcript variant 2, [NM_182691]
STT3B	A_23_P434473	-2,17	0,00509	0,00027	Homo sapiens STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (STT3B), [NM_178862]
SUMO3	A_23_P102937	-2,12	0,00022	0,00003	Homo sapiens SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (<i>S. cerevisiae</i>) (SUMO3), [NM_006936]
SWAP70	A_33_P3349651	-2,16	0,00999	0,00012	Homo sapiens SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit (SWAP70), [NM_015055]
TAB3	A_32_P162150	-2,04	0,00548	0,00004	Homo sapiens TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3 (TAB3), [NM_152787]
TAF1B	A_23_P165891	-2,01	0,00154	0,00002	Homo sapiens TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa (TAF1B), [NM_005680]
TAS2R4	A_23_P20101	2,05	0,00691	0,00392	Homo sapiens taste receptor, type 2, member 4 (TAS2R4), [NM_016944]
TCF12	A_24_P82142	-2,46	0,00068	0,00001	Homo sapiens transcription factor 12 (TCF12), transcript variant 4, [NM_207038]
TDG	A_33_P3357445	-2,57	0,00383	0,00009	Homo sapiens thymine-DNA glycosylase (TDG), [NM_003211]
TFEC	A_32_P184394	-2,27	0,00242	0,00006	Homo sapiens transcription factor EC (TFEC), transcript variant 1, [NM_012252]
THC2547729	A_33_P3365701	2,18	0,00589	0,0063	Q7SFQ1_NEUCR (Q7SFQ1) Predicted protein, partial (13%) [THC2547729]
THC2678181	A_33_P3285275	2,37	0,00063	0,00092	Q5VWD6_HUMAN (Q5VWD6) Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit, complete [THC2678181]
TLE4	A_23_P94494	-2,84	0,00432	0,00001	Homo sapiens transducin-like enhancer of split 4 (E(sp)1) homolog, Drosophila (TLE4), [NM_007005]
TM6SF1	A_33_P3310784	-2,67	0,00252	0,00045	Homo sapiens transmembrane 6 superfamily member 1 (TM6SF1), transcript variant 1, [NM_023003]
TNRC18	A_33_P3321507	3,04	0,0001	0,00013	Homo sapiens trinucleotide repeat containing 18 (TNRC18), [NM_001080495]
TOR2A	A_33_P3275835	2,99	0,00919	0,00358	Homo sapiens torsin family 2, member A (TOR2A), transcript variant 3, [NM_001134430]
TPSG1	A_23_P26294	2,07	0,00817	0,00324	Homo sapiens tryptase gamma 1 (TPSG1), [NM_012467]
TTC13	A_23_P103864	-2,35	0,00431	7,95E-06	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 13 (TTC13), transcript variant 1, [NM_024525]
TUBA3D	A_23_P56736	2,64	0,00625	0,00235	Homo sapiens tubulin, alpha 3d (TUBA3D), [NM_080386]
U80770	A_24_P484965	2,30	0,00091	0,00317	Human EST clone 251800 mariner transposon Hsmar1 sequence. [U80770]
UBR3	A_24_P285501	-2,34	0,00649	0,00136	Homo sapiens ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 3 (putative) (UBR3), [NM_172070]

USP26	A_23_P158118	2,49	0,00643	0,00239	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 26 (USP26), [NM_031907]
USP44	A_23_P72770	2,17	0,0011	0,00182	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 44 (USP44), transcript variant 1, [NM_032147]
USP46	A_24_P377225	-2,58	0,00878	0,00002	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 46 (USP46), transcript variant 1, [NM_022832]
VBPI	A_23_P256223	-2,09	0,00483	0,00005	Homo sapiens von Hippel-Lindau binding protein 1 (VBPI), [NM_003372]
WDFY1	A_23_P502797	-2,30	0,00058	0,00004	Homo sapiens WD repeat and FYVE domain containing 1 (WDFY1), [NM_020830]
WHAMM	A_33_P3315475	-2,11	0,00035	0,00002	Homo sapiens WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules (WHAMM), [NM_001080435]
XIAP	A_33_P3231187	-3,29	0,0013	0,00046	Homo sapiens X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), [NM_001167]
YWHAE	A_24_P33444	-2,46	0,00674	0,00018	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (YWHAE), transcript variant 1, [NM_006761]
ZC3H13	A_33_P3281139	-2,22	0,00618	0,00007	Homo sapiens cDNA FLJ10953 fis, clone PLACE1000380, highly similar to Zinc finger CCCH domain-containing protein 13. [AK001815]
ZDHHC21	A_24_P374427	-2,61	0,00735	0,00005	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 21 (ZDHHC21), [NM_178566]
ZNF124	A_23_P52176	-2,48	0,00595	3,53E-06	Homo sapiens zinc finger protein 124 (ZNF124), [NM_003431]
ZNF189	A_24_P89872	-2,16	0,00385	0,00003	Homo sapiens zinc finger protein 189 (ZNF189), transcript variant 2, [NM_197977]
ZNF227	A_23_P371011	-2,79	0,00115	0,00002	Homo sapiens zinc finger protein 227 (ZNF227), [NM_182490]
ZNF25	A_23_P381577	-2,67	0,00154	0,00017	Homo sapiens zinc finger protein 25 (ZNF25), [NM_145011]
ZNF451	A_33_P3257528	-2,19	0,00456	0,00002	Homo sapiens zinc finger protein 451 (ZNF451), transcript variant 2, [NM_015555]
ZNF467	A_24_P218074	2,39	0,00068	0,00027	Homo sapiens zinc finger protein 467 (ZNF467), [NM_207336]
ZNF491	A_23_P410725	2,08	0,00087	0,0002	Homo sapiens zinc finger protein 491 (ZNF491), [NM_152356]
ZNF738	A_32_P68148	-2,55	0,0008	0,00063	Homo sapiens zinc finger protein 738 (ZNF738), non-coding RNA [NR_027130]
ZNF791	A_24_P382401	-3,26	0,00735	0,00002	Homo sapiens zinc finger protein 791 (ZNF791), [NM_153358]
	A_33_P3226492	-2,05	0,00034	0,00011	Unknown
	A_33_P3395788	2,19	0,0004	0,00935	Unknown
	A_33_P3377705	2,00	0,00277	0,00806	Unknown
	A_33_P3248997	2,10	0,00351	0,00805	Unknown
	A_33_P3218741	2,00	0,00296	0,00287	Unknown

Tabelle 15: Signifikant unterschiedlich regulierte Gene humaner Primärmakrophagen nach einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 im Vergleich zu *S. Choleraesuis* A50 – infizierten Zellen. Selektiert wurden Gene mit mindestens einer zweifachen Hoch- oder Herabregulation (FC, fold changes), die sowohl im Vergleich aller Einzelexperimente mittels Zweistichproben t-Test (2sT) als auch im Vergleich der Mittelwerte aus den Einzelexperimenten mittels Einstichproben t-Test (1sT) sich als signifikant ($p \leq 0,01$) erwiesen.

Kurzbezeichnung	Sequenz Code (Agilent)	FC	p-Wert (2sT Einzel-experimente)	p-Wert (1sT ratios)	Beschreibung
ABCB10	A_32_P23624	-2,19	0,00831	0,00168	Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10 (ABCB10), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_012089]
ACAT1	A_24_P203678	-2,25	0,00649	3,50E-06	Homo sapiens acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (ACAT1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_000019]
ADPRHL2	A_23_P34568	2,08	0,00384	0,00003	Homo sapiens ADP-ribosylhydrolase like 2 (ADPRHL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_017825]
AGPHD1	A_33_P3257538	2,18	0,0004	0,00004	Homo sapiens aminoglycoside phosphotransferase domain containing 1 (AGPHD1), transcript variant 2, [NM_001083612]
AIDA	A_23_P97457	-2,36	0,00009	8,20E-06	Homo sapiens axin interactor, dorsalization associated (AIDA), [NM_022831]
AK124658	A_33_P3267160	-4,02	0,00718	0,00005	Homo sapiens cDNA FLJ42667 fis, clone BRAMY2020058. [AK124658]
AK3	A_24_P247106	-2,58	0,00718	3,86E-06	Homo sapiens adenylate kinase 3 (AK3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_016282]
AKAP9	A_33_P3380211	-3,08	0,0005	0,00002	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9 (AKAP9), transcript variant 2, [NM_005751]
ANP32E	A_23_P160934	-2,32	0,00002	3,86E-06	Homo sapiens acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E (ANP32E), transcript variant 1, [NM_030920]
API5	A_24_P312692	-2,34	0,00166	0,00002	Homo sapiens apoptosis inhibitor 5 (API5), transcript variant 2, [NM_006595]
ARGLU1	A_23_P162782	-2,11	0,0006	0,00004	Homo sapiens arginine and glutamate rich 1 (ARGLU1), [NM_018011]
ARHGAP21	A_23_P115608	-2,07	0,00022	0,00003	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 21 (ARHGAP21), [NM_020824]
ARHGAP21	A_33_P3319401	-3,07	0,00603	0,00044	Homo sapiens cDNA FLJ90108 fis, clone HEMBA1006517. [AK074589]
ARHGAP5	A_33_P3386453	-2,71	0,0079	0,00002	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 5 (ARHGAP5), transcript variant 1, [NM_001030055]
ATG2B	A_33_P3342160	-2,01	0,00281	0,00007	Homo sapiens ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae) (ATG2B), [NM_018036]
ATMIN	A_24_P176493	-2,38	0,00164	0,00002	Homo sapiens ATM interactor (ATMIN), [NM_015251]
ATP6AP2	A_23_P11353	-2,01	0,00033	0,00002	Homo sapiens ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2 (ATP6AP2), [NM_005765]
AW503309	A_33_P3389802	-2,44	0,00046	0,00001	UI-HF-BN0-akx-b-12-0-UIr1 NIH_MGC_50 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3078502 5', sequence [AW503309]
AX746964	A_33_P3393751	2,51	0,00546	0,00125	Sequence 489 from Patent EP1308459. [AX746964]
B3GNT2	A_23_P500956	-2,04	0,00072	0,00012	Homo sapiens UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GNT2), [NM_006577]
B4GALT6	A_24_P228228	-2,65	0,00648	0,0003	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6 (B4GALT6), [NM_004775]
BAG4	A_23_P146217	-2,11	0,00249	0,00029	Homo sapiens BCL2-associated athanogene 4 (BAG4), [NM_004874]
BARX1	A_23_P32279	2,21	0,00539	0,00151	Homo sapiens BARX homeobox 1 (BARX1), [NM_021570]
BC040838	A_33_P3240763	2,42	0,00491	0,00083	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5302821. [BC040838]
BC045716	A_32_P191895	-2,24	0,0021	0,00004	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5261156. [BC045716]
BC067112	A_33_P3574055	-2,57	0,00427	0,00002	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5737211. [BC067112]
BLZF1	A_24_P119259	-3,00	0,00328	3,16E-06	Homo sapiens basic leucine zipper nuclear factor 1 (BLZF1), [NM_003666]

BPTF	A_33_P3269453	-2,01	0,00049	0,00001	Homo sapiens bromodomain PHD finger transcription factor, (cDNA clone IMAGE:5113116), with apparent retained intron. [BC039881]
BRCC3	A_33_P3385461	-2,29	0,0026	3,09E-06	Homo sapiens BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3 (BRCC3), transcript variant 2, [NM_001018055]
BTG3	A_23_P80068	-2,00	0,00031	7,01E-06	Homo sapiens BTG family, member 3 (BTG3), transcript variant 2, [NM_006806]
BU584355	A_33_P3334275	2,31	0,00386	0,00014	3596278H1 FIBPNOT01 Homo sapiens cDNA clone 3596278 5', sequence [BU584355]
BUB3	A_23_P320658	-2,34	0,00067	4,21E-06	Homo sapiens budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast) (BUB3), transcript variant 1, [NM_004725]
BX106347	A_33_P3842629	2,65	0,00501	0,00191	BX106347 NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998I212230, sequence [BX106347]
C10orf90	A_32_P191441	-3,14	0,00918	0,00576	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 90 (C10orf90), [NM_001004298]
C12orf11	A_23_P36464	-2,80	0,00206	0,00017	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 11 (C12orf11), [NM_018164]
C12orf11	A_33_P3232280	-2,41	0,00017	3,09E-06	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 11 (C12orf11), [NM_018164]
C14orf106	A_23_P364107	-2,04	0,00125	0,00013	Homo sapiens chromosome 14 open reading frame 106 (C14orf106), [NM_018353]
C16orf92	A_32_P48559	2,34	0,00248	0,00017	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 92 (C16orf92), transcript variant 2, [NM_001109660]
C17orf57	A_33_P3307013	-2,24	0,00362	0,00388	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 57 (C17orf57), [NM_152347]
C17orf70	A_23_P113417	2,10	0,00757	5,38E-06	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 70 (C17orf70), transcript variant 2, [NM_025161]
C1orf103	A_23_P160689	-2,19	0,00721	6,24E-06	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 103 (C1orf103), transcript variant 1, [NM_018372]
C1orf152	A_33_P3345743	-2,05	0,00112	0,00148	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 152 (C1orf152), non-coding RNA [NR_003242]
C1orf213	A_33_P3363720	2,04	0,00091	0,00371	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 213 (C1orf213), transcript variant 2, [NM_001008896]
C20orf151	A_32_P331052	2,14	0,00201	0,00066	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 151 (C20orf151), [NM_080833]
C3orf23	A_23_P319874	-2,81	0,00325	0,00026	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 23 (C3orf23), transcript variant 3, [NM_001029840]
C4orf10	A_33_P3374264	2,90	0,00026	0,00265	Homo sapiens chromosome 4 open reading frame 10 (C4orf10), non-coding RNA [NR_015453]
C6orf123	A_33_P3233499	3,15	0,00059	0,00033	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 123 (C6orf123), non-coding RNA [NR_026773]
C6orf145	A_24_P272290	2,03	0,00384	0,00002	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 145 (C6orf145), [NM_183373]
C6orf211	A_33_P3294836	-2,24	0,00092	7,93E-06	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 211 (C6orf211), [NM_024573]
C7orf58	A_24_P187799	-2,39	0,00867	0,00044	Homo sapiens chromosome 7 open reading frame 58 (C7orf58), transcript variant 1, [NM_024913]
C9orf102	A_33_P3269598	-2,06	0,00849	0,00005	Homo sapiens ; cDNA DKFZp434O1521 (from clone DKFZp434O1521). [AL133663]
C9orf40	A_24_P43876	-2,17	0,00441	0,00004	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 40 (C9orf40), [NM_017998]
CAB39	A_23_P79426	-2,52	0,00341	8,56E-06	Homo sapiens calcium binding protein 39 (CAB39), [NM_016289]
CALM1	A_24_P313186	-2,01	0,00283	0,00005	Homo sapiens calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta) (CALM1), transcript variant 1, [NM_006888]
CALY	A_33_P3318646	2,38	0,00625	0,00016	Homo sapiens calcyon neuron-specific vesicular protein (CALY), [NM_015722]
CASD1	A_33_P3231120	-2,26	0,00396	0,00012	Homo sapiens CAS1 domain containing 1 (CASD1), [NM_022900]

CASKIN1	A_33_P3349552	2,44	0,00708	0,00086	Homo sapiens CASK interacting protein 1 (CASKIN1), [NM_020764]
CASP3	A_33_P3278118	-2,21	1,47E-06	0,00004	Homo sapiens caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP3), transcript variant alpha, [NM_004346]
CASP8	A_24_P148499	-2,01	0,00099	0,00002	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP8), transcript variant E, [NM_033358]
CASP8AP2	A_33_P3382959	-2,02	0,00011	0,00008	Homo sapiens caspase 8 associated protein 2 (CASP8AP2), transcript variant 1, [NM_012115]
CCBL2	A_33_P3318696	-2,25	0,00031	0,00001	Homo sapiens cysteine conjugate-beta lyase 2 (CCBL2), transcript variant 1, [NM_001008661]
CCDC144A	A_33_P3390580	-2,09	0,00044	0,00003	Homo sapiens coiled-coil domain containing 144A (CCDC144A), [NM_014695]
CCDC47	A_24_P61864	-2,16	0,00059	7,31E-06	Homo sapiens coiled-coil domain containing 47 (CCDC47), [NM_020198]
CCL25	A_33_P3312242	2,16	0,00836	0,00321	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 25 (CCL25), [NM_005624]
CCNT2	A_24_P174341	-2,68	0,0008	0,00002	Homo sapiens cyclin T2 (CCNT2), transcript variant b, [NM_058241]
CD46	A_23_P35230	-2,38	0,00193	0,00002	Homo sapiens CD46 molecule, complement regulatory protein (CD46), transcript variant n, [NM_172350]
CDC27	A_33_P3360718	-2,88	0,00007	0,00002	Homo sapiens cell division cycle 27 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CDC27), transcript variant 1, [NM_001114091]
CEP170	A_24_P36944	-2,13	0,00053	0,00006	Homo sapiens centrosomal protein 170kDa (CEP170), transcript variant alpha, [NM_014812]
CEP350	A_33_P3244872	-2,10	0,00252	0,00012	Homo sapiens centrosomal protein 350kDa (CEP350), [NM_014810]
CHD1	A_23_P70201	-2,10	0,00011	1,55E-06	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 1 (CHD1), [NM_001270]
CHD2	A_24_P85317	-2,36	0,00415	0,00019	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 2 (CHD2), transcript variant 2, [NM_001042572]
CHD9	A_24_P942250	-2,01	0,00445	0,0003	Homo sapiens chromodomain helicase DNA binding protein 9 (CHD9), [NM_025134]
CHORDC1	A_33_P3502037	-2,45	0,00112	0,00006	Homo sapiens cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing 1 (CHORDC1), transcript variant 1, [NM_012124]
CISD3	A_33_P3362636	3,31	0,00919	0,00031	Homo sapiens CDGSH iron sulfur domain 3 (CISD3), [NM_001136498]
CLK1	A_33_P3211513	-2,12	0,00046	0,00003	Homo sapiens CDC-like kinase 1 (CLK1), transcript variant 2, [NM_001162407]
CMAS	A_32_P73045	-2,02	0,00351	5,69E-06	Homo sapiens cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase (CMAS), [NM_018686]
CN285977	A_33_P3396851	3,65	0,00338	0,0008	17000532196378 GRN_ES Homo sapiens cDNA 5', sequence [CN285977]
CNTLN	A_33_P3296240	-2,32	0,0001	0,00002	Homo sapiens centlein, centrosomal protein (CNTLN), transcript variant 1, [NM_017738]
CRNKL1	A_24_P40229	-2,14	0,00059	0,00001	Homo sapiens crooked neck pre-splicing factor-like 1 (<i>Drosophila</i>) (CRNKL1), [NM_016652]
CRY1	A_24_P407235	-3,05	0,00055	0,00001	Homo sapiens cryptochrome 1 (photolyase-like) (CRY1), [NM_004075]
CSDA	A_24_P625382	-2,00	0,00017	3,86E-06	Homo sapiens cold shock domain protein A (CSDA), transcript variant 1, [NM_003651]
CT47A11	A_32_P207124	2,95	0,00504	0,00008	Homo sapiens cancer/testis antigen family 47, member A11 (CT47A11), [NM_173571]
CTAGE5	A_24_P333326	-4,29	0,00155	4,21E-06	Homo sapiens CTAGE family, member 5 (CTAGE5), [NM_203355]
CWC22	A_23_P373799	-2,33	0,00363	0,00003	Homo sapiens CWC22 spliceosome-associated protein homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (CWC22), [NM_020943]
CXorf15	A_23_P146997	-2,40	0,00105	3,09E-06	Homo sapiens chromosome X open reading frame 15 (CXorf15), transcript variant 1, [NM_018360]
CYLD	A_33_P3251771	-2,08	0,00991	0,00009	Homo sapiens cylindromatosis (turban tumor syndrome) (CYLD), transcript variant 1, [NM_015247]

CYP19A1	A_32_P86289	3,41	0,00049	0,00005	Homo sapiens cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), transcript variant 2, [NM_031226]
DA372173	A_33_P3363001	2,54	0,00782	0,00129	DA372173 BRTHA2 Homo sapiens cDNA clone BRTHA2002342 5', sequence [DA372173]
DCK	A_24_P89080	-4,11	0,00128	0,00002	Homo sapiens deoxycytidine kinase (DCK), [NM_000788]
DDX59	A_24_P156886	-2,19	0,0001	6,24E-06	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59 (DDX59), [NM_001031725]
DEFB116	A_33_P3278689	2,87	0,00867	0,00083	Homo sapiens defensin, beta 116 (DEFB116), [NM_001037731]
DEFB127	A_23_P385843	2,52	0,00615	0,00061	Homo sapiens defensin, beta 127 (DEFB127), [NM_139074]
DENND1B	A_23_P201605	-2,01	1,88E-06	0,00002	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 1B (DENND1B), transcript variant 2, [NM_144977]
DLG1	A_33_P3224380	-2,09	0,00324	0,00002	Homo sapiens discs, large homolog 1 (Drosophila) (DLG1), transcript variant 1, [NM_001098424]
DMXL2	A_23_P327361	-2,09	0,00575	0,00001	Homo sapiens Dmx-like 2 (DMXL2), [NM_015263]
DNAJB4	A_24_P393958	-2,55	0,00252	0,00004	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4 (DNAJB4), [NM_007034]
DNM1	A_33_P3329419	2,11	0,00289	0,00021	Homo sapiens dynamin 1 (DNM1), transcript variant 1, [NM_004408]
DSCAM	A_23_P211141	2,35	0,00191	0,00072	Homo sapiens Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM), transcript variant 1, [NM_001389]
DUSP1	A_23_P110712	-2,09	0,00276	0,00025	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), [NM_004417]
DYRK1A	A_33_P3406998	-2,13	0,00523	0,00155	Homo sapiens dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A), transcript variant 5, [NM_130438]
EAF1	A_24_P941930	-2,01	0,00228	0,00008	Homo sapiens ELL associated factor 1 (EAF1), [NM_033083]
EIF2AK3	A_23_P135857	-2,33	0,00147	0,00004	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3 (EIF2AK3), [NM_004836]
EIF4E	A_32_P203300	-2,01	0,00075	8,43E-06	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E), transcript variant 2, [NM_001130679]
EIF4E3	A_24_P943113	-2,03	0,00365	0,00005	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3 (EIF4E3), transcript variant 2, [NM_173359]
EML4	A_23_P143127	-2,27	0,00002	4,21E-06	Homo sapiens echinoderm microtubule associated protein like 4 (EML4), transcript variant 1, [NM_019063]
ENST00000373844	A_33_P3257558	-2,78	0,00059	0,00004	centrosomal protein 110kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:1858]
ENST00000391568	A_33_P3244279	-2,35	0,00046	0,00054	Unknown
ENST00000398113	A_33_P3209185	2,48	0,00315	8,82E-06	Putative uncharacterized protein ENSP00000381183 Fragment [Source:UniProtKB/TrEMBL;Acc:A8MYM2]
ENST00000398133	A_33_P3253006	2,11	0,00215	0,00213	crystallin, alpha A [Source:HGNC Symbol;Acc:2388]
ENST00000409763	A_33_P3300297	-2,00	0,00529	0,00007	family with sequence similarity 126, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:24587]
ENST00000410117	A_33_P3339388	-2,33	0,00432	0,00001	WAS/WASL interacting protein family, member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:12736]
EP300	A_23_P40693	-2,39	0,00626	0,00001	Homo sapiens E1A binding protein p300 (EP300), [NM_001429]
EVI5	A_23_P34942	-3,39	0,00529	0,00001	Homo sapiens ecotropic viral integration site 5 (EVI5), [NM_005665]
EXOC6	A_32_P58280	-2,08	0,00415	0,00005	Homo sapiens exocyst complex component 6 (EXOC6), transcript variant 1, [NM_019053]
FAM115A	A_32_P56525	-2,05	0,00578	0,00001	Homo sapiens family with sequence similarity 115, member A (FAM115A), [NM_014719]
FAM60A	A_32_P103837	-2,00	0,00753	8,84E-06	Homo sapiens family with sequence similarity 60, member A (FAM60A), transcript variant 2, [NM_021238]

FAM69A	A_33_P3329023	-2,17	0,00829	0,00011	Homo sapiens family with sequence similarity 69, member A (FAM69A), [NM_001006605]
FAM74A1	A_33_P3704738	2,65	0,00109	0,00395	Homo sapiens family with sequence similarity 74, member A1 (FAM74A1), non-coding RNA [NR_026803]
FAM91A1	A_24_P845072	-2,35	0,00001	3,50E-06	Homo sapiens family with sequence similarity 91, member A1 (FAM91A1), [NM_144963]
FBXO11	A_23_P356101	-2,14	0,00068	0,00021	Homo sapiens F-box protein 11 (FBXO11), transcript variant 3, [NM_012167]
FBXO11	A_24_P357536	-2,26	0,0006	0,00006	Homo sapiens F-box protein 11 (FBXO11), transcript variant 3, [NM_012167]
FBXW4	A_23_P342825	2,19	0,00109	5,69E-06	Homo sapiens F-box and WD repeat domain containing 4 (FBXW4), [NM_022039]
FBXW5	A_23_P112397	2,22	0,00763	7,57E-06	Homo sapiens F-box and WD repeat domain containing 5 (FBXW5), [NM_018998]
FGFR1OP2	A_33_P3369262	-2,51	0,00091	0,0001	Homo sapiens FGFR1 oncogene partner 2 (FGFR1OP2), transcript variant 1, [NM_015633]
FIGNL1	A_23_P302681	-2,05	0,00257	0,00004	Homo sapiens fidgetin-like 1 (FIGNL1), transcript variant 1, [NM_001042762]
FMNL2	A_33_P3310552	-2,07	0,00001	0,00002	Homo sapiens cDNA FLJ16308 fis, clone PUAEN2006335. [AK131316]
GALE	A_23_P160154	2,19	0,00776	0,00001	Homo sapiens UDP-galactose-4-epimerase (GALE), transcript variant 1, [NM_000403]
GAPDHS	A_23_P67646	3,60	0,00326	0,00078	Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic (GAPDHS), [NM_014364]
GBAP1	A_32_P512061	2,30	0,00529	8,91E-06	Homo sapiens glucosidase, beta, acid pseudogene 1 (GBAP1), non-coding RNA [NR_002188]
GCC2	A_24_P290502	-2,74	0,0017	3,86E-06	Homo sapiens GRIP and coiled-coil domain containing 2 (GCC2), transcript variant 1, [NM_181453]
GCC2	A_33_P3247933	-2,51	0,00059	8,26E-06	Homo sapiens GRIP and coiled-coil domain containing 2 (GCC2), transcript variant 1, [NM_181453]
GEN1	A_24_P177585	-2,25	0,00221	0,00035	Homo sapiens Gen homolog 1, endonuclease (Drosophila) (GEN1), transcript variant 1, [NM_182625]
GGT1	A_24_P178175	2,11	0,00178	0,00003	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase 1 (GGT1), transcript variant 1, [NM_005265]
GLUL	A_24_P53976	-2,00	0,00347	5,92E-06	Homo sapiens glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase) (GLUL), transcript variant 1, [NM_002065]
GMFB	A_23_P205611	-2,44	0,00227	0,00004	Homo sapiens glia maturation factor, beta (GMFB), [NM_004124]
GOLGA5	A_23_P3193	-2,26	0,0006	8,26E-06	Homo sapiens golgin A5 (GOLGA5), [NM_005113]
GOLIM4	A_24_P191664	-2,45	0,0013	0,00024	Homo sapiens golgi integral membrane protein 4 (GOLIM4), [NM_014498]
GRXCR2	A_33_P3421978	3,74	0,00044	0,00069	Homo sapiens glutaredoxin, cysteine rich 2 (GRXCR2), [NM_001080516]
H2AFV	A_23_P316487	-2,37	0,00056	0,00006	Homo sapiens H2A histone family, member V (H2AFV), transcript variant 2, [NM_138635]
HAO2	A_23_P46105	2,11	0,00763	0,0039	Homo sapiens hydroxyacid oxidase 2 (long chain) (HAO2), [NM_001005783]
HBS1L	A_23_P429092	-2,21	0,00033	0,00006	Homo sapiens HBS1-like (S. cerevisiae) (HBS1L), transcript variant 3, [NM_001145207]
HCFC2	A_23_P25403	-2,08	0,00023	0,00003	Homo sapiens host cell factor C2 (HCFC2), [NM_013320]
HERC4	A_23_P202408	-2,47	0,00029	8,91E-06	Homo sapiens hect domain and RLD 4 (HERC4), transcript variant 1, [NM_022079]
HIAT1	A_23_P45851	-2,01	0,00021	6,19E-06	Homo sapiens hippocampus abundant transcript 1 (HIAT1), [NM_033055]
HIF1A	A_33_P3231277	-3,06	0,00024	5,09E-06	Homo sapiens hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A), transcript variant 2, [NM_181054]
HIPK1	A_32_P231446	-2,01	0,00517	9,79E-06	Homo sapiens homeodomain interacting protein kinase 1 (HIPK1), transcript variant 1, [NM_198268]
HIPK2	A_24_P681011	-2,48	0,00573	0,00003	Homo sapiens homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2), transcript variant 1, [NM_022740]

HIRA	A_23_P154938	-2,45	0,00253	0,00002	Homo sapiens HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) (HIRA), [NM_003325]
HISPPD1	A_23_P213661	-2,25	0,00223	5,69E-06	Homo sapiens histidine acid phosphatase domain containing 1 (HISPPD1), [NM_015216]
HNRNPH2	A_33_P3255647	-2,78	0,0011	9,95E-06	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H') (HNRNPH2), transcript variant 1, [NM_019597]
HPS3	A_23_P40821	-2,12	0,00212	0,00002	Homo sapiens Hermansky-Pudlak syndrome 3 (HPS3), [NM_032383]
HPVC1	A_33_P3390955	3,05	0,00107	0,00008	Homo sapiens human papillomavirus (type 18) E5 central sequence-like 1 (HPVC1), non-coding RNA [NR_004422]
HSD17B12	A_33_P3335042	-2,18	0,00538	0,00003	Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12 (HSD17B12), [NM_016142]
HSP90AA1	A_32_P199252	-2,82	0,00007	0,00004	Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1), transcript variant 1, [NM_001017963]
HSP90AA2	A_33_P3849600	-2,15	0,00011	0,00006	Human heat shock protein 86 , 5'end. [M30627]
HSP90B1	A_33_P3408212	-2,45	0,00059	8,26E-06	Homo sapiens heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1 (HSP90B1), [NM_003299]
HSPA13	A_24_P134392	-2,21	0,00392	0,00002	Homo sapiens heat shock protein 70kDa family, member 13 (HSPA13), [NM_006948]
IFT74	A_23_P255714	-2,09	0,0003	0,00321	Homo sapiens intraflagellar transport 74 homolog (<i>Chlamydomonas</i>) (IFT74), transcript variant 1, [NM_025103]
IL6ST	A_33_P3233834	-2,05	0,00015	0,00003	Homo sapiens interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor) (IL6ST), transcript variant 2, [NM_175767]
IL6ST	A_33_P3233841	-2,14	0,00008	5,69E-06	Homo sapiens interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor) (IL6ST), transcript variant 1, [NM_002184]
IL6ST	A_33_P3287338	-2,64	0,00134	0,00007	Homo sapiens interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor) (IL6ST), transcript variant 2, [NM_175767]
IMPA1	A_33_P3370109	-4,10	0,00042	0,00003	Homo sapiens inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 1 (IMPA1), transcript variant 3, [NM_001144879]
IPO7	A_32_P186226	-2,03	0,00933	0,00015	Homo sapiens importin 7 (IPO7), [NM_006391]
IRAK2	A_33_P3352970	-2,44	0,00044	0,00005	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2), [NM_001570]
IVNS1ABP	A_33_P3280875	-2,53	0,00554	0,00013	Homo sapiens influenza virus NS1A binding protein (IVNS1ABP), [NM_006469]
JMJD1C	A_23_P427217	-2,06	0,00269	3,50E-06	Homo sapiens jumonji domain containing 1C (JMJD1C), transcript variant 1, [NM_032776]
KCTD9	A_33_P3297399	-2,22	0,00012	0,00003	Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 9 (KCTD9), [NM_017634]
KDM1B	A_23_P338401	-2,52	0,00172	0,0001	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 1B (KDM1B), [NM_153042]
KDM4C	A_23_P112201	-2,25	0,00007	0,00002	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 4C (KDM4C), [NM_015061]
KIAA0776	A_23_P30956	-2,16	0,00055	8,91E-06	Homo sapiens KIAA0776 (KIAA0776), [NM_015323]
KIAA1033	A_23_P394545	-2,06	0,00001	0,00006	Homo sapiens KIAA1033 (KIAA1033), [NM_015275]
KIAA1826	A_33_P3323520	-2,13	0,00378	0,00017	Homo sapiens KIAA1826 (KIAA1826), [NM_032424]
KIFC3	A_23_P54576	2,18	0,00856	5,03E-06	Homo sapiens kinesin family member C3 (KIFC3), transcript variant 1, [NM_005550]
KIT	A_33_P3407034	2,43	0,00915	0,00687	Homo sapiens v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT), transcript variant 1, [NM_000222]
KLHL4	A_23_P171150	2,13	0,00618	0,00005	Homo sapiens kelch-like 4 (<i>Drosophila</i>) (KLHL4), transcript variant 2, [NM_057162]
KPNA5	A_23_P156443	-2,09	0,00405	0,00032	Homo sapiens karyopherin alpha 5 (importin alpha 6) (KPNA5), [NM_002269]
KPNB1	A_33_P3390441	-2,00	0,00126	0,00001	Homo sapiens karyopherin (importin) beta 1 (KPNB1), [NM_002265]

KRTAP4-2	A_23_P49988	2,01	0,00603	0,00014	Homo sapiens keratin associated protein 4-2 (KRTAP4-2), [NM_033062]
LACRT	A_23_P64825	3,13	0,004	0,00197	Homo sapiens lacritin (LACRT), [NM_033277]
LACTB2	A_23_P252711	-2,19	0,00524	6,24E-06	Homo sapiens lactamase, beta 2 (LACTB2), [NM_016027]
LAMP2	A_23_P416608	-2,03	0,00049	0,00006	Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), transcript variant B, [NM_013995]
LARS	A_33_P3531828	-2,24	0,00593	9,71E-06	Homo sapiens leucyl-tRNA synthetase (LARS), [NM_020117]
LEO1	A_33_P3270109	-2,09	0,00055	0,00001	Homo sapiens Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae) (LEO1), [NM_138792]
LEPR	A_24_P231104	-2,48	0,00147	0,00031	Homo sapiens leptin receptor (LEPR), transcript variant 3, [NM_001003679]
LHFPL3	A_32_P158083	2,78	0,00434	0,00298	Homo sapiens lipoma HMGIC fusion partner-like 3 (LHFPL3), [NM_199000]
LMAN1	A_24_P159702	-3,01	0,00719	0,00002	Homo sapiens lectin, mannose-binding, 1 (LMAN1), [NM_005570]
LMBR1	A_23_P215214	-2,38	0,0021	0,00006	Homo sapiens limb region 1 homolog (mouse) (LMBR1), [NM_022458]
LOC100128332	A_33_P3341479	2,04	0,00552	0,00028	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100128332, [XM_001715983]
LOC100129235	A_33_P3234764	2,07	0,0099	0,0018	Homo sapiens cDNA FLJ27410 fis, clone WMC04875. [AK130920]
LOC100129675	A_33_P3244578	-2,45	0,00285	4,73E-06	Homo sapiens cDNA FLJ43071 fis, clone BRTHA3009291. [AK125061]
LOC100129702	A_33_P3374365	2,36	0,00349	0,00042	PREDICTED: Homo sapiens similar to RAB40A, member RAS oncogene family, [XM_001717980]
LOC100129785	A_33_P3392004	2,23	0,00335	0,00462	Homo sapiens cDNA FLJ43295 fis, clone MESTC2000153. [AK125285]
LOC100130051	A_33_P3364607	2,07	0,00867	0,00238	Homo sapiens cDNA FLJ45363 fis, clone BRHIP3015854. [AK127296]
LOC100130921	A_33_P3254727	2,76	0,00618	0,00736	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100130921, [XM_001723862]
LOC100132247	A_33_P3212823	2,36	0,00899	0,00039	Homo sapiens similar to Uncharacterized protein KIAA0220, [NM_001135865]
LOC100132541	A_33_P3283848	-2,51	0,00029	0,00008	PREDICTED: Homo sapiens similar to glycosyltransferase 8 domain containing 3, miscRNA [XR_037592]
LOC100133060	A_33_P3249731	2,29	0,00026	0,00001	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100133060, miscRNA [XR_039297]
LOC100133263	A_33_P3420013	2,11	0,00364	0,00005	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100133263, [XM_001717780]
LOC100270804	A_33_P3377239	-2,45	0,00158	0,00007	Homo sapiens hypothetical LOC100270804, non-coding RNA [NR_026885]
LOC100292021	A_33_P3272568	-2,01	0,00328	0,00726	peroxiredoxin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:17169] [ENST00000379331]
LOC344382	A_24_P135579	-2,25	0,00371	0,00002	PREDICTED: Homo sapiens similar to uninteracting protein, [XM_293026]
LOC441666	A_33_P3273266	-2,71	0,0054	0,00014	Homo sapiens zinc finger protein 91 pseudogene, non-coding RNA [NR_024380]
LOC644070	A_33_P3275893	2,55	0,00699	0,00024	Putative germ cell-specific gene 1-like protein 2 Precursor (GSG1-like protein 2) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:A8MUP6] [ENST00000399363]
LOC649395	A_24_P169574	-2,01	0,00502	0,00015	Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide pseudogene (LOC649395), non-coding RNA [NR_029404]
LOC650638	A_33_P3276222	-2,23	0,00011	6,18E-06	PREDICTED: Homo sapiens similar to signal recognition particle 54kDa, [XM_939727]
LOC729059	A_32_P174693	2,25	0,00405	0,00098	full-length cDNA clone CSODI006YL02 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR607811]
LOC729082	A_24_P655268	-2,25	0,0002	0,00001	Homo sapiens hypothetical protein LOC729082, non-coding RNA [NR_026757]
LPGAT1	A_23_P46606	-2,02	0,00008	7,93E-06	Homo sapiens lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 (LPGAT1), [NM_014873]
LRP12	A_23_P8906	-2,18	0,00092	0,00001	Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 12 (LRP12), transcript variant 1, [NM_013437]

LRRC29	A_23_P49181	2,00	0,00523	0,00037	Homo sapiens leucine rich repeat containing 29, transcript variant 1, [NM_012163]
LUZP6	A_33_P3230090	-2,92	0,00105	0,00001	Homo sapiens leucine zipper protein 6 (LUZP6), [NM_001128619]
MACF1	A_23_P391778	-2,04	0,0001	7,93E-06	Homo sapiens microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1), transcript variant 2, [NM_033044]
MAGOH	A_23_P200216	-2,11	0,00017	0,00005	Homo sapiens mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila) (MAGOH), [NM_002370]
MANEA	A_24_P187921	-2,16	0,00028	0,00016	Homo sapiens mannosidase, endo-alpha (MANEA), [NM_024641]
MAPK6	A_24_P333663	-3,58	0,00107	5,12E-06	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 6 (MAPK6), [NM_002748]
MAPRE1	A_24_P220058	-2,10	0,00041	8,20E-06	Homo sapiens microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1 (MAPRE1), [NM_012325]
MAT2B	A_23_P81408	-2,00	0,00007	3,86E-06	Homo sapiens methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B), transcript variant 2, [NM_182796]
MAT2B	A_33_P3246543	-2,67	0,00031	8,20E-06	Homo sapiens methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B), transcript variant 2, [NM_182796]
MCM9	A_23_P30630	-2,04	0,00601	0,00022	Homo sapiens cDNA FLJ20170 fis, clone COL09549. [AK000177]
MCTP1	A_23_P133293	-2,09	0,0054	9,95E-06	Homo sapiens multiple C2 domains, transmembrane 1 (MCTP1), transcript variant L, [NM_024717]
MDFIC	A_23_P327022	-2,46	0,00886	0,00001	Homo sapiens MyoD family inhibitor domain containing (MDFIC), transcript variant 1, [NM_199072]
MED30	A_23_P31866	-2,45	0,00012	6,24E-06	Homo sapiens mediator complex subunit 30 (MED30), [NM_080651]
MGEA5	A_24_P67898	-2,22	0,00007	0,00004	Homo sapiens meningioma-expressed antigen 5s splice variant , complete cds. [AF307332]
MIER1	A_24_P230916	-2,32	0,00024	0,00004	Homo sapiens mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis) (MIER1), [NM_001077702]
MIER3	A_33_P3227320	-2,03	0,00106	6,24E-06	Homo sapiens mesoderm induction early response 1, family member 3 (MIER3), [NM_152622]
MINPP1	A_23_P115885	-2,51	0,00378	0,00005	Homo sapiens multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1 (MINPP1), [NM_004897]
MITF	A_23_P426663	-2,50	0,00836	8,27E-06	Homo sapiens microphthalmia-associated transcription factor (MITF), [NM_198159]
MPG	A_24_P48162	2,05	0,00106	2,04E-06	Homo sapiens N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG), transcript variant 1, [NM_002434]
MRAP2	A_23_P357207	2,33	0,00666	0,00529	Homo sapiens melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2), [NM_138409]
MSL3	A_23_P353514	-2,16	0,0023	0,00003	Homo sapiens male-specific lethal 3 homolog (Drosophila) (MSL3), transcript variant 4, [NM_078628]
MTR	A_23_P200936	-2,08	3,95E-06	0,00004	Homo sapiens 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR), [NM_000254]
MYNN	A_33_P3303104	-2,14	0,00235	0,00001	Homo sapiens myneurin (MYNN), [NM_018657]
MYSM1	A_33_P3359518	-2,06	0,00114	0,00016	Homo sapiens Myb-like, SWIRM and MPN domains 1 (MYSM1), [NM_001085487]
NAA30	A_24_P66679	-2,00	0,00242	0,00004	Homo sapiens N(alpha)-acetyltransferase 30, NatC catalytic subunit (NAA30), [NM_001011713]
NAMPT	A_33_P3364864	-2,28	0,00062	0,00002	Homo sapiens nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), [NM_005746]
NCRNA00115	A_23_P149050	-2,14	0,00995	0,00003	Homo sapiens non-protein coding RNA 115 (NCRNA00115), non-coding RNA [NR_024321]
ND6	A_23_P317056	-2,08	0,00052	0,00008	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6 (EC 1.6.5.3)(NADH dehydrogenase subunit 6) [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:P03923] [ENST00000361681]

NKX2-5	A_33_P3299599	2,59	0,0073	0,00009	Homo sapiens NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila) (NKX2-5), transcript variant 2, [NM_001166175]
NPHP4	A_23_P351734	-2,03	0,00861	0,00042	Homo sapiens nephronophthisis 4 (NPHP4), [NM_015102]
NUDCD1	A_24_P106794	-2,33	0,00234	0,00006	Homo sapiens NudC domain containing 1 (NUDCD1), transcript variant 1, [NM_032869]
OSBPL8	A_33_P3254191	-3,10	0,00026	4,21E-06	Homo sapiens oxysterol binding protein-like 8 (OSBPL8), transcript variant 1, [NM_020841]
OTOR	A_33_P3311830	2,14	0,00637	0,00077	Homo sapiens otoraplin (OTOR), [NM_020157]
OXSRI	A_23_P418413	-2,15	9,40E-07	8,20E-06	Homo sapiens oxidative-stress responsive 1 (OXSRI), [NM_005109]
PACRGL	A_23_P390621	-2,25	0,00106	0,00028	Homo sapiens PARK2 co-regulated-like (PACRGL), transcript variant 1, [NM_145048]
PDCD6IP	A_32_P22338	-2,38	0,00188	9,76E-06	Homo sapiens programmed cell death 6 interacting protein (PDCD6IP), transcript variant 1, [NM_013374]
PDIA4	A_23_P42802	-2,09	0,0026	0,00005	Homo sapiens protein disulfide isomerase family A, member 4 (PDIA4), [NM_004911]
PDIK1L	A_24_P405002	-2,06	0,00523	0,00022	Homo sapiens PDLIM1 interacting kinase 1 like (PDIK1L), transcript variant 1, [NM_152835]
PGM2	A_23_P7172	-2,31	0,00047	0,00002	Homo sapiens phosphoglucomutase 2 (PGM2), [NM_018290]
PGM5P2	A_33_P3404097	-2,58	0,00042	5,69E-06	Homo sapiens phosphoglucomutase 5 pseudogene 2 (PGM5P2), non-coding RNA [NR_002836]
PHF12	A_33_P3252889	2,18	0,00988	0,00035	Homo sapiens PHD finger protein 12 (PHF12), [NM_020889]
PIK3CA	A_23_P92057	-2,03	0,00002	8,49E-06	Homo sapiens phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PIK3CA), [NM_006218]
PKHD1	A_33_P3387420	2,20	0,00649	0,00097	Homo sapiens polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive) (PKHD1), transcript variant 1, [NM_138694]
PLAA	A_24_P78161	-2,39	0,00064	0,00002	Homo sapiens phospholipase A2-activating protein (PLAA), [NM_001031689]
PLCH1	A_23_P339240	2,27	0,00868	0,0034	Homo sapiens phospholipase C, eta 1 (PLCH1), transcript variant 2, [NM_014996]
POLB	A_32_P34552	-2,17	0,00916	0,00009	Homo sapiens polymerase (DNA directed), beta (POLB), [NM_002690]
POLI	A_23_P306890	-2,24	0,00009	0,00004	Homo sapiens polymerase (DNA directed) iota (POLI), [NM_007195]
POLR1B	A_24_P942112	-2,38	0,0028	0,00098	Homo sapiens ; cDNA DKFZp686N05112 (from clone DKFZp686N05112). [BX647683]
PPFIBP1	A_23_P337917	-2,69	0,00405	0,00005	Homo sapiens PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1) (PPFIBP1), transcript variant 2, [NM_177444]
PPIL4	A_23_P42507	-2,43	0,00551	4,21E-06	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4 (PPIL4), [NM_139126]
PPM1A	A_23_P409553	-2,14	0,00901	0,001	Homo sapiens protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A (PPM1A), transcript variant 2, [NM_177951]
PPM1A	A_24_P407323	-2,33	0,00104	0,00004	Homo sapiens protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1A (PPM1A), transcript variant 2, [NM_177951]
PPP1R12A	A_23_P204564	-2,04	0,00036	4,21E-06	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A (PPP1R12A), transcript variant 1, [NM_002480]
PPP1R2	A_33_P3215720	-3,27	0,00719	6,24E-06	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2 (PPP1R2), [NM_006241]
PPP4R2	A_32_P228775	-2,65	0,00006	4,50E-06	Homo sapiens protein phosphatase 4, regulatory subunit 2 (PPP4R2), [NM_174907]
PREX2	A_33_P3394995	2,30	0,00283	0,00007	Homo sapiens phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2 (PREX2), transcript variant 2, [NM_025170]
PRKD3	A_24_P165656	-3,29	0,00665	0,00003	Homo sapiens protein kinase D3 (PRKD3), [NM_005813]

PRKDC	A_33_P3337599	-3,17	0,00228	0,00005	Homo sapiens protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide (PRKDC), transcript variant 1, [NM_006904]
PRPF8	A_23_P38219	2,35	0,00383	6,24E-06	Homo sapiens PRP8 pre-processing factor 8 homolog (S. cerevisiae) (PRPF8), [NM_006445]
PSMD3	A_24_P289726	2,18	0,00915	4,21E-06	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3 (PSMD3), [NM_002809]
PSPC1	A_33_P3232173	-2,53	0,00262	0,00252	paraspeckle component 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:20320] [ENST00000338910]
PTMS	A_33_P3333038	2,79	0,00369	0,00004	Homo sapiens parathymosin (PTMS), [NM_002824]
PTP4A1	A_23_P81770	-2,90	0,00012	1,55E-06	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), [NM_003463]
PTP4A1	A_24_P252043	-2,25	0,0002	3,86E-06	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), [NM_003463]
PTPRC	A_23_P12392	-2,39	0,00077	0,00002	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), transcript variant 4, [NM_080923]
PTPRC	A_33_P3309526	-2,31	8,07E-06	5,27E-06	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), transcript variant 1, [NM_002838]
PTPRC	A_33_P3364811	-2,50	0,00005	5,55E-06	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), transcript variant 1, [NM_002838]
RAB18	A_33_P3299754	-2,43	0,00188	0,00001	Homo sapiens RAB18, member RAS oncogene family (RAB18), [NM_021252]
RAPGEF6	A_23_P144999	-3,13	0,0039	0,00002	Homo sapiens Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6 (RAPGEF6), [NM_016340]
RASA2	A_33_P3287972	-2,49	0,00006	0,00001	Homo sapiens RAS p21 protein activator 2 (RASA2), [NM_006506]
RBM16	A_23_P111303	-2,18	0,00017	6,14E-06	Homo sapiens RNA binding motif protein 16 (RBM16), [NM_014892]
RBM22	A_23_P92895	-2,23	0,0001	0,00001	Homo sapiens RNA binding motif protein 22 (RBM22), [NM_018047]
RBM27	A_23_P92786	-2,03	0,00615	0,00001	Homo sapiens RNA binding motif protein 27 (RBM27), [NM_018989]
RBM8A	A_32_P62571	-2,05	0,00581	5,62E-06	Homo sapiens RNA binding motif protein 8A (RBM8A), [NM_005105]
RC3H1	A_33_P3288774	-2,15	0,00033	0,00002	Homo sapiens ring finger and CCCH-type zinc finger domains 1 (RC3H1), [NM_172071]
RFK	A_23_P216708	-2,06	0,00003	6,20E-06	Homo sapiens riboflavin kinase (RFK), [NM_018339]
RIN2	A_24_P305570	-2,02	0,00821	0,00007	Homo sapiens Ras and Rab interactor 2 (RIN2), [NM_018993]
RNF165	A_24_P348083	2,53	0,00803	0,00019	Homo sapiens cDNA FLJ90080 fis, clone HEMBA1004797. [AK074561]
RNFT1	A_23_P207299	-2,24	0,0095	0,00001	Homo sapiens ring finger protein, transmembrane 1 (RNFT1), [NM_016125]
RNH1	A_24_P415601	2,04	0,00656	0,00006	Homo sapiens ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 (RNH1), transcript variant 1, [NM_002939]
ROCK1	A_23_P130429	-2,76	0,0003	5,38E-06	Homo sapiens Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1), [NM_005406]
RP11-631M2.2	A_24_P813147	2,20	0,00273	0,00001	Homo sapiens tubulin, beta 8 (TUBB8), transcript variant 1, [NM_177987]
RP2	A_23_P22433	-2,11	9,40E-07	0,00001	Homo sapiens retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive) (RP2), [NM_006915]
RRM2B	A_33_P3323384	-2,27	0,00742	0,00006	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (RRM2B), transcript variant 1, [NM_015713]
RSL1D1	A_23_P54605	-2,23	0,00169	3,86E-06	Homo sapiens ribosomal L1 domain containing 1 (RSL1D1), [NM_015659]
RSU1	A_23_P149813	-2,57	0,00127	0,00002	Homo sapiens Ras suppressor protein 1 (RSU1), transcript variant 1, [NM_012425]
RWDD3	A_23_P933	-2,30	0,00247	3,86E-06	Homo sapiens RWD domain containing 3 (RWDD3), transcript variant 1, [NM_015485]

S100A10	A_23_P137984	-2,11	0,00178	3,09E-06	Homo sapiens S100 calcium binding protein A10 (S100A10), [NM_002966]
SACM1L	A_23_P212383	-2,13	0,00033	0,00006	Homo sapiens SAC1 suppressor of actin mutations 1-like (yeast) (SACM1L), [NM_014016]
SCGB1A1	A_23_P150583	2,03	0,00041	0,0014	Homo sapiens secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin) (SCGB1A1), [NM_003357]
SCP2	A_24_P156922	-2,51	0,00867	0,00001	Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2), transcript variant 2, [NM_001007098]
SCYL2	A_33_P3292829	-2,60	0,00017	0,00004	Homo sapiens SCY1-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (SCYL2), [NM_017988]
SEC24B	A_23_P69683	-2,88	0,00024	9,16E-06	Homo sapiens SEC24 family, member B (<i>S. cerevisiae</i>) (SEC24B), transcript variant 1, [NM_006323]
SECISBP2L	A_24_P82135	-2,71	0,00112	0,00007	Homo sapiens SECIS binding protein 2-like (SECISBP2L), [NM_014701]
SELT	A_33_P3305851	-2,12	0,00533	0,00002	Homo sapiens selenoprotein T (SELT), [NM_016275]
SEPT7	A_24_P291973	-2,37	0,00014	0,00004	Homo sapiens septin 7 (SEPT7), transcript variant 2, [NM_001011553]
SET	A_23_P217015	-2,39	0,00034	0,0001	Homo sapiens SET nuclear oncogene (SET), transcript variant 2, [NM_003011]
SETX	A_24_P940921	-2,02	0,00025	6,24E-06	Homo sapiens senataxin (SETX), [NM_015046]
SF1	A_24_P235783	-2,61	0,004	0,00006	Homo sapiens splicing factor 1 (SF1), transcript variant 4, [NM_201997]
SFTPB	A_33_P3275873	2,63	0,00346	0,00311	Homo sapiens surfactant protein B (SFTPB), transcript variant 1, [NM_000542]
SGSM3	A_23_P166491	2,04	0,0048	0,00002	Homo sapiens small G protein signaling modulator 3 (SGSM3), [NM_015705]
SHOX	A_23_P22761	2,72	0,00374	0,00046	Homo sapiens short stature homeobox (SHOX), transcript variant 2, [NM_006883]
SLC10A6	A_33_P3212102	2,60	0,00075	0,00112	Homo sapiens solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 6 (SLC10A6), [NM_197965]
SLC25A43	A_23_P125668	-2,36	0,00376	7,27E-06	Homo sapiens solute carrier family 25, member 43 (SLC25A43), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_145305]
SLC30A6	A_24_P342807	-2,45	0,0081	0,00005	Homo sapiens solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6 (SLC30A6), [NM_017964]
SLC33A1	A_33_P3251108	-2,36	0,00133	0,00001	Homo sapiens solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1 (SLC33A1), [NM_004733]
SLC35A3	A_33_P3383331	-2,06	0,00301	0,00022	Homo sapiens solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3 (SLC35A3), [NM_012243]
SLC38A2	A_23_P218079	-2,60	0,00378	0,00009	Homo sapiens solute carrier family 38, member 2 (SLC38A2), [NM_018976]
SLC39A6	A_24_P156049	-2,42	0,00053	4,82E-06	Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6 (SLC39A6), transcript variant 1, [NM_012319]
SMAD4	A_23_P27346	-2,45	9,40E-07	7,11E-06	Homo sapiens SMAD family member 4 (SMAD4), [NM_005359]
SMARCA2	A_23_P252764	-2,22	0,00343	0,00006	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 (SMARCA2), transcript variant 2, [NM_139045]
SMARCA5	A_23_P256716	-3,26	0,00027	8,20E-06	Homo sapiens SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 (SMARCA5), [NM_003601]
SMC1A	A_33_P3290909	-4,05	0,00185	4,89E-06	Homo sapiens structural maintenance of chromosomes 1A (SMC1A), [NM_006306]
SMC5	A_32_P126609	-2,15	0,00864	0,0001	Homo sapiens structural maintenance of chromosomes 5 (SMC5), [NM_015110]
SMCHD1	A_24_P400997	-2,35	0,00073	7,63E-06	Homo sapiens structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 (SMCHD1), [NM_015295]
SMOC2	A_33_P3351416	2,61	0,00375	0,00376	Homo sapiens SPARC related modular calcium binding 2 (SMOC2), transcript variant 1, [NM_022138]

SNORD3B-1	A_33_P3252333	-2,14	0,00014	0,00034	Homo sapiens small nucleolar RNA, C/D box 3B-1 (SNORD3B-1), small nucleolar RNA [NR_003271]
SNRPE	A_33_P3320152	-2,36	0,00283	0,00002	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E (SNRPE), [NM_003094]
SNX10	A_33_P3289536	-2,39	0,00585	0,00001	Homo sapiens sorting nexin 10 (SNX10), [NM_013322]
SON	A_24_P67142	-2,28	0,00007	0,00005	Homo sapiens SON DNA binding protein (SON), transcript variant b, [NM_032195]
SOX30	A_33_P3260563	2,33	0,00085	0,00116	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 30 (SOX30), transcript variant 2, [NM_007017]
SPINK7	A_23_P213832	3,08	0,00053	0,0001	Homo sapiens serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative) (SPINK7), [NM_032566]
SPTY2D1	A_23_P429082	-3,05	0,00043	3,09E-06	Homo sapiens SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (S. cerevisiae) (SPTY2D1), [NM_194285]
SSFA2	A_23_P102060	-2,04	0,00119	0,00003	Homo sapiens sperm specific antigen 2 (SSFA2), [NM_006751]
STAG2	A_23_P33856	-2,15	0,00015	0,00001	Homo sapiens stromal antigen 2 (STAG2), transcript variant 1, [NM_001042749]
STK25	A_23_P252653	2,01	0,00328	0,00007	Homo sapiens serine/threonine kinase 25 (STE20 homolog, yeast) (STK25), [NM_006374]
STT3B	A_23_P434473	-2,37	0,00175	8,20E-06	Homo sapiens STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae), [NM_178862]
SUMO3	A_23_P102937	-2,15	0,00002	4,21E-06	Homo sapiens SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 3 (S. cerevisiae) (SUMO3), [NM_006936]
SURF4	A_24_P89971	-2,14	0,00015	0,00006	Homo sapiens surfeit 4 (SURF4), [NM_033161]
SUV420H1	A_23_P96688	-2,43	0,00584	0,00003	Homo sapiens suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila) (SUV420H1), transcript variant 2, [NM_016028]
SWAP70	A_33_P3349651	-2,56	0,00325	4,21E-06	Homo sapiens SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit (SWAP70), [NM_015055]
TAB3	A_32_P162150	-2,13	0,00197	0,00003	Homo sapiens TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3 (TAB3), [NM_152787]
TAF1A	A_33_P3406245	-2,06	0,00068	0,00002	Homo sapiens TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa (TAF1A), transcript variant 1, [NM_005681]
TAF3	A_32_P153892	-2,37	0,00509	0,00001	Homo sapiens TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa (TAF3), [NM_031923]
TAF5L	A_23_P35309	-2,74	0,00164	0,00003	Homo sapiens TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa (TAF5L), transcript variant 1, [NM_014409]
TANK	A_24_P257108	-2,29	0,00004	5,74E-06	Homo sapiens TRAF family member-associated NFKB activator (TANK), transcript variant 2, [NM_133484]
TCERG1	A_23_P133365	-2,25	0,00287	0,00004	Homo sapiens transcription elongation regulator 1 (TCERG1), transcript variant 1, [NM_006706]
TCF12	A_24_P82142	-2,52	0,0002	0,00001	Homo sapiens transcription factor 12 (TCF12), transcript variant 4, [NM_207038]
TCF25	A_23_P49220	2,00	0,00357	0,00003	Homo sapiens transcription factor 25 (basic helix-loop-helix) (TCF25), [NM_014972]
TDG	A_33_P3357445	-3,08	0,0011	5,69E-06	Homo sapiens thymine-DNA glycosylase (TDG), [NM_003211]
TFEC	A_32_P184394	-2,42	0,00069	0,00007	Homo sapiens transcription factor EC (TFEC), transcript variant 1, [NM_012252]
THC2524986	A_33_P3270084	-2,00	0,00269	4,21E-06	CDC2L1S13 PITSLRE protein kinase alpha SV9 isoform {Homo sapiens} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (38%) [THC2524986]
THC2574155	A_33_P3316884	2,40	0,00641	0,00005	Q4S4D0_TETNG (Q4S4D0) Chromosome 2 SCAF14738, whole genome shotgun sequence. (Fragment), partial (3%) [THC2574155]
THUMPD1	A_24_P90878	-2,02	0,00023	0,00002	Homo sapiens THUMP domain containing 1 (THUMPD1), [NM_017736]

TLE4	A_23_P94494	-2,36	0,00189	0,00001	Homo sapiens transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila) (TLE4), [NM_007005]
TLK2	A_33_P3328937	-2,21	0,00045	0,00003	Homo sapiens tousled-like kinase 2 (TLK2), transcript variant B, [NM_001112707]
TM6SF1	A_33_P3310784	-2,59	0,00087	0,00003	Homo sapiens transmembrane 6 superfamily member 1 (TM6SF1), transcript variant 1, [NM_023003]
TMEM30A	A_33_P3244669	-2,12	0,00699	2,04E-06	Homo sapiens transmembrane protein 30A (TMEM30A), transcript variant 1, [NM_018247]
TMEM87A	A_33_P3247659	-2,04	0,00076	0,00007	Homo sapiens transmembrane protein 87A (TMEM87A), transcript variant 2, [NM_001110503]
TMPO	A_23_P325040	-2,07	0,00357	0,00004	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), transcript variant 1, [NM_003276]
TMPO	A_33_P3412613	-2,63	0,00158	0,00009	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), transcript variant 2, [NM_001032283]
TNRC18	A_33_P3321507	3,60	0,00771	0,00003	Homo sapiens trinucleotide repeat containing 18 (TNRC18), [NM_001080495]
TOMM70A	A_23_P144264	-2,04	0,00565	0,00004	Homo sapiens translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (S. cerevisiae), nuclear gene encoding mitochondrial protein, [NM_014820]
TPSG1	A_23_P26294	2,27	0,00778	0,00008	Homo sapiens tryptase gamma 1 (TPSG1), [NM_012467]
TRA2B	A_24_P145911	-2,67	0,00174	3,86E-06	Homo sapiens htra2-beta-2 , complete cds. [U87836]
TRPM7	A_23_P88470	-2,09	0,0003	0,00005	Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7 (TRPM7), [NM_017672]
TRPS1	A_33_P3361746	-2,23	0,00696	0,00001	Homo sapiens trichorhinophalangeal syndrome 1 (TRPS1), [NM_014112]
TTC13	A_23_P103864	-2,04	0,00162	0,00007	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 13 (TTC13), transcript variant 1, [NM_024525]
TTY22	A_24_P331693	2,14	0,00769	0,00294	Homo sapiens testis-specific transcript, Y-linked 22 (non-protein coding) (TTY22), non-coding RNA [NR_001539]
TUBB2C	A_23_P312863	2,10	0,00182	3,50E-06	Homo sapiens tubulin, beta 2C (TUBB2C), [NM_006088]
TUBGCP6	A_23_P6546	2,09	0,00285	0,00011	Homo sapiens tubulin, gamma complex associated protein 6 (TUBGCP6), [NM_020461]
UBR3	A_24_P285501	-2,30	0,00135	0,00012	Homo sapiens ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative) (UBR3), [NM_172070]
UBR5	A_32_P159400	-2,13	0,00122	8,66E-06	Homo sapiens ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5 (UBR5), [NM_015902]
UBTD2	A_33_P3220565	-2,46	0,00098	0,00002	Homo sapiens ubiquitin domain containing 2 (UBTD2), [NM_152277]
UBXN2A	A_23_P131240	-2,30	0,009	0,00003	Homo sapiens UBX domain protein 2A (UBXN2A), [NM_181713]
UGGT1	A_33_P3366246	-2,05	0,00039	0,00001	Homo sapiens UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1 (UGGT1), transcript variant 1, [NM_020120]
UPRT	A_24_P185986	-2,23	0,00015	0,00003	Homo sapiens uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog (S. cerevisiae) (UPRT), transcript variant 1, [NM_145052]
USP46	A_24_P377225	-2,26	0,00362	0,00006	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 46 (USP46), transcript variant 1, [NM_022832]
USP48	A_33_P3612740	-2,08	0,00381	0,00007	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 48 (USP48), transcript variant 2, [NM_001032730]
VBP1	A_23_P256223	-2,13	0,00165	0,00001	Homo sapiens von Hippel-Lindau binding protein 1 (VBP1), [NM_003372]
VSNL1	A_23_P209978	-2,09	0,00841	0,00043	Homo sapiens visinin-like 1 (VSNL1), [NM_003385]
WDFY1	A_23_P502797	-2,54	0,00013	5,69E-06	Homo sapiens WD repeat and FYVE domain containing 1 (WDFY1), [NM_020830]
WDFY3	A_24_P83379	-2,19	0,00349	0,00008	Homo sapiens WD repeat and FYVE domain containing 3 (WDFY3), transcript variant 2, [NM_178583]

WDR11	A_23_P63929	-2,00	0,00056	0,00009	Homo sapiens WD repeat domain 11 (WDR11), [NM_018117]
WHAMM	A_33_P3315475	-2,06	0,00007	0,00002	Homo sapiens WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules (WHAMM), [NM_001080435]
WHAMML1	A_33_P3317558	-2,32	0,00281	0,00002	Homo sapiens WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules-like 1 (WHAMML1), non-coding RNA [NR_003521]
XIAP	A_33_P3231187	-4,25	0,00049	0,00003	Homo sapiens X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), [NM_001167]
YWHAE	A_24_P33444	-2,37	0,00339	0,00002	Homo sapiens tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide (YWHAE), transcript variant 1, [NM_006761]
ZBTB41	A_32_P108826	-2,19	0,00281	0,00014	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 41 (ZBTB41), [NM_194314]
ZC3H13	A_33_P3281139	-2,30	0,00031	0,00002	Homo sapiens cDNA FLJ10953 fis, clone PLACE1000380, highly similar to Zinc finger CCH domain-containing protein 13. [AK001815]
ZCCHC11	A_23_P34433	-2,17	0,0099	0,00004	Homo sapiens zinc finger, CCHC domain containing 11 (ZCCHC11), transcript variant 1, [NM_001009881]
ZCCHC16	A_33_P3377644	4,52	0,00014	0,00019	Homo sapiens zinc finger, CCHC domain containing 16 (ZCCHC16), [NM_001004308]
ZDHHC15	A_33_P3418952	2,72	0,00015	0,00231	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 15 (ZDHHC15), transcript variant 3, [NM_001146257]
ZDHHC17	A_24_P76995	-2,20	0,00002	0,00015	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 17 (ZDHHC17), [NM_015336]
ZDHHC21	A_24_P374427	-2,44	0,00258	0,00006	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 21 (ZDHHC21), [NM_178566]
ZFC3H1	A_23_P332908	-2,28	0,00115	4,21E-06	Homo sapiens zinc finger, C3H1-type containing (ZFC3H1), [NM_144982]
ZKSCAN1	A_33_P3234667	-2,52	0,00059	0,00003	Homo sapiens zinc finger with KRAB and SCAN domains 1 (ZKSCAN1), [NM_003439]
ZNF124	A_23_P52176	-2,23	0,00287	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 124 (ZNF124), [NM_003431]
ZNF146	A_23_P108028	-2,23	0,00929	9,71E-06	Homo sapiens zinc finger protein 146 (ZNF146), transcript variant 1, [NM_007145]
ZNF181	A_23_P50735	-2,27	0,00392	0,00014	Homo sapiens zinc finger protein 181 (ZNF181), transcript variant 1, [NM_001029997]
ZNF227	A_23_P371011	-2,68	0,00004	0,0003	Homo sapiens zinc finger protein 227 (ZNF227), [NM_182490]
ZNF23	A_23_P89073	-2,10	0,00317	0,00011	Homo sapiens zinc finger protein 23 (KOX 16) (ZNF23), [NM_145911]
ZNF25	A_23_P381577	-2,78	0,00053	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 25 (ZNF25), [NM_145011]
ZNF320	A_33_P3325009	2,14	0,00565	0,00008	Homo sapiens zinc finger protein 320, (cDNA clone IMAGE:5584095). [BC064408]
ZNF431	A_24_P177568	-2,15	0,00369	0,00485	Homo sapiens zinc finger protein 431 (ZNF431), [NM_133473]
ZNF451	A_33_P3257528	-2,38	0,00103	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 451 (ZNF451), transcript variant 2, [NM_015555]
ZNF606	A_23_P4628	-2,22	0,00544	0,00019	Homo sapiens zinc finger protein 606 (ZNF606), [NM_025027]
ZNF624	A_23_P153037	-2,11	0,00008	0,00017	Homo sapiens zinc finger protein 624 (ZNF624), [NM_020787]
ZNF638	A_24_P3140	-2,41	0,00328	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 638 (ZNF638), transcript variant 1, [NM_014497]
ZNF644	A_23_P200772	-2,19	0,00077	5,69E-06	Homo sapiens zinc finger protein 644 (ZNF644), transcript variant 1, [NM_201269]
ZNF644	A_24_P256337	-2,11	0,00033	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 644 (ZNF644), transcript variant 1, [NM_201269]
ZNF669	A_23_P86386	-2,46	0,00073	0,00001	Homo sapiens zinc finger protein 669 (ZNF669), transcript variant 1, [NM_024804]
ZNF701	A_33_P3273272	-2,10	0,00507	0,00005	Homo sapiens zinc finger protein 701 (ZNF701), transcript variant 1, [NM_001172655]

ZNF727	A_32_P46191	-2,19	0,00029	0,00003	Homo sapiens zinc finger protein 727 (ZNF727), [NM_001159522]
ZNF738	A_32_P68148	-3,17	0,0003	0,00003	Homo sapiens zinc finger protein 738 (ZNF738), non-coding RNA [NR_027130]
ZNF790	A_33_P3423401	-2,22	0,00819	0,00022	Homo sapiens zinc finger protein 790 (ZNF790), [NM_206894]
ZNF791	A_24_P382401	-3,01	0,00078	0,00008	Homo sapiens zinc finger protein 791 (ZNF791), [NM_153358]
	A_33_P3264424	-2,14	0,00466	0,00004	Unknown
	A_33_P3281716	-2,65	0,00002	0,00012	Unknown
	A_33_P3287314	2,00	0,00721	0,00007	Unknown
	A_33_P3377705	2,32	0,00516	0,00543	Unknown
	A_33_P3381132	2,34	0,00557	0,00505	Unknown
	A_33_P3395403	-2,16	0,00013	0,00001	Unknown
	A_33_P3395843	2,53	0,00094	0,00214	Unknown

Tabelle 16: Signifikant unterschiedlich regulierte Gene humaner Primärmakrophagen nach einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 im Vergleich zu *S. Gallinarum* G9 – infizierten Zellen. Selektiert wurden Gene mit mindestens einer zweifachen Hoch- oder Herabregulation (FC, fold changes), die sowohl im Vergleich aller Einzelexperimente mittels Zweistichproben t-Test (2sT) als auch im Vergleich der Mittelwerte aus den Einzelexperimenten mittels Einstichproben t-Test (1sT) sich als signifikant ($p \leq 0,01$) erwiesen.

VIII.2. Publikationsliste

Veröffentlichungen:

- **Maurischat S, Schwerk P, Siefert B, Tedin K:** Innate immune reporter cell lines of human, porcine and chicken origins for studies on host-pathogen interactions. *In Preparation.*
- **Gripp E, Hlahla D, Didelot X, Kops F, Maurischat S, Tedin K, Alter T, Ellerbroek L, Schreiber K, Schomburg D, Janssen T, Bartholomäus P, Hofreuter D, Woltemate S, Uhr M, Brenneke B, Grüning P, Gerlach G, Wieler L, Suerbaum S, Josenhans C:** Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. *BMC Genomics.* 2011, **12**:584.
- **Lewin A, Baus D, Kamal E, Bon F, Kunisch R, Maurischat S, Adonopoulou M, Eich K:** The mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) from *Mycobacterium bovis* BCG influences various growth characteristics. *BMC Microbiol.* 2008, **8**:91.

Tagungsbeiträge:

- **Maurischat S, Schwerk P, Wieler LH, Tedin K:** Host-specific flagellin recognition in *Salmonella enterica* - infected cells. *BIOspektrum Tagungsband zur DGHM Tagung*, Essen, 25.-28.09.11. Abstract ID - GIP03
- **Breithaupt U, Tedin K, Maurischat S, Wieler L, Kaspers B:** Gene expression analysis of the innate Mukosal immune response to *Salmonella enteritidis* in the chicken. *Tagungsband zum 6. Nationalen Symposium zur Zoonosenforschung*, Berlin, 06.-07.10.11. Abstract ID – F04
- **Maurischat S, Molina-Alvarado A, Schwerk P, Tedin K:** Host-specific differences in recognition of *Salmonella* serovars and bacterial molecular patterns. *Tagungsband zum 5. Nationalen Symposium zur Zoonosenforschung*, Berlin, 07.-08.10.10. Abstract ID – C11
- **Maurischat S, Schwerk P, Wieler LH, Tedin K:** The contribution of *Salmonella enterica* molecular patterns to NF- κ B activation in different host species. *Tagungsband zum 5. Nationalen Symposium zur Zoonosenforschung*, Berlin, 07.-08.10.10. Abstract ID – I10
- **Maurischat S, Tedin K, Wieler LH:** *Salmonella* serovar specific differences in host immune responses. *BIOspektrum Tagungsband zur 3. gemeinsamen Tagung von VAAM und DGHM*, Hannover, 28.-31.03.10. Abstract ID - ZOP09.
- **Maurischat S, Tedin K, Wieler LH:** The impact of host-adaptation on invasion and intracellular persistence of *Salmonella* serovars in different host species. *BIOspektrum Tagungsband zur VAAM Tagung*, Bochum, 08.-11.03.09. Abstract ID - PJ17.

VIII.3. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne das Wirken vieler fleißiger Hände und intelligenter Köpfe nicht möglich geworden; daher möchte ich mich bei den wichtigsten Akteuren im Folgenden bedanken.

Ein großer Dank geht an **Dr. Karsten Tedin** für die Aufnahme in das FBI-Zoo Projekt und die Überlassung dieses spannenden Themas, das den Grundstein für die vorliegende Dissertation bildete. Ich fühlte mich stets bestens betreut und fand immer ein offenes Ohr. Auf dein Engagement zu jeder Tages- und auch Nachtzeit konnte ich mich verlassen; der immerwährende Rückhalt und deine optimistische Sicht bestärkten mich auch in schwierigen Situationen.

Ich möchte mich auch besonders bei Herrn **Prof. Dr. Wieler** für seine Betreuung und Gutachtertätigkeit bedanken. Die ausgezeichnete Positionierung und Ausstattung des Instituts für Mikrobiologie & Tierseuchen war für eine erfolgreiche Arbeit essentiell. Aber auch fachliche Diskussionen und Ratschläge gaben hilfreiche Impulse.

Mein Dank gilt auch Frau **Prof. Dr. Hengge** für ihre Bereitschaft, meine Promotion extern zu betreuen und zu begutachten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn **Prof. Dr. Kaspers** und seiner Gruppe an der LMU München für die freundliche Zusammenarbeit und die Einführung ins Reich der Hühnerimmunologie.

Für die Durchführung der Microarray-Studien war maßgeblich die hervorragende Zusammenarbeit mit **Dr. Hans Mollenkopf** und **Ina Müller** am MPI für Infektionsbiologie von Bedeutung. Vielen Dank für eure Bereitschaft und Hilfe.

Allen Mitarbeitern im Institut für Mikrobiologie & Tierseuchen gilt mein Dank für Ihre Unterstützung, hilfreiche Anregungen während der Institutsseminare und Einführungen zur Erweiterung meines Methodenspektrums. Ich habe im Institut stets eine herzliche und hilfsbereite Atmosphäre vorgefunden. Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang vor allem die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, insbesondere **Evan, Johannes, Andrea, Bianca** und **Peter**. Ohne euch wäre die Arbeit sicherlich deutlich schwerer gefallen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, **meinen Eltern, meinen Geschwistern** und **meiner Frau Nadine** besonders herzlich danken. Ihr habt mich zu dem gemacht, was ich heute bin. Der grenzenlose Rückhalt, die aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft und vor allem mentale Unterstützung halfen mir, auch die schwierigsten Aufgaben zu bewältigen und nie den Mut zu verlieren. Für deine Geduld in zahlreichen Probevorträgen, dein stetiges Vertrauen und deine liebevolle Begleitung bin ich dir, Nadine, endlos dankbar.

VIII.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 31.05.2012

Sven Maurischat