

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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