

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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