

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene
und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Bakteriologie
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

**Untersuchungen zur Rolle des Regulatorproteins TviA bei der
Immunevasion von *Salmonella enterica* Serovar Typhi**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Erwin Wolfgang Winter
aus Roding
Jahr
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Rüssmann
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Rust
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Holzinger
Priv. Doz. Dr. Stefan Holdenrieder
Mitbetreuung durch: Dr. Klaus Panthel
Prof. Dr. Andreas J. Bäuml, University of
California Davis, Davis, CA
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2010

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich an keiner Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

München, den 22. Januar 2010

1. Einleitung	1
1.1. Klinische Bedeutung von <i>Salmonella</i> -Infektionen	1
1.2. Pathogenese der Infektion mit <i>S. Typhimurium</i>	1
1.3. Erste Schritte der Pathogenese von <i>S. Typhi</i> -Infektionen	4
1.4. Der <i>viaB</i> -Locus von <i>S. Typhi</i> verhindert die Induktion der angeborenen Immunantwort	5
1.5. Koordinierte Regulation von T3SS-1, Flagellen und Vi-Antigen in <i>S. Typhi</i>	6
1.6. Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	10
2.1. Kultivierung von Mikroorganismen	10
2.2. Stämme und Plasmide	10
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	14
2.2.2. Konstruktion von Plasmiden	15
2.2.3. Konstruktion von Mutanten durch homologe Rekombination und Suizid-Plasmide	19
2.2.4. Generalisierte Transduktion mit dem Phagen P22	20
2.3. Berechnung der Generationszeit	21
2.4. Färbung von Flagellen für Lichtmikroskopie	22
2.5. Beweglichkeitsexperimente	22
2.6. Messung der β -Galactosidaseaktivität	22
2.7. Isolierung bakterieller RNA	23
2.8. RNA-Extraktion von eukaryontischen Zellen und Gewebeproben	23
2.9. RT-PCR und Real time PCR	24
2.10. Erstellung von Genexpressionsprofilen	26
2.11. Fällung in den Kulturüberstand sekretierter Proteine und Analyse von extrazellulärem Flagellin	31
2.12. SDS-PAGE und Western-Blot	32
2.13. Zellkulturexperimente mit T84- und Caco-2-Dickdarmepithelzellen	33
2.13.1. Gentamicin-Schutzexperimente	34
2.13.2. Stimulation von T84- und Caco-2-Zellen mit <i>S. Typhi</i>	34
2.13.3. Stimulation von T84-Zellen mit Kulturüberständen von <i>S. Typhimurium</i>	35
2.14. IL-1 β Sekretion durch Knochenmark-abgeleitete Makrophagen	35
2.15. Tierexperimente	36

2.15.1 Streptomycin-vorbehandelte Mäuse	36
2.15.2. <i>Bovine ligated ileal loop</i> -Modell	37
2.16. Statistik	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Charakterisierung des regulatorischen Netzwerks von TviA	39
3.1.1. Identifikation von Genen, deren Transkription durch RcsB und TviA reguliert wird	39
3.1.2. Regulation des Flagella-Regulons durch TviA	41
3.1.3. TviA kontrolliert die Expression T3SS-1 durch reprimierte Expression der Regulatoren <i>flhDC</i> und <i>fliZ</i>	42
3.1.4. TviA reduziert die Invasivität gegenüber menschlichen Epithelzellen unabhängig von der Expression des Vi-Antigens	46
3.1.5. Einfluss von TviA und RcsB auf die Osmoregulation von <i>flhC</i> in <i>S. Typhi</i>	48
3.1.6. Beitrag von TviA zur Osmoregulation der Invasion von Epithelzellen	50
3.2. Einfluss des <i>viaB</i> -Operons auf die durch TLR5 vermittelte CXC-Chemokin Produktion menschlicher Darmepithelzellen	51
3.2.1. Einfluss des Regulators <i>tviA</i> auf die Sekretion von IL-8 durch menschliche Epithelzellen	52
3.2.2. Effekt des T3SS-1 auf die durch <i>tviA</i> ausgeübte Minderung der IL-8 Expression in T84-Epithelzellen	55
3.2.3. Auswirkung der durch <i>tviA</i> reprimierten Sekretion von Flagellin auf die <i>IL8</i> Transkription in T84-Zellen	57
3.2.4. Effekt der Expression von <i>tviA</i> in <i>S. Typhimurium</i> auf die Sekretion von Flagellin und die Erkennung durch Epithelzellen	59
3.3. Beitrag von <i>tviA</i> auf das Auslösen der Entzündungsreaktion im Darmtrakt	61
3.3.1. Beitrag von Flagellin zur Induktion von Enteritis durch Pathogen-assoziiertes Mustererkennung	62
3.3.1.1. Genetischer Ansatz zur Bestimmung des Beitrag von Flagellin zum Entzündungsprozess	63
3.3.1.2. Charakterisierung der <i>flgK</i> - und der <i>flgK fliC fljB</i> -Mutante bezüglich der Erkennung durch TLR5 und IPAF <i>in vitro</i>	65
3.3.1.3. Einfluss von Flagellin auf die Transkription von CXC-Chemokinen und <i>Ifng</i> im Caecum von Streptomycin-	

vorbehandelten Mäusen	68
3.3.1.4. Einfluss der Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem auf die Entzündungsreaktion in Rindern	71
3.3.1.5. Einfluss von <i>tviA</i> auf die Entzündungsreaktion im Ileum von Rindern	75
4. Diskussion	76
4.1. Eingliederung von TviA in das RcsCDB-Phosphorelaysystem	76
4.2. Osmoregulation von Virulenzfaktoren durch TviA	78
4.3. Molekulare Mechanismen der Immunevasion von <i>S. Typhi</i> , vermittelt durch TviA und das Vi-Antigen	78
4.4. Transfer von <i>tviA</i> überträgt die Eigenschaft der Immunevasion von <i>S. Typhi</i> teilweise auf <i>S. Typhimurium</i>	80
4.5. Einfluss von Flagellin auf das Auslösen des Entzündungsprozesses	80
4.6. TviA koordiniert die Immunevasion von <i>S. Typhi</i>	83
5. Zusammenfassung	85
6. Literaturverzeichnis	87
7. Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
Abb.	Abbildungen
Ab	Antikörper (<i>antibody</i>)
Amp	Ampicillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>bovine serum albumin</i>)
bp	Basenpaare
Carb, Carb ^r	Carbenicillin, Carbenicillinresistenz (-kassette)
Cm, Cm ^r	Chloramphenicol, Chloramphenicolresistenz (-kassette)
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	<i>Dulbeccos modified Eagle medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal calf serum</i>)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
i.p., i.v.	intraperitoneal, intravenös
IFN	Interferon
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan, Kan ^r	Kanamycin, Kanamycinresistenz (-kassette)
KBE	kolonie-bildende Einheit
LB	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
M/V	Masse pro Volumen
MW	Molekulare Masse
OD ₆₀₀	optische Dichte (Trübung) gemessen bei einer Wellenlänge von 600

	nm
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SPI-1	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel 1
SPI-2	<i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel 2
Strep, Strep ^r	Streptomycin, Streptomycinresistenz (-kassette)
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tet, Tet ^r	Tetracyclin, Tetracyclinresistenz (-kassette)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WHO	<i>world health organisation</i>
W/V	Masse pro Volumen
W/W	Masse pro Masse
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

1.1. Klinische Bedeutung von *Salmonella*-Infektionen

Salmonella ist eine Gattung begeißelter, Gram-negativer Bakterien in der Familie der Enterobakterien (*Enterobacteriaceae*). In der Gattung *Salmonella* finden sich zwei Spezies, *S. enterica* und *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005, 2005). *S. enterica* wird weiter in 6 Unterarten unterteilt, davon ist überwiegend die Unterart I, *S. enterica* subsp. *enterica*, von klinischer Bedeutung. Salmonellen werden auf Grund unterschiedlicher Oberflächenantigene (H-Antigen der Geißeln, O-Antigen des Lipopolysaccharids und Vi-Antigen) in mehr als 2500 Serotypen eingeteilt. Aufgrund der Krankheitsbilder im Menschen unterscheidet man zwischen enteritischen und typhösen Salmonellen.

Die Infektion mit enteritischen Salmonellen führt im immunokompetenten Wirt innerhalb einer kurzen Inkubationszeit (5 - 72 h) zu einer Lokalinfection des Darmtrakts, die spontan ausheilt. Der Ursprung der Infektion ist oft zoonotisch, wobei die Aufnahme über kontaminierte Nahrung erfolgt. In Europa wurden im Jahr 2007 151.995 Fälle von gastroenteritischen Salmonelleninfektionen gemeldet (Westrell *et al.*, 2009). Die Anzahl an nicht gemeldeten Infektionen ist jedoch wesentlich höher einzuschätzen (Voetsch *et al.*, 2004). Die überwiegende Anzahl an Salmonellenbedingten Durchfallerkrankungen wird durch die Serotypen Enteritidis (*S. Enteritidis*) und Typhimurium (*S. Typhimurium*) hervorgerufen (Herikstad *et al.*, 2002).

Typhöse Salmonellen, d.h. *Salmonella enterica* Serotyp Typhi (*S. Typhi*), Paratyphi A, B und C, verursachen im Menschen nach einer Inkubationszeit von 7 bis 14 Tagen eine zyklische Allgemeininfektion, die als *Typhus abdominalis* oder enterisches Fieber bezeichnet wird. Weltweit starben im Jahr 2000 mehr als 216.000 Menschen an Typhus, mehr als 21.000.000 Menschen sind im selben Zeitraum an *S. Typhi* erkrankt. Im Gegensatz zu Salmonellen mit breitem Wirtsspektrum wie *S. Typhimurium* ist *S. Typhi* an den Menschen angepasst. Das einzige Erregerreservoir sind subklinisch infizierte Dauerausscheider, in deren Gallenblase *S. Typhi* über Jahre hinweg überleben kann. Etwa 5 % aller an Typhus Erkrankten werden zu Dauerausscheidern, wenn keine Behandlung erfolgt.

1.2. Pathogenese der Infektion mit *S. Typhimurium*

Ein vereinfachtes Schema der ersten Abschnitte der Pathogenese der Infektion mit *S. Typhimurium* ist in Abb. 1A dargestellt. Nach der Aufnahme von mit

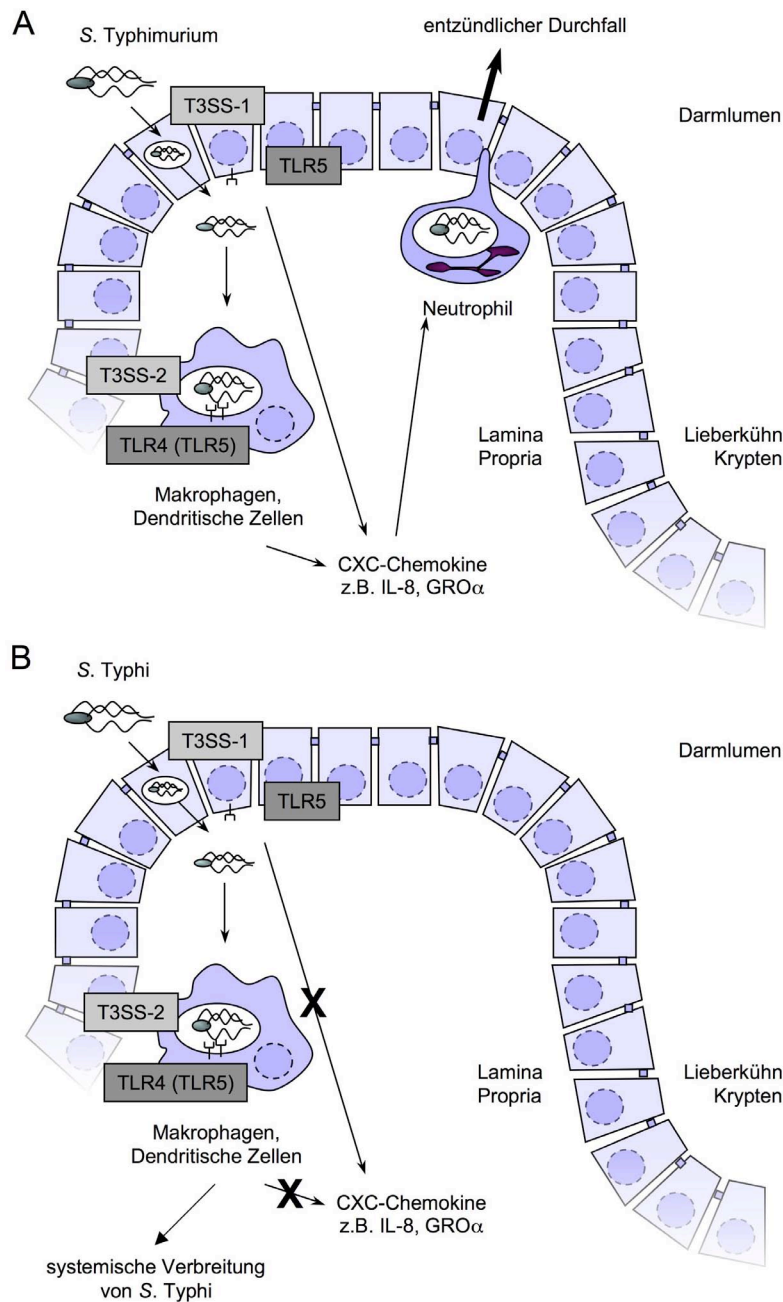


Abb. 1: Schematische Darstellung der ersten Abschnitte der Pathogenese der Infektion mit *S. Typhimurium* (A) bzw. *S. Typhi* (B). Der Prozess ist im Text erläutert.

S. Typhimurium kontaminierter Nahrung oder Flüssigkeit erfolgt die Invasion im unteren Dünndarmbereich durch Enterozyten und M-Zellen des follikel-assoziierten Epithels, welches die Peyer'schen Plaques bedeckt (Zhang *et al.*, 2003b, Tukul *et al.*, 2006). Invasion und Replikation von *S. Typhimurium* in der Mukosa führt zur Produktion von CXC-Chemokinen (Zhang *et al.*, 2003a). Die Ausschüttung von CXC-Chemokinen als Folge der Invasion mit *S. Typhimurium* führt zu einer lokalen Rekrutierung von polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile) (Day *et al.*, 1978,

Frost *et al.*, 1997, McGovern & Slavutin, 1979, Santos *et al.*, 2002) und schließlich zu entzündlichem (eitrigem) Durchfall.

Wichtige bakterielle Virulenzfaktoren und Prozesse des Immunsystems wurden durch Experimente in Zellkultur und in Tierversuchen identifiziert. Als Modelle für die menschliche Salmonellen-Gastroenteritis können Streptomycin-vorbehandelte Mäuse und Rinder (Kälber) verwendet werden (Barthel *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2001a, Santos *et al.*, 2001b). Sowohl das von allen humanpathogenen Salmonellen exprimierte Invasions-assoziierte Typ-3-Sekretionssystem (T3SS-1), kodiert von der *Salmonella* Pathogenitätsinsel (SPI) -1, als auch Flagellen (Beweglichkeit) tragen maßgeblich zur Invasion von Epithelzellen bei (Galan & Curtiss, 1989, Jones *et al.*, 1981, Galan & Curtiss, 1991). Mutanten, die über kein funktionelles T3SS-1 mehr verfügen, sind bei oraler Verabreichung stark attenuiert (Galan & Curtiss, 1989). Durch das T3SS-1 werden Effektorproteine in das Zytosol der Epithelzellen eingeschleust und induzieren durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts das sog. „*membrane ruffling*“ (Galan, 1999, Jones *et al.*, 1993, Haraga *et al.*, 2008). In der *lamina propria* werden die Erreger von den lokalen, professionellen Phagozyten aufgenommen. Alternativ gelangen Salmonellen durch das „*sampling*“ von Dendritischen Zellen in das Gewebe (Hapfelmeier *et al.*, 2008). Das in SPI-2 kodierte T3SS-2 verhindert das Abtöten der phagozytierten Salmonellen, ermöglicht die Replikation in Makrophagen und ist notwendig für die systemische Kolonisierung (Ochman *et al.*, 1996, Waterman & Holden, 2003, Hensel *et al.*, 1995). Beide T3SS sind notwendig für das Auslösen des Entzündungsprozesses *in vivo* (Santos *et al.*, 2001b, Barthel *et al.*, 2003).

Die Infektion von Epithelzellen und Makrophagen mit *S. Typhimurium in vitro* führt zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) -Kinasen und zur Sekretion von Neutrophil-rekrutierenden CXC-Chemokinen wie Interleukin (IL) -8 (Hobbie *et al.*, 1997, McCormick *et al.*, 1993, Pace *et al.*, 1993, Nau *et al.*, 2002). Zu dieser Aktivierung können zwei unterschiedliche Mechanismen beitragen (Tukel *et al.*, 2006). Zum einen können translozierte Effektorproteine des T3SS-1 direkt für Phosphorylierung von MAP-Kinasen, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 und die Expression von CXC-Chemokinen in Epithelzellen verantwortlich sein (Hobbie *et al.*, 1997, Hardt *et al.*, 1998). Zum anderen können Pathogen-assoziierte molekulare Muster („*pathogen associated molecular pattern*“, PAMP) durch Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like receptors, TLRs) zu einer Reaktion des angeborenen Immunsystems in Epithelzellen und Makrophagen beitragen. Das Lipid A des Lipopolysaccharids (Endotoxin) von *Salmonella* und die freie Untereinheit des Flagellen-Filaments, monomeres Flagellin, aktivieren TLR4 bzw. TLR5 (Poltorak

et al., 1998, Hayashi *et al.*, 2001, Smith *et al.*, 2003). Monozyten exprimieren eine Vielzahl von TLRs, darunter auch TLR4 und TLR5 (Iwasaki & Medzhitov, 2004). TLR5 wird außerdem auf der basolateralen Seite von polarisierten Epithelzellen exprimiert (Zeng *et al.*, 2003). Die Aktivierung von Makrophagen und Epithelzellen durch TLR Liganden führt zur Produktion und Ausschüttung von CXC-Chemokinen, die als chemotaktische Faktoren für Neutrophile wirken (Zeng *et al.*, 2003, Snella, 1986). Im Falle einer Infektion mit enteritischen Salmonellen, z.B. *S. Typhimurium* kommt es zu einem exudativen Infiltrat. Neutrophile können im Stuhl nachgewiesen werden (Day *et al.*, 1978, Frost *et al.*, 1997, McGovern & Slavutin, 1979, Santos *et al.*, 2002). In immunkompetenten Patienten bleibt die bakterielle Infektion als Folge der zellulären Barriere der Neutrophile auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt.

1.3. Erste Schritte der Pathogenese von *S. Typhi*-Infektionen

Ebenso wie enteritische Salmonellen wird *S. Typhi* durch kontaminierte Nahrung aufgenommen. Im Menschen induziert *S. Typhi* im Gegensatz zu *S. Typhimurium* nach erfolgter Invasion im Ileum anfangs nur geringe pathologische Veränderungen und es kommt zu einer systemischen Verbreitung des Erregers. Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen etwa 30% der Patienten Durchfallssymptome. Es finden sich im Stuhl jedoch kaum Neutrophile, sondern überwiegend Monozyten (seröse Entzündung) (Nguyen *et al.*, 2004, Kraus *et al.*, 1999, Mukawi, 1978, Sprinz *et al.*, 1966).

Da *S. Typhi* stark an den Menschen als Wirt angepasst ist, lassen sich außer Schimpansen keine anderen Säugetiere stabil mit dem Erreger infizieren (Gaines *et al.*, 1968). Die meisten Erkenntnisse über die Pathogenese von *S. Typhi* werden deshalb durch Zellekulturexperimente bzw. durch Vergleiche mit anderen Serotypen gewonnen. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Invasion von *S. Typhi* ähnlich wie mit *S. Typhimurium* abläuft (Abb. 1B), da beide Serotypen die genetische Information zur Expression von Flagellen und des T3SS-1 besitzen. Obwohl das Effektor-Repertoire des T3SS-1 in *S. Typhi* etwas verändert ist, hat dies keinen Einfluss auf die Invasivität (Raffatellu *et al.*, 2005b).

Im Gegensatz zu *S. Typhimurium* resultiert die Infektion von menschlichem Dickdarmgewebe *ex vivo* mit *S. Typhi* nicht in erhöhter Transkription von IL-8 (Raffatellu *et al.*, 2005a). Das Zusammenspiel von *S. Typhi* mit der Mukosa des Dünndarms, das letztlich zur Produktion von CXC-Chemokinen wie IL-8 führt, kann durch Darmkarzinomzelllinien *in vitro* untersucht werden. Als humane Epithelzelllinien werden oft T84- oder Caco-2-Zellen verwendet (Eckmann *et al.*,

1993, McCormick et al., 1993). In diesen Zelllinien wird der MAP-Kinase Signalweg durch den TLR5 Liganden Flagellin aktiviert. Dies wiederum führt zur Sekretion von IL-8 (Yu et al., 2003, Gewirtz et al., 2001a). Die Aktivierung von T84-Zellen mit *S. Typhimurium* oder gereinigtem Flagellin führt zu vergleichbaren Transkriptionsprofilen (Gewirtz et al., 2001a, Zeng et al., 2003). Bei der Infektion von polarisierten T84-Zellen mit *S. Typhi* hingegen unterbleibt die Induktion der Transkription dieser entzündungsfördernden Gene (Zeng et al., 2003). Auch menschliche Makrophagen (-Zelllinien) werden wesentlich schwächer durch *S. Typhi* zur Sekretion von CXC-Chemokinen angeregt als durch *S. Typhimurium* (Sharma & Qadri, 2004, Raffatellu et al., 2005a). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass *S. Typhi* neue Virulenzfaktoren erworben oder existierende Faktoren verändert haben muss, um die Erkennung durch die angeborene Immunantwort schon in den ersten Abschnitten der Infektion zu verhindern (Tsolis et al., 2008). Die Faktoren, die für diese Unterschiede in der Pathogenese von *S. Typhimurium* und *S. Typhi* verantwortlich sind, sind unbekannt oder sehr unzureichend charakterisiert.

1.4. Der *viaB*-Locus von *S. Typhi* verhindert die Induktion der angeborenen Immunantwort

Ein Vergleich der Sequenzen der chromosomalen DNA von *S. Typhi* und *S. Typhimurium* zeigt, dass mehr als 95 % aller Gene in beiden Serotypen zu finden sind. SPI-7 ist eine 134 kb umfassende Pathogenitätsinsel, die im Chromosom von *S. Typhi* kodiert ist, aber nicht im Genom von *S. Typhimurium* zu finden ist (Deng et al., 2003, Parkhill et al., 2001, McClelland et al., 2001). Flankierende tRNA-Gene sind ein Indiz dafür, dass diese Region durch horizontalen Gentransfer erworben wurde. SPI-7 enthält u. a. die genetische Information zur Biosynthese des Vi Kapselantigens, das *tviABCDEvexABCDE* (*viaB*)-Operon (Johnson & Baron, 1969, Houg et al., 1992). Diese 14 kb große DNA-Region enthält die genetische Information, die für die Regulation (*tviA*), die Biosynthese der Monomere (*tviBCDE*) und den Export (*vexABCDE*) des extrazellulären Vi-Polysaccharids erforderlich sind (Virlogeux et al., 1996). Das Vi-Antigen ist ein lineares, saures Polysaccharid aus α -1,4 verknüpfter (2-deoxy)-2-*N*-Acetylgalacturonsäure mit variabler Acetylierung an der C-3 Position (Heyns & Kiessling, 1967).

Ein Großteil (>99 %) aller klinischen *S. Typhi*-Isolate sind Vi-positiv, obwohl SPI-7 genetisch instabil ist (Wain et al., 2005). Passagieren von *S. Typhi* unter Laborbedingungen kann zum Verlust von SPI-7 führen, der resultierende Stamm ist folglich Vi-negativ (Bueno et al., 2004, Nair et al., 2004). Vi-negative Isolate sind

anfälliger für Phagozytose durch professionelle Phagozyten (Looney & Steigbigel, 1986) und aktivieren Epithelzellen und Makrophagen wesentlich besser als Vi-positive Isolate (Hirose *et al.*, 1997, Sharma & Qadri, 2004). Die Prävalenz von Vi-positiven, klinischen *S. Typhi*-Isolaten und frühe Studien, in denen Vi-positive und -negative Stämme verglichen wurden, haben zu der Hypothese Anlass gegeben, dass das Vi-Antigen die Pathogenese von *S. Typhi* entscheidend beeinflusst.

Durch neuere Experimente mit isogenetischen Mutanten konnte schlüssig gezeigt werden, dass das *viaB*-Operon die Aktivierung von TLRs durch *S. Typhi* reduziert: die Infektion einer menschlichen, TLR4-exprimierenden Makrophagen-Zelllinie und einer TLR5-exprimierenden Dickdarmepithel-Zelllinie mit einer Vi-negativen *viaB*-Deletionmutante führte zu einer wesentlich stärkeren IL-8-Sekretion als mit dem Vi-positiven Wildtyp (Raffatellu *et al.*, 2007, Raffatellu *et al.*, 2005a). In der Mukosa von infizierten Rindern und Streptomycin-vorbehandelten Mäusen reduziert das *viaB*-Operon die Induktion einer entzündungsfördernden Immunantwort. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass das *viaB*-Operon die Transkription von CXC-Chemokinen wie GRO α (CXCL1 im Rind), KC (CXCL1 in der Maus) und MIP-2 (CXCL2 in der Maus) signifikant reduziert (Raffatellu *et al.*, 2007, Haneda *et al.*, 2009). Diese Hemmung der angeborenen Immunantwort ist unabhängig von T3SS-1 (Haneda *et al.*, 2009) und wahrscheinlich auf eine verminderte Erkennung von bakteriellen Produkten durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zurückzuführen (Wilson *et al.*, 2008, Raffatellu *et al.*, 2005a). Zusammenfassend unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass die Ausprägung einer angeborenen Immunantwort durch den *viaB*-Locus verhindert wird und damit der Erwerb des *viaB*-Operons ein kritischer Schritt während der Evolution von *S. Typhi* war. Unklar ist hingegen der molekulare Mechanismus dieser Immunevasion, die durch das Vi-Antigen selbst oder den Regulator TviA vermittelt werden könnte.

1.5. Koordinierte Regulation von T3SS-1, Flagellen und Vi-Antigen in *S. Typhi*

Die Expression von extrazellulären Polysaccharidkapseln wird in etlichen Mitgliedern der Familie der Enterobacteriaceae durch das RcsCDB-Phosphorelay-System, ein modifiziertes Zwei-Komponenten-System, reguliert (Majdalani & Gottesman, 2005). RcsC und RcsD interagieren und fungieren dabei als membranassoziierte Hybrid-Histidinkinase. Nach Autophosphorylierung wird eine Phosphatgruppe auf den Antwortregulator RcsB übertragen (Abb. 2A). Die Phosphorylierung führt zu einer Änderung der Konformation und damit zu einer

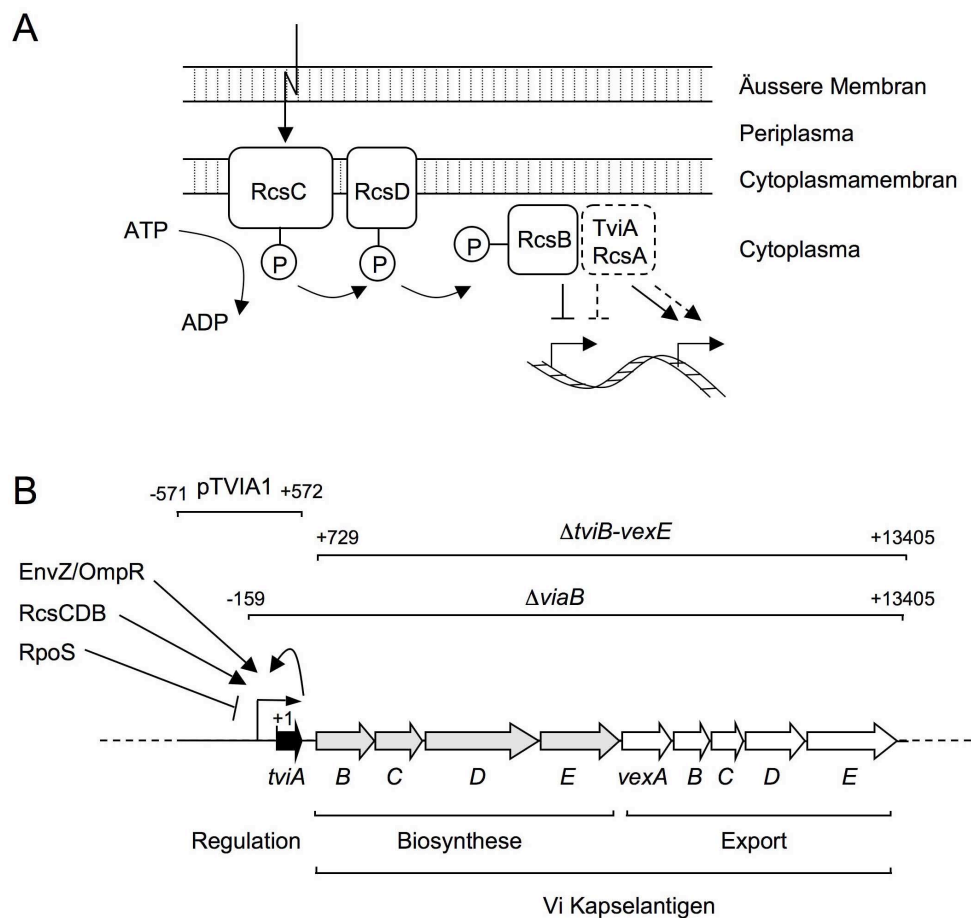


Abb. 2: (A) Schematische Darstellung des RcsC/RcsD/RcsB-Phosphorelay-systems. Veränderungen in der Membran führen zur Aktivierung und Auto-phosphorylierung der Histidinkinase RcsC. Übertragung der Phosphatgruppe auf RcsC und anschließend auf den DNA-bindenden Antwortregulator RcsB führt zu einer Konformationsänderung von RcsB. Je nach der Position der Bindungsstelle von RcsB in Relation zum Transkriptionsstart kann RcsB aktivierend oder reprimierend wirken. Hilfsproteine wie TviA oder RcsA können die Aktivität des Antwortregulators weiter modifizieren. **(B) Genetische Organisation des *viaB*-Operons von *S. Typhi* Ty2.** Zahlen geben die Position verschiedener Mutationen oder DNA-Fragmente relativ zum Startcodon von *tvIA* an.

Änderung der Aktivität des Antwortregulators, z. B. Affinität für DNA-Sequenzen in Ziel-Promotoren. Hilfsproteine wie z. B. RcsA interagieren mit RcsB und erlauben eine zusätzliche Regulation des Antwortregulators. Dieses modifizierte Prinzip des klassischen Zwei-Komponenten-Systems wurde bis jetzt nur bei dem RcsCDB-Phosphorelay-Systems beobachtet und genauer charakterisiert (Majdalani & Gottesman, 2005).

In *S. Typhi* wird die Expression des *viaB*-Operons und damit des Vi-Antigens durch das RcsCDB-Phosphorelay-Systems positiv reguliert (Abb. 2B). RcsB ist für die Transkription des *tvIA*-Gens erforderlich (Virlogeux *et al.*, 1995, Virlogeux *et al.*,

1996). TviA selbst aktiviert die Transcription des *viaB*-Operons und ist damit ein Autoaktivator (Virlogeux et al., 1995, Virlogeux et al., 1996). Es wird angenommen, dass TviA als Hilfsprotein die Aktivität von RcsB verändert und so die Genregulation beeinflusst (Abb. 2A) (Majdalani & Gottesman, 2005, Virlogeux et al., 1996). Das Signal, welches das RcsCDB-Phosphorelay-System aktiviert ist unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass Veränderungen in der Membran (Stress) zu diesem Prozess beitragen. Zusätzlich aktiviert das osmo-sensitive Zwei-Komponenten-System EnvZ/OmpR die Expression des Vi-Antigens (Abb. 2B) (Pickard et al., 1994). Der alternative, Stress-induzierbare Sigma-Faktor RpoS reprimiert die Produktion des Vi-Antigen (Santander et al., 2007).

Expression des Vi-Antigens und damit *tviA* wird durch niedrige Osmolarität induziert. Hochsals-Bedingungen hingegen reprimieren die Vi-Antigenproduktion (Pickard et al., 1994). In Medium mit geringer Osmolarität ist die Expression von Flagellen und des T3SS-1 durch *S. Typhi* im Vergleich zu *S. Typhimurium* wesentlich stärker reprimiert (Arricau et al., 1998). Damit ist die Expression von Flagellen und T3SS-1 reziprok gekoppelt an die des *viaB*-Operons. Da all diese Virulenzfaktoren durch das RcsCDB-Phosphorelay-System reguliert werden, wurde postuliert dass diese *S. Typhi* spezifische Osmoregulation durch das RcsCDB-System vermittelt wird (Arricau et al., 1998). Da die Aminosäuresequenzen von RcsB, RcsC und RcsD in *S. Typhi* und *S. Typhimurium* zu mehr als 99 % identisch sind, ist diese Schlussfolgerung nicht überzeugend. Hingegen wurde die Rolle des Hilfsproteins TviA in der koordinierten Expression von Virulenzfaktoren kaum charakterisiert.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Um die Unterschiede der Pathogenese von Infektionen mit *S. Typhi* und *S. Typhimurium* zu erklären, wurde der Erwerb von neuen Virulenzfaktoren, z.B. Toxin-ähnlichen Proteinen, Typ-IVB Pilus, etc. diskutiert (Kingsley & Baumler, 2002). Alternativ wird der Verlust von (Virulenz-) Genen in *Salmonella*-Serotypen, die sich an eine bestimmte Wirtsspezies angepasst haben und die auf diese Spezies beschränkt sind, als Faktor vorgeschlagen (Liu et al., 2007, Holt et al., 2009). Relativ wenig Beachtung hingegen hat die veränderte Genregulation bestehender Virulenzfaktoren als Bestandteil der Wirtsanpassung gefunden.

Das durch horizontalen Gentransfer erworbene *viaB*-Operon erlaubt *S. Typhi* die Evasion der angeborenen Immunantwort. Als Teil des *viaB*-Operons wurde ein neuer Regulator, TviA, in bestehende regulatorische Netzwerke integriert. Deshalb wird die innovative, **zentrale Hypothese** dieser Arbeit wie folgt formuliert:

Neben dem Erwerb von neuen Virulenzfaktoren trägt eine veränderte Regulation von existierenden Faktoren durch TviA zur Pathogenese von S. Typhi bei.

Verschiedene Aspekte dieser Hypothese wurden experimentell durch die folgenden **spezifischen Ziele** überprüft:

1. Charakterisierung des regulatorischen Netzwerks von TviA. Zielgene, die von TviA reguliert werden, sollten durch Genexpressionsprofil-Studien identifiziert werden. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die Integration des Hilfsproteins TviA in das RcsC/RcsD/RcsD-Phosphorelay-System zur Osmoregulation von Virulenzfaktoren in *S. Typhi* beiträgt. Ein Manuskript bezüglich dieser Studien ist zur Publikation eingereicht (Winter *et al.*, 2009b).

2. Einfluss von TviA auf die durch TLR5 vermittelte IL-8-Produktion menschlicher Darm-Epithelzellen. Durch Experimente mit humanen Epithelzell-Modellen wurde getestet, ob der Regulator TviA oder das Vi-Antigen für die reprimierte Sekretion von CXCL8-Chemokinen nach Infektion mit *S. Typhi* verantwortlich sind. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich diese Eigenschaften auf enteritische Serotypen wie *S. Typhimurium* durch Transfer des *tviA*-Gens übertragen lassen. Ein Teil dieser Ergebnisse wurden bereits anderweitig veröffentlicht (Winter *et al.*, 2008).

3. Einfluss von TviA auf die Minderung einer entzündungsfördernden, angeborenen Immunantwort durch *S. Typhi in vivo*. TviA reprimiert die Sekretion von Flagellin. Als essentieller Bestandteil des Flagellenfilaments kann Flagellin zum Auslösen einer angeborenen Immunantwort *in vivo* durch zwei Mechanismen beitragen: Flagellen tragen durch Beweglichkeit zur Gewebeinvasion bei, während das Flagellin-Monomer durch das Immunsystem direkt erkannt wird. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus mikrobieller und Maus-Genetik entwickelt, um den relativen Beitrag dieser beiden möglichen Mechanismen in zwei verschiedenen Tiermodellen zu untersuchen. Des Weiteren sollte in einem Tiermodell untersucht werden, ob *tviA* einen Einfluss auf die entzündungsfördernde, angeborene Immunantwort hat. Ein Teil dieser Ergebnisse wurden bereits anderweitig veröffentlicht (Winter *et al.*, 2009a).

2. Material und Methoden

Experimente wurden wie in (Winter et al., 2009b, Winter et al., 2009a) und (Winter et al., 2008) beschrieben durchgeführt. Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, in Analysenqualität von Sigma-Aldrich, BD und Invitrogen bezogen.

2.1. Kultivierung von Mikroorganismen

Wenn nicht anders angegeben, wurden *E. coli*-, *S. Typhimurium*- und *S. Typhi*-Stämme bei 37°C in Luria Bertani (LB) Flüssigmedium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) oder auf LB-Agarplatten (1.5 % Agar) unter aeroben Bedingungen kultiviert. Optimale Expression von TviA und/oder des Vi-Antigens wurde durch Kultivierung in SOB-Flüssigmedium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ 10 mM MgSO₄) (Raffatellu et al., 2005a) oder in Trypton/Hefeextrakt-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt) (Winter et al., 2009b) erzielt. *S. Typhi*-Exkonjuganten wurden nach der Konjugation auf modifiziertem Simmons-Citrat-Agarplatten (1 g/l (NH₄)H₂PO₄, 1 g/l K₂HPO₄, 5 g/l NaCl, 2 g/l Citrat (Na-Salz), 0,2 g/l MgSO₄, 0,04 g/l Tryptophan, 0,04 g/l Cystein, 15 g/l Agar, 0,08 g/l Bromthymolblau) (Winter et al., 2008) isoliert. Saccharose-Selektion wurde wie beschrieben auf Saccharoseplatten (8 g/l Nutrient Broth, 5 % (w/v) Saccharose, 15 g/l Agar) durchgeführt (Lawes & Maloy, 1995). Wenn relevant wurde die Produktion des Vi-Antigens vor Beginn des Experiments durch Agglutination mit Vi-Antiserum (BD) getestet. Falls zutreffend, wurden Antibiotika mit den folgenden Konzentrationen zu den Nährmedien gegeben: Carbenicillin 0,1 mg/ml, Chloramphenicol 0,1 mg/ml, Kanamycin 0,05 mg/ml, Nalidixinsäure 0,05 mg/ml, Streptomycin 0,1 mg/ml und Tetracyclin 0,02 mg/ml. X-Gal, ein chromogenes Substrat für β -Galactosidase, wurde in einer Konzentration von 0,04 mg/ml verwendet.

2.2. Stämme und Plasmide

Bakterienstämme und Plasmide, die für diese Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 1 bzw. 2 aufgeführt. Die Konstruktion der Plasmide und Mutanten ist in den nächsten Kapiteln näher beschrieben.

Tabelle 1: Genotyp und Quelle der verwendeten Mikroorganismen.

Stamm	Genotyp oder relevante Informationen	Quelle
<i>E. coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara - leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
CC118 λ <i>pir</i>	<i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 phoA</i> Δ20 <i>galE galK thi rpsE rpoB argE_{am} recA1 λpir</i>	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
DH5α λ <i>pir</i>	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r ⁻ m ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) _{U189} φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 λ <i>pir</i>	(Pal <i>et al.</i> , 2005)
S17-1 λ <i>pir</i>	C600::RP4 2-(<i>tet::Mu</i>) (<i>kan::Tn7</i>) λ <i>pir recA1 thi pro hsdR</i> (r ⁻ m ⁺)	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
S. Typhimurium		
LT2	Avirulenter Laborstamm, ATCC 700720	(Lilleengen, 1948)
IR715	Virulenter, spontan Nalixinsäure-resistenter Abkömmling von ATCC 14028 (Wildtyp)	(Stojiljkovic <i>et al.</i> , 1995)
EHW26	IR715 <i>fliC::Tn10 fljB5001::MudJ</i>	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
GY1135	SL1344 <i>invG::pFUSE</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SPN303	IR715 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494)	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SPN305	IR715 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494)::pSPN29	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SPN313	IR715 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494) <i>fljB5001::MudCm</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SPN315	IR715 <i>flgK5396::MudJ</i> Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494) <i>fljB5001::MudCm</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SPN452	IR715 Δ <i>invA::tetRA</i> Δ <i>spiB::Kan^r</i>	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2009)
SW215	IR715 <i>flgK5396::MudJ</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW358	IR715 <i>flgK5396::MudJ</i> Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494) <i>fljB5001::MudCm invA::pSW127</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SW399	IR715 <i>invA::pSW127</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SW429	IR715 Δ <i>rcsB::Kan^r</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW473	IR715 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494) <i>fljB5001::MudJ</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
SW474	IR715 <i>phoN::tviA</i>	unveröffentlicht
TH1077	LT2 <i>fliC5050::MudJ</i>	(Gillen & Hughes, 1991)
TH3730	P(<i>flhDC</i>)5451::Tn10dTc(del-25)	(Karlinsky <i>et al.</i> , 2000)

Stamm	Genotyp oder relevante Informationen	Quelle
TH4054	LT2 <i>flhC5456::MudJ</i>	(Herikstad <i>et al.</i> , 2002)
TH4881	LT2 pNK2880(Carb ^r , Tn10 <i>tnpA</i> [ats-1 ats-2]) <i>fliC5050::MudJ fljB5001::MudCm</i>	(Rappleye & Roth, 1997)
TH5507	LT2 <i>flgK5396::MudJ</i>	(Aldridge <i>et al.</i> , 2003)
TH10049	LT2 <i>fliZ5691::MudJ</i>	(Wozniak & Hughes, 2008)
S. Typhi		
Ty2	Wildtyp ATCC 19430, Vi ⁺	(Weil & Felix, 1920)
STY2	Ty2 Δ <i>viaB::Kan^r, Vi⁻</i>	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
STY3	Ty2 Δ <i>viaB::Kan^r fliC</i> (Carb ^R)	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
STY4	Ty2 Δ <i>viaB::Kan^r invA::pINV5</i> (Cm ^R)	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
SW74	Ty2 Δ <i>tviB-vexE::Cm^r, Vi⁻</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW184	Ty2 Δ <i>viaB::Kan^r fliC::pSW61</i> (<i>fliC::lacZYA</i> , Cm ^r)	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW186	Ty2 Δ <i>viaB::Kan^r flhC::pSW63</i> (<i>flhC::lacZYA</i> , Cm ^r)	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW197	Ty2 <i>flhC::pSW63</i> (<i>flhC::lacZYA</i> , Cm ^r)	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW199	Ty2 <i>fliC::pSW61</i> (<i>fliC::lacZYA</i> , Cm ^r)	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW222	Ty2 <i>invA::pINV5</i> (Cm ^r)	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
SW237	<i>rcsB::pSW77</i> (<i>rcsB::lacZYA</i>)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW239	Δ <i>viaB::Kan^r rcsB::pSW77</i> (<i>rcsB::lacZYA</i>)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW299	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>rscB::Kan^r</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW347	Ty2 Δ <i>viaB</i> , Vi ⁻	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW359	Ty2 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW452	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>rscB::Kan^r flhC::pSW63</i> (<i>flhC::lacZYA</i>)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW477	Ty2 Δ <i>tviB-vexE::Cm^r</i> <i>P(flhDC)5451::Tn10dTc</i> (del 25)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW483	Ty2 Δ <i>viaB</i> Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW491	Ty2 <i>P(flhDC)5451::Tn10dTc</i> (del 25)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW492	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>P(flhDC)5451::Tn10dTc</i> (del 25)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW513	Ty2 Δ <i>rscB::Kan^r</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW531	Ty2 <i>fliZ5691::MudJ</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW532	Ty2 Δ <i>viaB</i> <i>fliZ5691::MudJ</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW533	Ty2 Δ <i>tviB-vexE::Cm^r fliZ5691::MudJ</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW550	Ty2 Δ <i>fliC</i> (-25 to +1494) Δ <i>invA::tetRA</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
SW605	Ty2 Δ <i>rscB::Kan^r flhC::pSW63</i> (<i>flhC::lacZYA</i>)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)

Stamm	Genotyp oder relevante Informationen	Quelle
SW612	Ty2 $\Delta rcsB::Kan^r P(flhDC)5451::Tn10dTc$ (del 25)	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

	Beschreibung	Quelle
pCMXX	Cm ^r Kassetten	(Baumler <i>et al.</i> , 1997)
pUC4-KSAC	Kan ^r Kassetten	Amersham-Pharmacia
pFUSE	Suizid-Plasmid, Operonfusion von <i>lacZYA</i> und Zielgen	(Baumler <i>et al.</i> , 1996)
pGP704	<i>ori</i> (R6K), <i>mob</i> (RP4), Amp ^r	(Miller & Mekalanos, 1988)
pHP45Ω	<i>ori</i> (pMB1), Amp ^r , Strep ^r	(Prentki & Krisch, 1984)
pINV5	pINV5:: <i>invA</i> ^r , Inaktivierung von <i>invA</i>	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
pSPN29	Regionen 5' und 3' des <i>fliC</i> Gens in pRDH10, Konstruktion von <i>fliC</i> -Deletionsmutanten	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
pSW55	Chloramphenicolresistenzkassette zwischen 5' Region von <i>tviB</i> und 3' Region von <i>vexE</i> in pGP704, <i>tviB-vexE</i> -Deletionsmutante	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
pSW61	pFUSE:: <i>fliC</i> ^r , <i>lacZYA</i> -Fusion mit <i>fliC</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
pSW63	pFUSE:: <i>flhC</i> , <i>lacZYA</i> -Fusion mit <i>flhC</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
pSW77	pFUSE:: <i>rscB</i> ^r , <i>lacZYA</i> -Fusion mit <i>rscB</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
pSW97	Kanamycinresistenzkassette zwischen 5' und 3' Region von <i>rscB</i> in pGP704, Konstruktion von <i>rscB</i> -Deletionsmutanten	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
pSW127	pGP704:: <i>invA</i> ^r , Inaktivierung von <i>invA</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
pSW129	Flankierende Regionen des <i>viaB</i> Operons in pRDH10, Konstruktion von <i>viaB</i> -Deletionsmutanten	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
pRCSB1	<i>rsc</i> Promotor und <i>rscB</i> Gen in pWSK29	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
pRDH10	<i>ori</i> (R6K) <i>mob</i> (RP4) <i>sacRB</i> , Cm ^r , Tc ^r	(Kingsley <i>et al.</i> , 1999)

	Beschreibung	Quelle
pTVIA1	<i>tviA</i> Promotor und <i>tviA</i> Gen in pWSK29	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2007)
pWSK29	<i>ori</i> (pSC101), Amp ^r	(Wang & Kushner, 1991)

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Plasmide wurden für Restriktionsanalysen (*screening*) mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ (Qiagen) wie beschrieben isoliert. 1,5 ml dieser Kultursuspension wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß 2 min bei 20.000 g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer lysiert und die Suspension mit 350 µl N3 Puffer neutralisiert. Das Rohextrakt wurde auf eine Zentrifugationssäule aufgetragen, die Säule 1 min bei 20.000 g zentrifugiert, 750 µl Waschpuffer PE zugegeben, wiederum 1 min bei 20.000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Säule wurde durch Zentrifugation 1 min bei 20.000 g getrocknet. Die Elution erfolgte durch Auftragen von 40 µl H₂O auf die Säule und anschließende Zentrifugation 1 min bei 20.000 g zentrifugiert.

Plasmide zu Klonierungszwecken wurden mit Hilfe des „QIAfilter Midi Kits“ (Qiagen) gereinigt. Zur Isolation von „*high-copy number*“ Plasmiden wurde eine Übernachtskultur (LB-Medium) mit einem Volumen von 30 ml mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und wie beschrieben inkubiert. Für „*low-copy number*“ Plasmide wurde das Kulturvolumen verdoppelt. 25 bzw. 50 ml der Suspension wurden am nächsten Tag in einem 50 ml Greiner-Röhrchen 15 min bei 3.220 g zentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurden die Zellen alkalisch lysiert. Nach 5 min wurde die Lösung durch Zugabe des gleichen Volumens an Puffer P3 neutralisiert. Denaturierte Proteine und denaturierte chromosomale DNA wurden durch Filtration abgetrennt. Der erhaltene Überstand (Rohextrakt) wurde auf eine mit 5 ml Puffer QBT äquilibrierte Anionentauschersäule aufgegeben. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 5 ml Puffer QF. DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt, die Suspension 20 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml 80% (v/v) Ethanol resuspendiert und 5 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das DNA Pellet getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in TAE-Flachbettgelen durchgeführt. Die Endkonzentration an Agarose betrug abhängig von der molekularen Masse der

zu untersuchenden Fragmente 0,8 bis 1,5% (w/v) in TAE-Laufpuffer (40 mM Tris, 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 7,8). Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens an Probenpuffer (40% (v/v) Glucose; 1 mM EDTA; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einem elektrischen Feld von 6 V/cm für 50 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch Färbung mit SYBR-Safe (Invitrogen) im UV-Licht.

DNA Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „Qiaex II Kits“ (Qiagen) gereinigt. Die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen Fragmente wurden mit 0,7 ml QX1 und eine Lösung wurde bei 55°C solange inkubiert, bis die Agarose vollständig geschmolzen ist. Dann wurden 10 µl Qiaex II Suspension zu der Lösung gegeben und diese nach 5 Minuten Inkubationszeit für 1 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die Silikat-Matrix wurde in 500 µl PE-Puffer resuspendiert, 1 min bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde nach dem Abnehmen des Überstands nach dem letzten Waschschritt an der Luft getrocknet und in 20 µl s. H₂O aufgenommen, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Suspension 1 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und enthielt die gereinigten DNA-Fragmente.

2.2.2. Konstruktion von Plasmiden

Die Klonierung von DANN-Fragmenten wurde wie von (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben durchgeführt. Kits wurden nach Angaben des Herstellers oder wie angegeben verwendet.

DNA-Fragmente wurden durch PCR (PCR Supermix HiFidelity, Invitrogen) aus *S. Typhimurium* IR715 oder *S. Typhi* Ty2 amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide (Operon Biotechnologies) sind in Tabelle 3 aufgeführt und wurden mit einer Endkonzentration von 2 µM verwendet. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, gereinigt (Qiaex II Gel Extraction Kit, Qiagen) und in den Vektor pCR2.1 TOPO (TOPO-TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert. Das Ligationsgemisch wurde durch chemische Transformation in *E. coli* TOP10 eingebracht. Plasmide von Kolonien mit geringer β-Galactosidaseaktivität (weiße Kolonien auf LB Agarplatten supplementiert mit Kanamycin und X-Gal) wurden isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen), durch Restriktionsanalyse weiter analysiert und falls notwendig sequenziert (Seqwright, Fisher Scientific).

Zur weiteren Klonierung wurden Plasmide gereinigt (QIAfilter Plasmid Midi Kit, Qiagen) und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (Nanodrop, Thermo Fisher). Dabei wurde angenommen dass 1 A₂₆₀ einer Konzentration von 0,05

mg/ml entspricht. 2 µg Plasmid-DNA wurde mit > 20 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) 2 h lang bei optimaler Temperatur und Pufferbedingungen behandelt. Rinderserumalbumin (BSA) wurde falls erforderlich mit einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml verwendet. Falls notwendig wurde Antarktische Phosphatase oder Klenow Fragment der DNA Polymerase (New England Biolabs) für 30 min vor Ende der Restriktion zugegeben. DNA Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, gereinigt („Qiaex II Gel Extraction Kit“, Qiagen) und ligiert („Quick Ligation Kit“, New England Biolabs). Die Ligation wurde durch chemische Transformation in *E. coli* eingebracht. Plasmide mit dem *ori*(pSC101) wurden in TOP10, Plasmide mit dem *ori*(R6K) wurden in DH5α *λpir* oder in CC118 *λpir* propagiert. Transformanten wurden auf Selektivmedium isoliert (LB Agarplatten supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum). Plasmide wurden isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen), durch Restriktionsanalyse charakterisiert und falls notwendig teilweise sequenziert.

Die 5'- und 3'-Regionen des *fliC*-Gens von *S. Typhimurium* LT2 wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 3 amplifiziert. Die Produkte wurden gereinigt, mit XbaI geschnitten und ligiert. Die Ligation wurde als Matrize für die darauffolgende PCR verwendet, um ein Fragment zu erhalten, das die 5' und die 3' Region des *fliC* Gens enthält. Das Produkt wurde in pCR2.1 eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde mit BamHI geschnitten und in mit BamHI geschnittenen Vektor pRDH10 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pSPN29 genannt.

Das Plasmid pSW55, verwendet zur Deletion der *tviB-vexE*-Gene, wurde wie folgt konstruiert: Die 3'-Region des *vexE*-Gens und die 5'-Regions von *tviB* wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 3 von *S. Typhi* Ty2 amplifiziert und jeweils in pCR2.1 kloniert. Die 3'-Region wurde dann über die Sall- und XbaI-Schnittstellen in pGP704 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit BglIII und Sall geschnitten und mit der mit BamHI und Sall behandelten 5' Region (von *tviB*) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde mit Sall geschnitten, mit Klenow-Fragment der Polymerase I behandelt und mit der durch SmaI geschnittenen Cm^r-Kassette von pCMXX ligiert.

Die Plasmide pSW61, pSW66 und pSW71 ermöglichen nach Rekombination in das bakterielle Chromosom die Konstruktion von transcriptionellen *lacZYA*-Fusionen (Operon-Fusion) mit dem *fliC*-, dem *flhC*- bzw. dem *rcsB*-Gen. Ein Teil der kodierenden Sequenz (interne Fragmente) von *fliC*, *flhC* bzw. *rcsB* aus *S. Typhi* Ty2 wurde durch PCR amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Die internen Fragmente wurden über XbaI- und SmaI- Schnittstellen in pFUSE kloniert.

Das Plasmid pSW97 wurde wie folgt konstruiert: Die 5'- und 3'-Regionen des *rcsB* Gens von *S. Typhi* Ty2 wurden durch PCR amplifiziert und gereinigt. Eine äquimolare Mischung der beiden DNA Fragmente wurde als Matrize für die darauf folgenden PCR verwendet. Das Produkt umfasst die 5'- und die 3'- Regionen, die durch einen kurzen Linker verbunden sind. Dieses DNA-Fragment wurde in pCR2.1 subkloniert und durch EcoRI- und BglII-Schnittstellen in pGP704 eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde mit EcoRI geschnitten, mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I behandelt und mit der Kanamycin-Kassette (EcoRV) von pUC4-KSAC ligiert.

pSW127 wurde zur Inaktivierung des *invA*-Gens verwendet. Ein internes Fragment des *invA*-Gens wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 3 amplifiziert, in pCR2.1 subkloniert und über SmaI- und XhoI- Schnittstellen in pGP704 kloniert.

Die Kanamycin-Kassette der markierten Mutation des *viaB*-Operons wurde mit Hilfe des Plasmids pSW129 entfernt. Ein Plasmid, das die 5'- und 3'- Region des *viaB*-Operons von *S. Typhi* CT18 enthält (in pGP704 kloniert) wurde von (Raffatellu et al., 2005a) beschrieben. Dieses Plasmid wurde mit SphI und BglII geschnitten und mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I behandelt, um die verknüpften „*upstream*“ und „*downstream*“ Regionen zu erhalten. pRDH10 wurde mit EcoRI linearisiert und mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I behandelt. Beide Fragmente wurden ligiert, um pSW129 zu erhalten.

Das Plasmid pTVIA1 erlaubt die Expression von *tviA* durch den Wildtyp-Promotor. Das *tviA*-Gen zusammen mit der etwa 600 bp grossen Promotorregion wurde durch PCR von *S. Typhi* Ty2 amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit EcoRI und KpnI geschnitten und das DNA-Fragment mit dem *tviA*-Gen mit dem EcoRI/KpnI-restringierten „*low copy number*“-Plasmid pWSK29 ligiert.

Das Plasmid pRCSB1 codiert das *rcsB* Gen unter Kontrolle des *rcsD* (*yojN*)-Promotors. Das *rcsDB*-Operon von *S. Typhi* Ty2 wurde durch PCR amplifiziert, in pCR2.1 subkloniert und unter Verwendung der BamHI- und XhoI-Restriktionsschnittstellen in pWSK29 kloniert. Das dadurch erhaltene Plasmid wurde mit MluI und SmaI geschnitten, mit dem Klenow-Fragment der Polymerase I behandelt und religiert, um einen Grossteil des *rcsD*-Gens zu deletieren.

Tabelle 3: Sequenzinformation von Oligonukleotiden für Klonierungsarbeiten. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Zueinander komplementäre Sequenzen sind kursiv gedruckt.

Sequenz (von 5' zu 3')	Erläuterung	Quelle
<u>GGATCC</u> CAGCATAACGACGAAG <u>GTCGAC</u> ATTCAGATACGCTAC <u>GTCGAC</u> GTCCACCATCAGTAGCACAACG <u>TCTAGAG</u> CACGGACTGTTCCCTTGCG	PCR-Amplifikation der 5'- Region von <i>tviB</i> und der 3'- Region von <i>vexE</i> , Konstruktion der $\Delta tviB$ - <i>vexE</i> Mutante	(Winter <i>et al.</i> , 2008) (Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
TTTGGCGGATCCTTCCAGCGGCTCTTTACG TATGGCTCTAGATGATGTTATTGGGCTGTTGC TATGCGTCTAGAGATTGATTCACCGACACG TTTGGCGGATCCTACACCTGTTCCAGTTCCG	PCR-Amplifikation der 5'- und der 3'- Region von <i>fliC</i> , Konstruktion der $\Delta fliC$ -Mutante	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
<u>AGATCT</u> GGCTGGCGATTTGCG <i>CGTTCAGCTAGTCAAGTGGATATCATCGCTTTTATGTTACC</i> <i>CACTTGACTAGCTGAACGGATATCGTATTGGGCTACTTTGC</i> <u>GAATTCTAAGCGTAAAGGGCTGC</u>	PCR-Amplifikation der 5'- und der 3'- Region von <i>rcsB</i> , Konstruktion der $\Delta rcsB$ -Mutante	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
<u>CCCGGGT</u> GAAATTATCGCCACG <u>CTCGAGT</u> CATCGCACCGTCAAAG	PCR-Amplifikation eines Teils von <i>invA</i> , Inaktivierung von <i>invA</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009a) (Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
<u>TCTAGA</u> ACAGATCCTATTACAGCC <u>CCCGGG</u> GAGATTTACCATTTG	PCR-Amplifikation eines Teils von <i>fliC</i> , <i>fliC::lacZYA</i> -Fusion	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
<u>TCTAGA</u> AATTGTTACAGGAAGCTCG <u>CCCGGGT</u> TAAACAGCCTGTTC	PCR-Amplifikation eines Teils von <i>flhC</i> , <i>flhC::lacZYA</i> -Fusion	(Winter <i>et al.</i> , 2008)
<u>GCCTCTA</u> GATGAACAATATGAAC <u>CCCGGGC</u> AGCAGACGAGAAAC	PCR-Amplifikation eines Teils von <i>rcsB</i> , <i>rcsB::lacZYA</i> -Fusion	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
<u>CTCGAG</u> TTTCAGACACACCCGGC <u>GGATCC</u> TGGGTAACATAAAAGCG	Komplementation von <i>rcsB</i>	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
<u>GGTACCC</u> AGTATGACGTTCTG <u>CGAATTC</u> TTGTCCGTGTTTTAC	Komplementation von <i>tviA</i>	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2007)

2.2.3. Konstruktion von Mutanten durch homologe Rekombination und Suizid-Plasmide

Plasmide mit dem *ori*(R6K) benötigen zur Replikation das II Protein (kodiert von dem λ *pir* Gen) und können nur in λ *pir*-positiven Stämmen stabil propagiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Stämme exprimieren diese Protein nicht und unterstützen die Replikation von sog. Suiziplasmiden, d.h. Plasmide, deren einziger Replikationsursprung der *ori*(R6K) ist, nicht. Suizid-Plasmide wurden wie beschrieben konstruiert und dann in S17-1 λ *pir* durch chemische Transformation eingeführt (Ausubel *et al.*, 1994). Durch Konjugation auf LB-Platten wurden die Plasmide in die entsprechenden *Salmonella*-Stämme eingebracht. Exkonjuganten, also Stämme, bei denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert wurde, wurden durch Selektion auf modifizierten Simmons-Citrat-Agarplatten supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum (*S. Typhi*) oder LB-Platten supplementiert mit Nalidixinsäure und dem entsprechenden weiteren Antibiotikum (*S. Typhimurium*) isoliert.

Das *invA*-Gen in *S. Typhimurium* bzw. *S. Typhi* wurde mit Hilfe der Plasmide pSW127 bzw. pINV5 unterbrochen. pSW127 wurde durch Konjugation in IR715 eingebracht und die Integration in das Chromosom durch PCR bestätigt. Der Stamm wurde als SW399 bezeichnet. pINV5 wurde durch Konjugation in *S. Typhi* Ty2 eingeführt (SW222).

Die *rcsB*-Deletionsmutanten SW429 und SW299 wurden unter Verwendung des Plasmids pSW97 konstruiert. pSW97 wurde in *S. Typhimurium* IR715 bzw. SW347 durch Konjugation eingebracht und Kan^r Carb^s („*double crossover*“) Kolonien isoliert.

Um die unmarkierte Δ *viaB*-Mutante (SW347) zu erhalten, wurde das Plasmid pSW129 in die markierte Δ *viaB*::Kan^r-Mutante (STY2) konjugiert und Cm^R-Kolonien auf modifizierten Simmons-Citrat-Agarplatten isoliert. Eine Übernachtskultur (LB) dieser Kultur wurde verdünnt, auf Saccharoseplatten ausplattiert und eine Kan^S-Cm^S-Kolonie isoliert.

Das Plasmid pSW55 wurde in *S. Typhi* Ty2 konjugiert und Cm^r- und Carb^s-Kolonien auf modifizierten Simmons-Citrat-Agarplatten isoliert. Der resultierende Stamm wurde als SW74 bezeichnet.

lacZYA-Fusionen zu den Genen *flhC*, *fliC* und *rcsB* wurde durch Verwendung der Plasmide pSW63, pSW61 bzw. pSW77 erreicht. Die Integration von pSW63, pSW61 bzw. pSW77 in das Chromosom des *S. Typhi* Wildtyp-Stamms Ty2, der

$\Delta viaB$ -Mutante (STY2), der $\Delta rcsB$ -Mutante (SW513) bzw. der $\Delta viaB \Delta rcsB$ -Mutante (SW299) führte zur Konstruktion der Stämme SW197, SW199, SW237, SW186, SW184, SW239, SW605 bzw. SW452 (siehe Tab. 1).

2.2.4. Generalisierte Transduktion mit dem Phagen P22

Der Phage P22 HT int-105 wurde wie beschrieben für die generalisierte Transduktion verwendet (Miller, 1972). Phagenlysate wurden wie folgt hergestellt: 1ml P22 Flüssigmedium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l Glucose, 10 g/l NaCl, 0,2 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 3,9 g/l KH_2PO_4 , 5 g/l K_2HPO_4 , 3,5 g/l $Na(NH_4)HPO_4$, 10^7 PFU/ml P22) wurde mit 4 ml Übernachtskultur des Donors gemischt und 16 h aerob bei 37°C inkubiert. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (10.000g, 10 min) abgetrennt und der Überstand mit Chloroform sterilisiert. Zur Transduktion in *S. Typhimurium* wurde das Phagenlysate 1:10, 1:100 und 1:1000 in PBS verdünnt, ein gleiches Volumen an Übernachtskultur des Empfängers zugegeben, diese Suspension 1 h bei RT inkubiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Phagen-freie Kolonien wurden von EBU-Agarplatten (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l Glucose, 5 g/l KH_2PO_4 , 12.5 mg/l Evans Blau, 25 mg/l Uranin, 15 g/l Agar) isoliert und gegen P22 H5 auf EBU-Agarplatten auf Sensitivität geprüft. Zur Transduktion in *S. Typhi* wurde 0,1 ml des Phagenlysats mit 0,5 ml Kultur gemischt, 2 h bei RT inkubiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Da *S. Typhi* resistent gegen P22 ist (keine lytischer Zyklus möglich), wurde in diesem Fall auf die Isolation auf EBU-Agarplatten verzichtet.

Die *flgK5396::MudJ*-Mutation wurde von TH5507 in IR715 transduziert, um SW215 zu erhalten.

Ein Phagenlysate von SW399 wurde verwendet, um die *invA::pSW127*-Mutation in SPN315 einzubringen. Der resultierende Stamm wurde als SW358 bezeichnet.

Die *fljB5001::MudJ*-Mutation wurde von EHW26 in SPN303 transduziert und die daraus resultierende Mutante als SW471 bezeichnet.

Die mit pSPN29 markierte $\Delta fliC$ -Mutation wurde von *S. Typhimurium* SPN305 in den *S. Typhi* Wildtyp Ty2 und in die $\Delta viaB$ -Mutante (STY2) transduziert und eine Cm^r Kolonie isoliert. Eine Übernachtskultur (LB) dieser Kultur wurde verdünnt, auf Saccharoseplatten ausplattiert und eine Cm^S -Kolonie als SW359 bzw. SW483 bezeichnet.

Die $P(flhDC)5451::Tn10dTc(\text{del } 25)$ -Mutation erlaubt die Expression von *flhDC* durch einen Tetrazyklin-induzierbaren Promotor. Ein Phagenlysat von GY1135 wurde benutzt, um diese Mutation in *S. Typhi* Ty2, SW74, SW513 bzw. SW347 einzubringen. Diese Mutanten wurden als SW491, SW477, SW492 bzw. SW612 bezeichnet.

Ein Phagenlysat von TH10049 wurde verwendet, um die $fliZ5691::MudJ$ -Mutation in *S. Typhi* Ty2, SW74 bzw. SW347 einzubringen. Die daraus resultierenden Mutanten wurden als SW531, SW533 bzw. SW532 bezeichnet.

Die $\Delta rcsB::Kan^r$ -Mutation wurde von *S. Typhimurium* SW429 in *S. Typhi* Ty2 transduziert, um den Stamm SW513 zu erhalten.

SW550 wurde durch Transduktion der $invA::tetRA$ -Mutation in SW359 erhalten.

2.3. Berechnung der Generationszeit

Die Trübung (optische Dichte) korreliert näherungsweise mit der Konzentration an Zellen in einer Suspension, so dass die Generationszeit aus einer durch Trübungsmessung ermittelten Wachstumskurve berechnet werden kann. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden 700 μl der Bakteriensuspension in eine Halbmikroküvette überführt und die optische Dichte OD_{600} bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Als Referenz wurde frisches Medium verwendet. Im Bereich des logarithmischen Wachstums kann der Verlauf der Wachstumskurve durch die Gleichung 1 und 2 angenähert werden. Die optische Dichte OD_{600} ist proportional zur Anzahl N der Zellen in einem bestimmten Volumenelement.

$$N(t) = N_0 * 2^{t/\tau} \quad (1) \qquad OD_{600}(t) = OD_{600,0} * 2^{t/\tau} \quad (2)$$

N_0 ist die Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$, t ist die vergangene Zeit, zu der die Anzahl N beobachtet wird. τ ist die Generationszeit. Durch Linearisierung erhält man Gleichung 3.

$$\ln[OD_{600}(t)] = \ln[OD_{600,0}] + \frac{t}{\tau} * \ln 2 \quad (3)$$

Die Generationszeit τ wurde über eine Regressionsgerade aus Gleichung 3 berechnet.

2.4. Färbung von Flagellen für Lichtmikroskopie

Die Färbung von unfixierten Bakterien wurde wie von (Mayfield & Inniss, 1977) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden 2 µl Kultur zu 5 µl einer Mischung von einem Teil 12 % (w/v) Kristallviolett in Ethanol und zehn Teilen Mordant [10 % (w/v) Tanninsäure (Gerbsäure), 2,5 % Phenol in gesättigter, wässriger $KAl(SO_4)_2$ Lösung] gegeben. Digitale Bilder wurden durch ein Zeiss Axiovert 200M inverses Mikroskop aufgenommen und mit Zeiss AxioCam MRC5 / Zeiss AxioVision 4.5 Software bearbeitet.

2.5. Beweglichkeitsexperimente

Die Beweglichkeit von *Salmonella*-Stämmen wurde unter Verwendung von Weichagarplatten (10 g/l Trypton, 3 g/l Agar) getestet. Weichagarplatten wurden mit frischen Kolonien mit Hilfe steriler Holzstäbchen angeimpft und, falls nicht anders angegeben, für 8 – 10 h (*S. Typhimurium*) oder 16 h (*S. Typhi*) bei 37°C inkubiert. Die Osmolarität wurde wenn erforderlich durch Zugabe von NaCl erhöht.

2.6. Messung der β -Galactosidaseaktivität

β -Galactosidaseaktivität wurde wie von (Miller, 1972) beschrieben gemessen. Bakterienstämme wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert und am nächsten Tag wie jeweils angegeben 1:50 entweder in frischem LB oder Trypton/Hefeextrakt-Flüssigmedium verdünnt. Falls notwendig wurde NaCl zugegeben, um die Osmolarität des Mediums zu erhöhen. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden die Kulturen auf Eis gekühlt und die Trübung OD_{600} gemessen. Eine Probe der Suspension (mit dem Volumen V) wurde in Z-Puffer (100 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0) zu einem Endvolumen von 1 ml verdünnt. Zellen wurden durch die Zugabe von 20 µl 0,1 % (w/v) SDS und 40 µl Chloroform lysiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml 4 mg/ml 2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid in Z-Puffer wurde das Reaktionsgemisch bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 nach der gemessenen Zeit t gestoppt und die Absorption bei den Wellenlängen von 420 (A_{420}) und 550 (A_{550}) gemessen. Die Aktivität a (in Miller Einheiten) wurde durch die folgende Gleichung (4) berechnet:

$$a = 1000 * \frac{A_{420} - 1,75 * A_{550}}{t * V * OD_{600}} \quad (4)$$

2.7. Isolierung bakterieller RNA

RNA wurde wie von (Winter *et al.*, 2009b) beschrieben aus *S. Typhi* extrahiert. 5 ml SOB oder Trypton/Hefeextrakt-Flüssigmedium wurde mit 0,1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. 0,8 ml 5 % (v/v) an wassergesättigtem Phenol in Ethanol wurde zu der Suspension pipettiert und 5 min bei 7.700 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 0,4 ml Lysepuffer (0,1 mg/ml lysozyme, 1mM EDTA 10mM, Tris/Cl pH 8.0) aufgenommen und 1h bei 25°C inkubiert. Nach der Zugabe von 40 µl 10 % (w/v) SDS wurde die Suspension 2 min bei 65°C gehalten. Als nächstes wurden 0,44 ml 1 M Natriumacetat und 0,9 ml heißes, wassergesättigtes Phenol dazu pipettiert und die Lösung 6 min lang bei 65°C inkubiert. Die Emulsion wurde dann auf Eis gestellt und 10 min bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige, wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,9 ml Chloroform extrahiert. Die organische und wässrige Phase wurde durch Zentrifugation bei 20.000 g 4°C, 5 min) getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugaben von 80 µl 1 mM EDTA, 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1ml Isopropanol gefällt. Die Proben wurden 30 min bei 20,000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml 80 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Suspension wurde für 5 min bei 20,000 g 5 min zentrifugiert, das Pellet getrocknet und anschließend in 50 oder 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Spuren von DNA wurden durch die Behandlung der RNA mit DNase I („DNafree Kit“, Ambion) entfernt. Dazu wurden 50 µl RNA mit 5 µl DNase I-Puffer gemischt, 1 µl DNase 1 zugegeben und 30 – 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µl DNase I „removal reagent“ wurde die Suspension zentrifugiert (20,000 g, 2 min, RT) und der Überstand, der die RNA enthält, abgenommen.

2.8. RNA-Extraktion von eukaryontischen Zellen und Gewebeproben

Zur Isolation von RNA aus menschlichen Epithelzellen oder tierischen Gewebeproben wurde „*Tri reagent*“ (Molecular Rearch Center) nach Angaben des Herstellers benutzt. Zellen wurden in 1 ml „*Tri reagent*“ lysiert. Tiefgefrorene (-80°C) Gewebeproben wurden vorher in einem mit N₂(l) gekühlten Mörser zerkleinert. Das Homogenisat wurde mit 200 µl Chloroform extrahiert und die Emulsion bei 12.000 g

und 4°C 15 min zentrifugiert. RNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und die Suspension 8 min bei 12.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 80 % (w/v) Ethanol gewaschen. Die Suspension wurde zentrifugiert (12.000 g, 5 min, 4°C), das Pellet getrocknet und in 30 oder 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Verunreinigungen durch DNA wurden unter Verwendung des „DNAfree Kits“ (Ambion) wie in Kapitel 2.7. beschrieben entfernt.

2.9. RT-PCR und Real-time PCR

cDNA wurde aus RNA durch „reverse transcriptase“-PCR (TaqMan *reverse transcription reagents*, Applied Biosystems) synthetisiert. 1 µg RNA wurde mit 5 µl RT-PCR Puffer, 11 µl 25 mM MgCl₂, 10 µl 2.5 mM dNTPs, 2,5 µl 50 µM Hexamer, 1 µl RNase-Inhibitor und 1,25 µl „MS Reverse Transkriptase“ gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde 10 min bei 25°C und 30 min bei 48°C inkubiert. Die Transkriptaseaktivität wurde anschließend durch Erhitzen auf 95°C (5 min) entfernt.

Quantitative Messung der Konzentration bestimmter Zielgene (in Form von cDNA) wurde durch „Real time“-PCR mit „SYBR-Green“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt. 12,5 µl SYBR-Green, 0,625 µl jedes Oligonukleotides (10 µM Stammlösung), 4 µl cDNA und 7,25 µl Wasser wurden gemischt und zweimal 11 µl in eine optische 384 Lochplatte pipettiert. Die PCR wurde mit dem „GeneAmp 7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) durchgeführt (Denaturierung: 95°C, 15 s, Hybridisierung/Verlängerung: 60°C, 1 min, 40 Zyklen). Die Spezifität jeder Reaktion wurde durch Schmelzpunktbestimmung des Produkts geprüft. Der Ct-Wert ist der (hypothetische) Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen subjektiven Grenzwert überschreitet. Die vergleichende Ct Methode (Gleichung 5) (Applied Biosystems) wurde zum Vergleich (Veränderung f) der behandelten Gruppe (G1) mit der Kontrollgruppe (K) bezüglich der Expression von Zielgenen (ZG) verwendet.

$$f = 2^{-\{[Ct(ST,G1)-Ct(ZG,G1)]-[Ct(ST,K)-Ct(ZG,K)]\}} \quad (5)$$

Zur Standardisierung (ST) wurde für Epithelzellen oder Gewebeproben das Transkript der GAPDH, für *S. Typhi* die mRNA des Sigmafaktors σ^{70} (*rpoD*) benutzt. Kontrolleexperimente, bei denen auf die Konzentration an

Guanylatmononukleotidkinase *gmk* standardisiert wurde, zeigten im Vergleich zu *rpoD* identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4: Oligonukleotide für *Real time* PCR

Serotyp / Spezies	Zielgen(e)	Sequenz	Quelle
<i>S. Typhi</i>	<i>rpoD</i>	5'-ACATGGGTATTCAGGTAATGGAAGA-3' 5'-CGGTGCTGGTGGTATTTTCA-3'	(Bohez <i>et al.</i> , 2006)
	<i>gmk</i>	5'-TTGGCAGGGAGGCGTTT-3' 5'-GCGCGAAGTGCCGTAGTAAT-3'	(Bohez <i>et al.</i> , 2006)
	<i>fliC</i>	5'-CTGTAAGTCTGCGGTGGGAAC-3' 5'-GGATGGCGGCTGGCATAAACTAC-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>fliZ</i>	5'-TGCTACTTGACGACGCTGCCTG-3' 5'-ACGCCACCCACTCCTTCTGCTC-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>fliC</i>	5'-GTAACGCTAACGACGGTATC-3' 5'-ATTTTCAGCCTGGATGGAGTC-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>hilA</i>	5'-ATTAAGGCGACAGAGCTGGA-3' 5'-GAATAGCAAACCCCGACGA-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>hilE</i>	5'-TAACGGGAAAACGGTCAAAG-3' 5'-GTGAAATTTCGCACATTGGTG-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>invG</i>	5'-CGAGTGCTGCCCCGTTTTTC-3' 5'-TCGTTGCCATCTTCAATGTCCAG-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
	<i>rcsB</i>	5'-AAATCGCCAAGAAGCTCAAC-3' 5'-CTCTAGCCCCAGTTTCATCA-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009b)
<i>Homo sapiens</i>	<i>IL8 (CXCL8)</i>	5'-GCCAACACAGAAATTATTGTAAAGCTT-3' 5'-CCTCTGCACCCAGTTTTCTT-3'	(Stylianou <i>et al.</i> , 2002)
	<i>MIP3A (CCL20)</i>	5'-CTGCTTTGATGTCAGTGCTGCTAC-3' 5'-CTGCCGTGTGAAGCCCACAATAAA-3'	(Johanesen & Dwinell, 2006)
	<i>GAPDH</i>	5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAAAGT-3' 5'-CCCCTCCTCCACCTTTGAC-3'	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Mus musculus</i>	<i>Ifng</i>	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3' 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Il6</i>	5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)

Serotyp / Spezies	Zielgen(e)	Sequenz	Quelle
	<i>Il17a</i>	5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAGA-3' 5'-AGCTTTCCCTCCGCATTGA-3'	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Kc (Cxcl1)</i>	5'-TGCACCCAAACCGAAGTCAT-3' 5'-TTGTCAGAAGCCAGCGTTCAC-3'	(Hu <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Mip2 (Cxcl2)</i>	5'-AGTGAAGTGCCTGTCAATGC-3' 5'-AGGCAAACCTTTTGACCGCC-3'	(Hu <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Mip3a (Ccl20)</i>	5'-CCAGGCAGAAGCAAGCAACT-3' 5'-TCGGCCATCTGTCTTGTA-3'	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Gapdh</i>	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	(Overbergh <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bos taurus</i>	<i>IFNG</i>	5'-TGATGGCATGTCAGACAGCA-3' 5'-GGCACAAGTCATATAGCCTGACAC-3'	(Meade <i>et al.</i> , 2007)
	<i>IL17A</i>	5'-CTTGGACTCTCCACCGCAA-3' 5'-GTCCACCTTCCCTTCAGCA-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
	<i>IL8 (CXCL8)</i>	5'-CTCTGTGTGAAGCTGCAGTTCTGTC-3' 5'-ATTTGGGGTGGAAAGGTGTGG-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
	<i>GRO (CXCL1, CXCL2, CXCL3)</i>	5'-GATGCTGTTCTGCTCCTGG-3' 5'-TGAGGTGAATCCCCTGCAA-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
	<i>MIP3A (CCL20)</i>	5'-GCTCCTGGCTGCTTTGATGT-3' 5'-TGGCCAGCTGCTGTGTGA-3'	(Winter <i>et al.</i> , 2009a)
	<i>GAPDH</i>	5'-TTCTGGCAAAGTGGACATCGT-3' 5'-GCCTTGACTGTGCCGTTGA-3'	(Raffatellu <i>et al.</i> , 2007)

2.10. Erstellung von Genexpressionsprofilen

5 ml SOB Flüssigmedium wurde mit 0,1 ml *S. Typhi*-Übernachtskultur angeimpft und die Suspension bei 37°C inkubiert, bis die Trübung der Kultur einen Wert von OD₆₀₀ = 0,4 – 0,5 erreicht hat. RNA wurde von jeweils zwei Kulturen des *S. Typhi*-Wildtyps Ty2 und der *rscB*-Mutante (SW237), der Δ *viaB*-Mutante (STY2) und der Δ *tvjB-vexE*-Mutante (SW74) isoliert. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.7. beschrieben gereinigt und mit DNase I behandelt.

Die cDNA-Präparation, Hybridisierung und Bildaufnahme wurde von der „UC

Davis ArrayCore Microarray Facility“ wie von (Seo *et al.*, 2008) beschrieben mit den folgenden Veränderungen durchgeführt: die cDNA wurde synthetisiert und entweder mit Alexa Flour 555 oder 647 (SuperScript Plus Indirect cDNA Labeling System, Invitrogen) markiert. Die markierte cDNA wurde bei einer Temperatur von 50°C 16 h an *S. Typhimurium*- / *S. Typhi*- Microarrays (Version 4, PFGRC/JCVI) hybridisiert.

Zur Verarbeitung der Daten wurde die „TM4 Microarray Software Suite“ eingesetzt (Saeed *et al.*, 2003). Rohdaten wurde durch einen globalen Locfit/LOWESS Algorithmus standardisiert (Quackenbush, 2002, Cleveland, 1979, Yang *et al.*, 2002). Werte der beiden biologischen Proben wurden gemittelt und eine Cluster-Analyse (Clustering Affinity Search Technique [CAST] Algorithmus) (Ben-Dor *et al.*, 1999, Promponas *et al.*, 2000) mit einem Grenzwert von 0.85 durchgeführt. Eine Änderung der Expression um einen Faktor 2 gegenüber der Kontrolle wurde in dieser Arbeit als signifikant bezeichnet. Diese Gene sind in Tabelle 5 aufgeführt (Details siehe Ergebnissteil). Die Genexpressionsstudie wurde unter der Nummer GSE15752 bei Gene Expression Omnibus (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) hinterlegt.

Tabelle 5: Gene, deren Transkription durch RcsB und/oder TviA reguliert wird. ND: nicht detektiert.

Locus	Gen	Beschreibung (übernommen vom Hersteller des Chips)	Ty2/SW237 Änderung	SW74/STY2 Änderung
t0166	<i>kdgT</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease	0.8	0.3
t0167		putative inner membrane protein	0.8	0.4
t0168		pyridoxine phosphate biosynthetic protein	1.1	0.3
t0169		putative transcriptional regulator (LysR family)	0.8	0.4
t0349		hypothetical protein	2.3	6.9
t0350		hypothetical protein	3.7	2.2
t0527	<i>ackA</i>	acetate kinase A (propionate kinase 2)	2.0	1.0
t0534	<i>lrhA</i>	NADH dehydrogenase transcriptional repressor (LysR family)	0.8	0.5
t0549		putative receptor/regulator protein	3.5	6.7
t0898	<i>fliP</i>	flagellar biosynthesis	3.3	2.5
t0899	<i>fliO</i>	flagellar protein FliO	3.3	2.5
t0900	<i>fliN</i>	flagellar biosynthesis, component of motor switch	3.8	3.1
t0901	<i>fliM</i>	flagellar biosynthesis, component of motor switch	3.9	2.6
t0902	<i>fliL</i>	flagellar biosynthesis	3.8	2.6
t0903	<i>fliK</i>	flagellar hook-length control protein	3.5	2.4
t0904	<i>fliJ</i>	flagellar protein	3.2	3.0
t0905	<i>fliI</i>	flagellum-specific ATP synthase	3.4	2.1
t0906	<i>fliH</i>	flagellar biosynthesis possible export of flagellar proteins	3.6	3.4
t0908	<i>fliF</i>	flagellar biosynthesis basal-body MS (membrane and	3.7	2.9

Locus	Gen	Beschreibung (übernommen vom Hersteller des Chips)	Ty2/SW237 Änderung	SW74/STY2 Änderung
		supramembrane)-ring		
t0909	<i>fliE</i>	putative Flagellar hook-basal body protein	5.3	3.0
t0915	<i>fliT</i>	flagellar biosynthesis possible export chaperone for FliD	2.1	4.9
t0916	<i>fliS</i>	flagellar biosynthesis repressor of class 3a	2.8	4.1
t0917	<i>fliD</i>	flagellar biosynthesis filament capping protein	2.6	5.5
t0918	<i>fliC</i>	flagellar biosynthesis protein	3.1	11.2
t0921	<i>fliZ</i>	FliZ protein	2.5	4.4
t0922	<i>fliY</i>	putative periplasmic binding transport protein	1.6	2.3
t0926	<i>sdiA</i>	transcriptional regulator of ftsQAZ gene cluster (LuxR/UhpA	1.8	3.9
t0944		putative outer membrane lipoprotein	3.5	2.9
t0945	<i>ftnB</i>	ferritin-like protein	0.4	0.8
t0952	<i>flhD</i>	regulator of flagellar biosynthesis	3.0	3.1
t0953	<i>flhC</i>	regulator of flagellar biosynthesis	4.0	2.0
t0954	<i>motA</i>	proton conductor component of motor, torque generator	2.8	4.9
t0955	<i>motB</i>	flagellar motor protein	2.8	4.0
t0956	<i>cheA</i>	sensory histidine protein kinase	2.9	7.6
t0957	<i>cheW</i>	purine-binding chemotaxis protein regulation	3.3	5.6
t0958	<i>cheM</i>	methyl accepting chemotaxis protein II, aspartate sensor-receptor	2.9	5.7
t0959	<i>cheR</i>	glutamate methyltransferase, response regulator for chemotaxis	2.4	5.7
t0960	<i>cheB</i>	methyl esterase, response regulator for chemotaxis	2.7	4.8
t0961	<i>cheY</i>	chemotaxis regulator	3.9	5.2
t0962	<i>cheZ</i>	chemotactic response CheY protein phosphatase	3.9	5.1
t0963	<i>flhB</i>	membrane protein responsible for substrate specificity switching from rod/hook-type export to filament-type export	2.5	1.7
t0965	<i>flhE</i>	flagellar protein	2.9	1.7
t1071	<i>nhaB</i>	NhaB family of transport protein, Na /H antiporter	1.2	2.1
t1079	<i>ycgR</i>	putative inner membrane protein	3.7	3.5
t1179		putative periplasmic protein	3.0	3.9
t1187	<i>spy</i>	periplasmic protein related to spheroblast formation	0.6	2.7
t1208		putative outer membrane protein	2.2	4.0
t1482	<i>adhP</i>	alcohol dehydrogenase, propanol preferring	1.1	2.1
t1503	<i>srfA</i>	putative virulence effector protein	2.3	2.2
t1504	<i>srfB</i>	ssrAB activated gene	3.0	3.4
t1505	<i>srfC</i>	ssrAB activated gene: predicted coiled-coil structure	3.0	2.9
t1618	<i>osmB</i>	osmotically inducible lipoprotein	0.6	2.6
t1708	<i>ycfJ</i>	putative outer membrane lipoprotein	0.4	2.7
t1736	<i>flgL</i>	flagellar biosynthesis hook-filament junction protein	3.1	4.5
t1737	<i>flgK</i>	flagellar biosynthesis, hook-filament junction protein 1	3.4	5.6
t1738	<i>flgJ</i>	flagellar biosynthesis	4.2	3.2
t1739	<i>flgI</i>	putative flagella basal body protein	4.8	2.8
t1740	<i>flgH</i>	flagellar biosynthesis, basal-body outer-membrane L (lipopolysaccharide layer)	4.0	2.6
t1741	<i>flgG</i>	flagellar biosynthesis, cell-distal portion of basal-body rod	5.1	2.6

Locus	Gen	Beschreibung (übernommen vom Hersteller des Chips)	Ty2/SW237 Änderung	SW74/STY2 Änderung
t1742	<i>flgF</i>	flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod	4.2	3.5
t1743	<i>flgE</i>	flagellar biosynthesis, hook protein	3.9	3.6
t1744	<i>flgD</i>	flagellar basal body rod modification protein	3.7	3.0
t1745	<i>flgC</i>	flagellar basal body rod protein	3.7	3.3
t1746	<i>flgB</i>	flagellar biosynthesis, cell-proximal portion of basal-body rod	4.0	3.0
t1747	<i>flgA</i>	flagellar biosynthesis assembly of basal-body periplasmic P	2.8	2.3
t1748	<i>flgM</i>	anti-FliA (anti-sigma) factor also known as RflB	2.9	4.5
t1749	<i>flgN</i>	flagella synthesis protein FlgN	2.9	4.8
t1759	<i>yceP</i>	putative cytoplasmic protein	0.5	0.9
t1774	<i>ymdA</i>	putative periplasmic protein	3.1	2.5
t1775		hypothetical protein	3.2	3.6
t1787		putative dehydrogenases and related proteins	0.8	0.4
t1791		putative inner membrane protein	0.8	0.4
t1828	<i>sopB</i>	<i>Salmonella</i> outer protein: homologous to ipgD of	2.3	8.6
t1829	<i>pipC</i>	Pathogenicity island encoded protein: homologous to ipgE	1.9	13.3
t1865		hypothetical protein	0.8	6.8
t2055	<i>ompX</i>	outer membrane protease, receptor for phage OX2	0.4	0.8
t2058	<i>glnH</i>	glutamine ABC transporter periplasmic-binding protein	0.4	1.0
t2104	<i>modC</i>	ABC superfamily (atp_bind), molybdate transporter	1.9	2.2
t2105	<i>modB</i>	ABC superfamily (membrane), molybdate transporter	1.8	3.0
t2106	<i>modA</i>	ABC superfamily (peri_perm), molybdate transporter	3.0	2.7
t2143	<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase, hydrophobic subunit	0.5	0.9
t2320	<i>fimA</i>	major type 1 subunit fimbria (pilin)	0.4	3.1
t2386	<i>ybaJ</i>	hypothetical protein	0.4	1.6
t2387	<i>hha</i>	haemolysin expression modulating protein	0.4	1.1
t2768	<i>sprB</i>	transcriptional regulator	3.5	3.1
t2769	<i>hilC</i>	bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	2.7	3.4
t2770		putative cytoplasmic protein	3.3	4.0
t2771	<i>orgA</i>	putative flagellar biosynthesis/type III secretory pathway protein	3.1	6.5
t2772		putative inner membrane protein	3.5	8.4
t2773	<i>prgK</i>	cell invasion protein lipoprotein, may link inner	3.1	10.1
t2774	<i>prgJ</i>	cell invasion protein cytoplasmic	2.5	13.6
t2775	<i>prgI</i>	cell invasion protein cytoplasmic	2.8	7.8
t2776	<i>prgH</i>	cell invasion protein	4.3	8.9
t2777	<i>hilD</i>	regulatory helix-turn-helix proteins, araC family	1.7	3.5
t2778	<i>hilA</i>	invasion genes transcription activator	4.2	5.1
t2779	<i>iagB</i>	cell invasion protein	3.5	3.8
t2780	<i>stpA</i>	tyrosine phosphatase	1.9	3.3
t2782		putative cytoplasmic protein	2.1	3.3
t2783	<i>iacP</i>	putative acyl carrier protein	2.3	3.3
t2784	<i>sipA</i>	cell invasion protein	2.6	5.6
t2785	<i>sipD</i>	pathogenicity island 1 effector protein	2.7	7.0
t2786	<i>sipC</i>	cell invasion protein	2.6	10.3

Locus	Gen	Beschreibung (übernommen vom Hersteller des Chips)	Ty2/SW237 Änderung	SW74/STY2 Änderung
t2787	<i>sipB</i>	cell invasion protein	2.2	9.4
t2788	<i>sicA</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	2.7	9.3
t2790	<i>spaR</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	2.2	3.3
t2792	<i>spaP</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	3.2	6.2
t2793	<i>spaO</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	3.7	5.3
t2794	<i>invJ</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	3.4	16.5
t2795	<i>invI</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	3.1	15.7
t2796	<i>invC</i>	surface presentation of antigens secretory proteins	3.4	12.8
t2797	<i>spak</i>	virulence-associated secretory protein	3.4	12.2
t2800	<i>invG</i>	invasion protein outer membrane	3.8	13.0
t2801	<i>invF</i>	possible AraC-family regulatory protein	3.6	9.9
t2802	<i>invH</i>	invasion protein	2.9	3.3
t2941		putative periplasmic protein	1.0	2.3
t3058		putative uronate isomerase	0.5	0.7
t3059		hypothetical protein	0.8	4.4
t3073		putative methyl-accepting chemotaxis protein	4.4	6.5
t3075		putative cytoplasmic protein	2.4	3.5
t3076		putative cytoplasmic protein	2.4	4.2
t3136	<i>cheM</i>	methyl-accepting chemotaxis protein II	2.9	6.0
t3137	<i>aer</i>	aerotaxis sensor receptor, senses cellular redox state	2.4	4.9
t3159	<i>yhaO</i>	putative HAAAP family transport protein	0.5	0.7
t3161	<i>tdcE</i>	pyruvate formate-lyase 4/ 2-ketobutyrate formate-lyase	0.5	1.0
t3163	<i>tdcC</i>	HAAAP family, L-threonine/ L-serine permease, anaerobically inducible	0.4	0.7
t3164	<i>tdcB</i>	threonine dehydratase, catabolic	0.4	0.6
t3165	<i>tdcA</i>	transcriptional activator of tdc operon (LysR family)	0.5	0.6
t3167	<i>garK</i>	glycerate kinase	0.4	0.8
t3168	<i>garR</i>	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	0.5	0.6
t3170	<i>garD</i>	galactarate dehydrogenase	0.5	0.9
t3242	<i>yrbL</i>	putative cytoplasmic protein	0.4	0.4
t3255	<i>nanT</i>	MFS family, sialic acid transport protein	0.4	1.0
t3300	<i>fis</i>	DNA-binding protein Fis	2.0	1.5
t3509	<i>gldA</i>	glycerol dehydrogenase, NAD	0.5	0.7
t3532	<i>glpK</i>	glycerol kinase	0.6	0.5
t3633	<i>rbsR</i>	transcriptional repressor for rbs operon (GalR/LacI family)	0.5	1.3
t3636	<i>rbsC</i>	ribose high-affinity ABC transporter permease component	0.4	1.0
t3716	<i>dsdX</i>	putative Gnt family transport protein	0.7	0.4
t3906	<i>yhjH</i>	putative Diguanylate cyclase/phosphodiesterase domain 3	4.1	2.5
t3925	<i>uspA</i>	universal stress protein A	0.5	0.8
t3945	<i>tcp</i>	methyl-accepting transmembrane citrate/phenol chemoreceptor	2.5	6.7
t3982	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme	0.4	0.5
t3983	<i>glgX</i>	glycogen debranching enzyme	0.4	0.5
t3984	<i>glgC</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	0.3	0.5
t3985	<i>glgA</i>	glycogen synthase	0.4	0.5
t3986	<i>glgP</i>	glycogen phosphorylase	0.4	0.8

Locus	Gen	Beschreibung (übernommen vom Hersteller des Chips)	Ty2/SW237 Änderung	SW74/STY2 Änderung
t3987	<i>glpD</i>	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (aerobic)	0.5	0.8
t4205	<i>melA</i>	alpha-galactosidase	13.9	1.1
t4206	<i>melB</i>	GPH family, melibiose permease II	7.8	1.0
t4221		putative AraC-type DNA-binding domain-containing protein	2.9	3.7
t4303	<i>sopE</i>	invasion-associated secreted protein.	2.4	33.5
t4344	<i>vexE</i>	Vi polysaccharide export protein	0.06	ND
t4345	<i>vexD</i>	Vi polysaccharide export inner-membrane protein	0.06	ND
t4346	<i>vexC</i>	Vi polysaccharide export ATP-binding protein	0.04	ND
t4347	<i>vexB</i>	Vi polysaccharide export inner-membrane protein	0.08	ND
t4348	<i>vexA</i>	Vi polysaccharide export protein	0.05	ND
t4349	<i>tviE</i>	Vi polysaccharide biosynthesis protein TviE	0.06	ND
t4350	<i>tviD</i>	Vi polysaccharide biosynthesis protein	0.04	ND
t4351	<i>tviC</i>	Vi polysaccharide biosynthesis protein, epimerase	0.03	ND
t4352	<i>tviB</i>	Vi polysaccharide biosynthesis protein, UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase	0.03	ND
t4353	<i>tviA</i>	Vi polysaccharide biosynthesis protein	0.03	0.1
t4430	<i>yjfO</i>	putative lipoprotein	0.5	0.8
t4459	<i>ytfK</i>	hypothetical protein	2.2	2.9
t4497	<i>rosE</i>	putative arginine repressor	0.4	0.3
t4498		putative arginine repressor	0.3	0.3
t4499		putative ornithine carbamoyltransferase	0.3	0.3
t4500		putative carbamate kinase	0.2	0.3
t4501		putative arginine deiminase	0.2	0.5
t4583	<i>tsr</i>	methyl-accepting chemotaxis protein I, serine sensor receptor	4.6	5.5

2.11. Fällung in den Kulturüberstand sekretierter Proteine und Analyse von extrazellulärem Flagellin

Proteine, die in den Kulturüberstand sekretiert wurden, wurden wie von (Winter *et al.*, 2008) beschrieben durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) isoliert. 5 ml SOB bzw. LB-Flüssigmedium wurde mit 250 µl bzw. 100 µl Übernachtkultur des jeweiligen Stammes angeimpft und 4 h bzw. 3 h bei 37°C inkubiert. Falls notwendig wurden Oberflächenstrukturen (z.B. Flagellen) durch Behandeln der eisgekühlten Kulturlösung mit einem T-25 Mixer (2 min, maximale Geschwindigkeit, IKA USA) von der Zelloberfläche gelöst. Die Suspension wurde 20 min bei 3.220 g und 4°C zentrifugiert. Zur Herstellung des Ganzzelllysats wurden das Pellet in Ladepuffer für die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (50 mM Tris/HCl; 100 mM DTT; 2% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10 % (w/v) Glycerin; pH 6,8) aufgenommen. Das Volumen des Ladepuffers wurde so angeglichen, so dass sich ein Konzentration von ca. 1×10^8 KBE / 10 µl ergab. Die

Proben wurden 3 – 5 min bei 100°C gekocht. Der Überstand der Zentrifugation wurde sterilfiltriert (0,2 µm) und Proteine durch Zugabe von TCA mit einer Endkonzentration von 12 % (w/v) gefällt. Die Lösung wurde bei 12.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefällten Proteine wurden zweimal mit jeweils 1 ml Aceton gewaschen (20.000 g, 10 min, 4°C), im Vakuum getrocknet und in 50 µl SDS-PAGE Ladepuffer aufgenommen.

2.12. SDS-PAGE und Western-Blot

Bakterielle Ganzzelllysate wurden wie folgt erhalten: 1 ml Kultur wurde zentrifugiert (20.000 g, 2 min, RT), der Überstand entfernt und die Bakterien in SDS-PAGE Ladepuffer aufgenommen. Das Volumen wurde so angeglichen, so dass die Endkonzentration ca. 1×10^8 KBE / 10 µl (basierend auf Trübungsmessung OD₆₀₀) betrug. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben 3 – 5 min bei 100°C gekocht.

Die SDS-PAGE wurde wie von (Ausubel *et al.*, 1994) beschrieben durchgeführt. Zur Herstellung eines Trenngels mit 10 % Polyacrylamid wurden 3,1 ml H₂O, 2,5 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Methylenbisacrylamid, 1,9 ml 4 x Tris/HCl pH 8,8, (1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8) 10 µl TEMED und 50 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung gemischt, in die Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach dem Erhärten des Trenngels gegossen. Dazu wurden 2,2 ml H₂O, 0,63 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Methylenbisacrylamid, 0,94 ml 4 x Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8), 5 µl TEMED und 25 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfatlösung gemischt und in die Gelkammer gegossen. Im Fall von Ganzzelllysaten wurden 10 µl (entsprechend etwa 10^8 KBE) pro Spur geladen. Zur Analyse von gefällten Kulturüberständen wurden 10 µl (entsprechend dem Kulturüberstand von 1 ml) geladen. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (3 g/l Tris, 18,8 g/l Glycin, 1 g/l SDS) bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

Unspezifische Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE erfolgte mit Coomassie Blau (0,05 % Brilliantblau G, 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol). Proteingele wurden mit 10 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol entfärbt.

Proteine wurden auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore) durch "nassen" (Trans-Blot, Biorad) Transfer übertragen. Die mit Methanol aktivierte und in Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol)

äquilibrierte Membran und das SDS-Gel wurden blasenfrei zwischen jeweils einer Lage Whatman-Filterpapier und einer Lage Schaumstoff zwischen Kathode und Anode platziert. Die Apparatur wurde mit Transferpuffer gefüllt und eine konstante Spannung (85 V) für 1 h angelegt.

Die Membran wurde in Absättigungspuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % (v/v) TWEEN 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat) in PBS) 1 h unter schütteln inkubiert. Erstantikörper (*Salmonella*-H-Antiserum d bzw. i, BD) wurden 1:1000 in Absättigungspuffer verdünnt und die Membran bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Zur Detektion von MAP-Kinasen wurde der Erstantikörper (p-ERK (Thr202/Tyr204), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) und p-p38 (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology) 1:1000 in BSA-Absättigungspuffer (5 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) TWEEN-20 in PBS) verdünnt und die Membran 16 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal jeweils 5 min mit Absättigungspuffer gewaschen und der Zweitantikörper, verdünnt in Absättigungspuffer, zugegeben und die Membran bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Für das *Salmonella*-H-Antiserum wurde als Zweitantikörper ein *goat-anti-rabbit*-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Bio-Rad laboratories) bzw. für die MAP-Kinasen-Antikörper ein *goat-anti-rabbit*-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Jackson Immunoresearch) verwendet. Nach dreimaligem Waschen in Absättigungspuffer erfolgte die Detektion mit Hilfe des „Immunstar Substrat Kits“ (Bio-Rad laboratories) bzw. des „*Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL) kits*“ (Millipore).

2.13. Zellkulturexperimente mit T84- und Caco-2-Dickdarmepithelzellen

Die Dickdarmkarzinomzelllinie T84 (American Type Culture Collection CCL-248) wurden in einer 1:1 Mischung aus Dulbecco's modifizierten Eagle Medium (DMEM) und F12 Medium (Gibco), mit 1,2 g/l Natriumbicarbonat, 2,5 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 0,5 mM Natriumpyruvat (Gibco) und 10% fötalem Rinderserum (FCS) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Für Experimente in 24 Lochplatten wurden 1x10⁵ Zellen (in 0,5 ml), für 6 Lochplatten 1x10⁶ Zellen (in 2 ml) ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt (Dulbecco's modifizierten Eagle Medium (DMEM)-F12 Medium (Gibco), mit 1,2 g/l Natriumbicarbonat, 2,5 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 0,5 mM Natriumpyruvat (Gibco)) und die Zellen weitere 24 h inkubiert.

Die Caco-2-Zelllinie wurde in „*minimum essential media*“ (MEM) (Eagle) (Gibco) mit 2,5 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essenziellen Aminosäuren, 1 mM

Natriumpyruvat, Earle's Salzlösung (BSS) und 15 % FCS passagiert. Für Experimente wurden Caco-2-Zellen in 24 Lochplatten ausgesät und 4 - 5 Tage bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert. Dann wurde das Kulturmedium durch frisches, Serum-freies Medium ersetzt.

2.13.1. Gentamicin-Schutzexperimente

Um die Invasivität von Salmonellen in Gentamicin-Schutzexperimenten zu untersuchen, wurden T84-Zellen wie beschrieben ausgesät. *S. Typhi*-Stämme wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert, am nächsten Tag 1:50 in Trypton/Hefeextrakt-Flüssigmedium verdünnt und bei 37°C inkubiert, bis die Trübung der Kultur (OD_{600}) einen Wert von 0.8 – 1.0 erreicht hat. Übernachtskulturen von *S. Typhimurium* wurden in LB verdünnt und 3 h aerob bei 37°C geschüttelt. Bakterien wurden in PBS verdünnt und T84-Zellen wurden mit einem 10-fachen Überschuss ($MOI = 10$) an Bakterien für 1 h infiziert. Die Zellen wurden 5-mal mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend 0,5 Serum-freies Medium mit 0,1 mg/ml Gentamicin zugegeben. Nach 90 min wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und in 0,5 ml 1 % (v/v) Triton-X-100 lysiert. Das Lysat wurde mit 0,5 ml PBS verdünnt und verschiedene Verdünnungsstufen (10-fach, in PBS) auf LB-Agarplatten ausplattiert.

2.13.2. Stimulation von T84- und Caco-2-Zellen mit *S. Typhi*

S. Typhi wurde in LB kultiviert und die Übernachtskultur in SOB-Flüssigmedium verdünnt. T84- und Caco-2-Zellen wurden in 6- oder 24-Lochplatten mit einer MOI („multiplicity of infection“) von 5:1 eine Stunde lang infiziert. Als Positivkontrolle wurde Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Sigma) mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml zugegeben. Gereinigtes Flagellin von *S. Typhimurium* (InvivoGen) oder *S. Typhi* (Gordon Dougan, Sanger Centre, UK) wurden, wenn nicht anders angegeben, mit einer Konzentration von 4 µg/ml eingesetzt.

Die Isolierung der RNA wurde wie in Kapitel 2.8. beschrieben durchgeführt. Zellen wurden vor der Lyse in *Tri* Reagenz einmal mit 1 ml PBS gewaschen.

Zur Bestimmung der Konzentration an sekretiertem IL-8 durch einen „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) wurden Zellen in 24-Lochplatten für 1 h infiziert, 4-mal mit PBS gewaschen und 0.5 ml Medium (2 % FCS, 100 µg/ml Gentamicin) zugegeben. Nach 90 min wurde das Kulturmedium durch frisches Medium (2 % FCS, 25 µg/ml Gentamicin) ersetzt und die Zellen 21 h und 30 min bei

37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die IL-8-Konzentration wurde mittels ELISA nach Angaben des Herstellers bestimmt (hIL-8 ELISA kit, BioLegend).

Zur Analyse der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 wurden T84-Zellen wie beschrieben in 6-Lochplatten infiziert, mit 2 ml PBS gewaschen und in 0,5 ml „*phosphosafe extraction reagent*“ (Novagen) mit 2,5 % Protease-Inhibitor (Sigma Aldrich) lysiert. Das Rohextrakt wurde 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (4°C). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Micro BCA kits (Pierce) bestimmt. Für SDS-PAGE und Western-Blots wurde 10 µg Protein pro Spur geladen.

2.13.3. Stimulation von T84-Zellen mit Kulturüberständen von *S. Typhimurium*

5 ml LB-Flüssigmedium wurde mit 100 µl *S. Typhimurium*-Übernachtkultur angeimpft und 3 h bei 37°C inkubiert. Durch Behandlung der Bakterien mit einem T-25 Mixer (1 min auf Eis) (IKA USA) wurden Oberflächenstrukturen abgeschert. Zellen wurden durch Zentrifugation (3.220 g, 10 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand sterilfiltriert. T84-Zellen wurden 1 h mit 5 µl dieser Lösung behandelt. Als Kontrolle wurden T84-Zellen mit 2 µg/ml gereinigtem *S. Typhimurium*-Flagellin (Invivogen) stimuliert. Die Isolierung der RNA wurde wie in Kapitel 2.8. beschrieben durchgeführt. Zellen wurden vor der Lyse in „*Tri reagent*“ einmal mit 1 ml PBS gewaschen.

2.14. IL-1β Sekretion durch Knochenmark-abgeleitete Makrophagen

Knochenmark-abgeleitete Makrophagen von C57BL6/J- und *Caspase1*^{-/-}-Mäusen wurden wie von (Wilson *et al.*, 2008) und (Winter *et al.*, 2009a) beschrieben isoliert. Oberschenkelknochen wurden mit BMM-Medium (RPMI, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mg/ml Penicillin and Streptomycin) ausgewaschen. Knochenmarkszellen wurden mit einer 1:2 Mischung von L929-Zellmedium (Rolan & Tsois, 2007) und BMM-Medium 3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und frisches Medium zugegeben. Nach weiteren 4 Tagen wurden adhären Zellen mit Trypsin-EDTA behandelt und durch Zentrifugation gesammelt (500 g, 3 min, RT). Knochenmark-generierte Makrophagen wurden in 24 Lochplatten in 10 % FCS, RPMI Medium ausgesät (5 x 10⁵ pro Loch) und 48 h kultiviert. 4 h vor der Infektion mit *Salmonella* wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS (*E. coli* O55:B5, Sigma) behandelt. Bakterien wurden wie folgt vor dem

Experiment kultiviert: 5 ml LB Flüssigmedium wurde mit einer frischen Kolonie angeimpft und 10 h bei 30°C inkubiert. Das LPS-haltige Medium der Makrophagen wurde durch 0,5 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen mit einem Überschuss von 10 Bakterien pro Makrophage infiziert. Da verschiedene Mutant unterschiedliche Beweglichkeit besaßen, wurde die Infektion wie folgt synchronisiert: Die Platte wurde 5 min bei 250 g und RT zentrifugiert und anschließend 25 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 0,5 ml PBS gewaschen und Medium mit 25 µg/ml Gentamicin zugegeben. Nach 18 h wurde der Kulturüberstand abgenommen. Die Zellen wurden in 0,5 ml 1% Triton-X-100 in DPBS lysiert und die Anzahl an überlebenden Bakterien durch Ausplattieren bestimmt. Die Konzentration an IL-1β im Kulturüberstand wurde mittels ELISA (mIL-1β, eBioscience) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.15. Tierexperimente

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der örtlichen „*Institutional Animal Care and Use Committee*“ durchgeführt.

2.15.1 Streptomycin-vorbehandelte Mäuse

Experimente mit Streptomycin-vorbehandelten Mäusen wurden wie beschrieben durchgeführt (Barthel et al., 2003, Winter et al., 2009a). „*Specific pathogen free*“ C57BL/6J (Jackson Laboratory) und *Caspase-1^{-/-}*- Mäuse wurden in einzelbelüfteten Käfigen gehalten und Futter und Wasser *ad libitum* bereitgestellt. 24 h vor der Infektion wurde 8 bis 12 Wochen alten Mäuse eine einmalige Dosis von 20 mg Streptomycin (in 0,1 ml H₂O) orogastrisch verabreicht. *S. Typhimurium*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium 16 h aerob bei 37°C inkubiert. Jeder Maus wurden entweder 0,1 ml steriles LB-Medium oder 1-2 x 10⁹ KBE *S. Typhimurium* (in 0,1 ml LB) orogastrisch verabreicht. 12 h nach der Infektion wurden die Mäuse durch CO₂ devitalisiert. Peyer'sche Plaques (5-7 pro Tier), das Zentrum und der distale Teil des Caecums (mit Lymphfollikel) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anzahl an KBE in den Peyer'schen Plaques (3 pro Tier), mesenterialen Lymphknoten, Leber, Milz und Darminhalt wurde durch Homogenisieren (T25-Mixer, IKA), Verdünnen und Plattieren der einzelnen Gewebekomponenten auf LB-Agarplatten mit Nalidixinsäure bestimmt.

Für die in Abbildung 21, 22A, B, C und 23 gezeigten Daten wurden 8 Wildtyp (C57BL/6J) Mäuse mit sterilem LB-Medium, 4 Wildtyp-Mäuse mit IR715, 9 Wildtyp-Mäuse mit SW215 und 9 Wildtyp-Mäuse mit SPN315 infiziert. Zusätzlich wurden 4 *Caspase-1*^{-/-}-Mäuse mit sterilem LB Medium, 6 *Caspase-1*^{-/-}-Mäuse mit SW215 und 5 *Caspase-1*^{-/-}-Mäuse mit SPN315 infiziert. Um die Daten aus Abbildung 22D und E zu erhalten, wurden jeweils 5 Wildtyp-Mäuse entweder mit sterilem LB-Medium, SW215 oder SPN315 infiziert.

2.15.2. „Bovine ligated ileal loop“-Modell

„Bovine ligated ileal loop“-Experimente wurden wie von (Santos *et al.*, 2001a) und (Winter *et al.*, 2009a) beschrieben durchgeführt. Bakterienstämme wurden 16 h bei 37°C in LB Medium kultiviert, 1:50 in LB verdünnt und weitere 3 h aerob inkubiert.

Vier 3 bis 4 Wochen alte Kälber, die keine klinisch auffälligen Symptome (insbesondere keine Ausscheidung von *Salmonella* durch Fäces) zeigten, wurden mit Propofol betäubt und mit Isofluran unter Narkose gehalten. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und das Ileum in etwa 5 bis 6 cm lange Abschnitte unterteilt. Entweder 3 ml steriles LB-Medium oder 2×10^9 KBE *S. Typhimurium* wurde in das Lumen des jeweiligen Abschnitte injiziert. Nach der Infektion wurde das Organ wieder in die Bauchhöhle gelegt. Nach 2 h Stunden wurden die einzelnen Abschnitten herausgeschnitten, gewogen und die angestaute Flüssigkeit gesammelt. Der leere Darmabschnitt wurde nochmals gewogen, der Länge nach geöffnet und 6 mm Biopsien der Mucosa genommen. Die Serosa wurde nach der Entnahme der Gewebeprobe entfernt. Die Biopsien wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Das Gewicht der Flüssigkeit wurde auf die Länge des Darmabschnitts standardisiert und die Flüssigkeitsansammlung des mit LB behandelten Abschnitts subtrahiert. Da ein Tier starke Blutung im Darmbereich aufwies, wurden die Daten der Flüssigkeitsansammlung nicht verwendet.

Um die Anzahl an lebenden *S. Typhimurium*-Bakterien im Gewebe abzuschätzen, wurden zwei 6 mm Biopsien dreimal mit PBS gewaschen, 1 h in 100 µg/ml Gentamicin in PBS bei RT inkubiert und in 5 ml PBS homogenisiert. Das Homogenisat wurde verdünnt und auf Selektivmedium (LB-Agarplatten mit Nalidixinsäure) ausplattiert.

2.16. Statistik

Zur Berechnung der Standardabweichung, des Standardfehlers oder zur Inferenzstatistik wurden Verhältnisse gemessener Größen (z.B. Änderung der Genexpression gegenüber Kontrollgruppe, etc.) logarithmisch transformiert. Ein parametrischer Test (Student's *t*-test) wurde verwendet, um zu Bestimmen, ob Datensätze signifikant unterschiedlich waren. Für Daten aus Genexpressionsanalysen, Zellkulturexperimenten und dem *ileal loop*-Modell wurde ein gepaarter *t* test eingesetzt. Daten von allen anderen Experimenten (Streptomycin-vorbehandelte Mäuse, etc.) wurden als nicht gepaart behandelt. Ein Wert von $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des regulatorischen Netzwerks von TviA

Das RcsCDB-Phosphorelay-System reguliert die Expression einer Vielzahl von Virulenzfaktoren in *Salmonella*, darunter das T3SS-1, das T3SS-2, Flagellen und die Länge des O-Antigens (Wang *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2008, Arricau *et al.*, 1998, Delgado *et al.*, 2006). In der Literatur wird vorgeschlagen, dass das *S. Typhi* spezifische Protein TviA als Hilfsprotein mit Antwortregulator RcsB interagiert (Abb. 2) (Majdalani & Gottesman, 2005, Virlogeux *et al.*, 1996). Im Folgenden sollte die Einbindung von TviA in das regulatorische Netzwerk durch Genexpressionsprofil-Studien und Analyse von definierten Mutationen untersucht werden (Winter *et al.*, 2009b).

3.1.1. Identifikation von Genen, deren Transkription durch RcsB und TviA reguliert wird

Um zu bestimmen, inwiefern die Zielgene von RcsB und TviA in *S. Typhi* überlappen, wurde das Genexpressionsprofil verschiedener, definierter Mutanten durch Microarrays ermittelt. *S. Typhi*-Stämme, die entweder kein funktionelles *tviA*- (STY2) oder *rcsB*- (SW237) Gen besaßen, wurden mit Stämmen, die das jeweilige Wildtyp-Allel (SW74 bzw. Ty2) exprimierten, verglichen. Um sekundäre Effekt der Kapselproduktion auf die Genregulation auszuschließen, wurde ein Vi-negativer Stamm, der jedoch *tviA* exprimiert (SW74), mit einer Δ *viaB*-Mutante (STY2) verglichen. Als Wachstumsbedingungen wurde ein Medium mit relativ niedriger Osmolarität (SOB-Flüssigmedium) gewählt, da das Vi-Antigen und somit *tviA* unter diesen Bedingungen optimal exprimiert wird (Pickard *et al.*, 1994, Raffatellu *et al.*, 2005a). Die Genexpressionsprofile wurden durch Cluster-Analyse verglichen (Abb. 3).

RcsB ist ein Aktivator der Transkription von *tviA* (Abb. 3 Gruppe 6; Abb. 4A) und die Transkription von *rcsB* ist unter diesen Bedingungen unabhängig von TviA (Abb. 4B). Deshalb war anzunehmen, dass TviA nur einen Teil der von RcsB regulierten Gene beeinflusst. Der Vergleich der beiden Profile zeigte, dass sowohl RcsB als auch TviA die Transkription ähnlicher regulatorischer Einheiten kontrollieren. Sowohl RcsB als auch TviA reprimierten die Transkription von Genen, die strukturelle Proteine des T3SS-1 kodieren. Des Weiteren wurden Gene reprimiert, die zur Chemotaxis, Regulation und Biosynthese von Flagellen benötigt

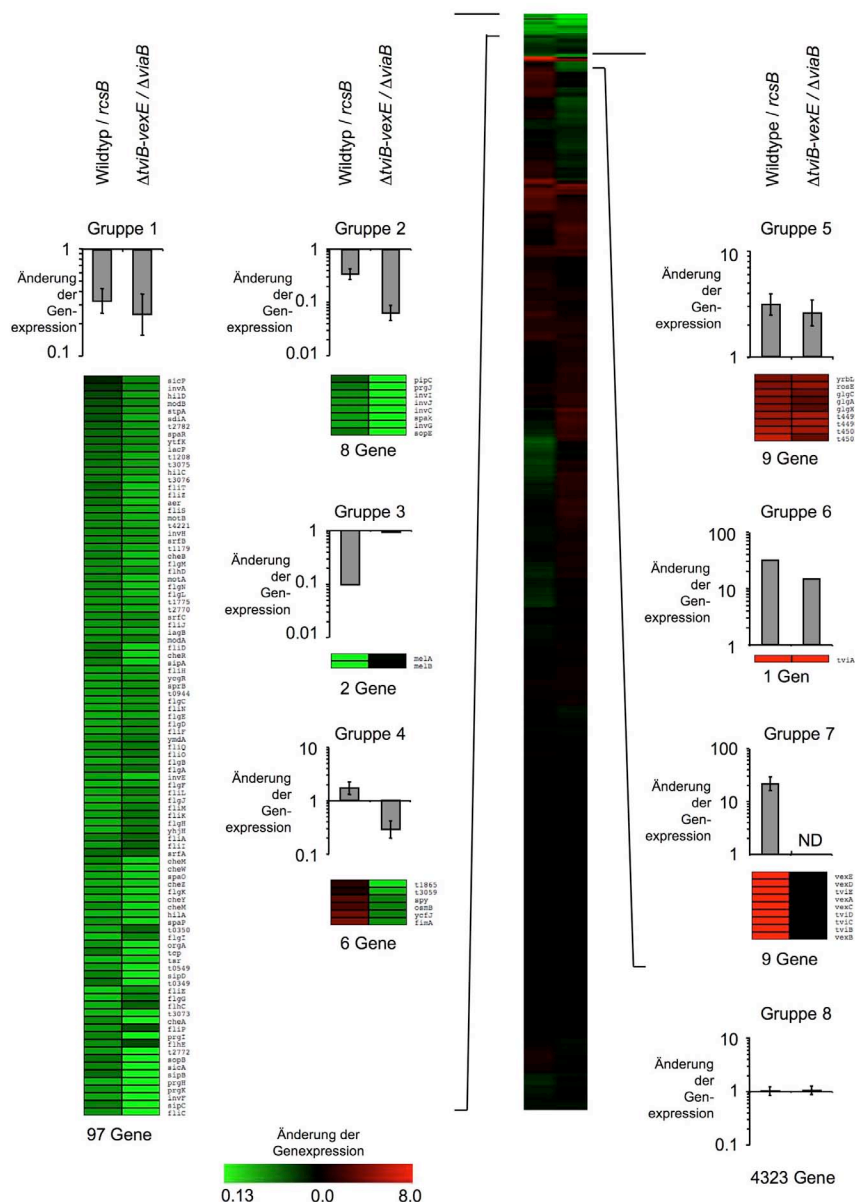


Abb. 3: Analyse der Expression von Genen, die in *S. Typhi* durch *RcsB* und *TviA* reguliert werden. Ein Profil der Genexpression wurde von dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der *rcsB*-Mutante (SW237), der Δ *tviA*-Mutante (STY2) und der Δ *tviB*-*vexE*-Mutante (SW74) erstellt. Die Stämme wurden in Flüssigmedium mit niedriger Osmolarität (SOB) kultiviert. Gene mit ähnlichem Expressionsverhalten wurden durch den CAST-Algorithmus identifiziert. Säulen über den Farbdigrammen zeigen das geometrische Mittel \pm Standardabweichung. Die Anzahl der Gene in jeder Gruppe ist unter jedem Farbdigramm angegeben. ND: nicht detektiert

werden (Abb. 3, Gruppe 1 und 2). Gene, deren Produkte in den Kohlenhydrat- und Aminosäuremetabolismus (*glgA*, *glgC* und *glgX* bzw. *rosE*, t4498-4501) involviert sind, wurden von *RcsB* und *TviA* aktiviert (Abb. 3, Gruppe 5). Zusätzlich wurde die Expression des *viaB*-Operons durch *RcsB* kontrolliert (Abb. 3, Gruppe 6 und 7). Wie zu erwarten, wurden in der Δ *tviB*-*vexE*-Mutante (SW74) und der Δ *tviA*-Mutante

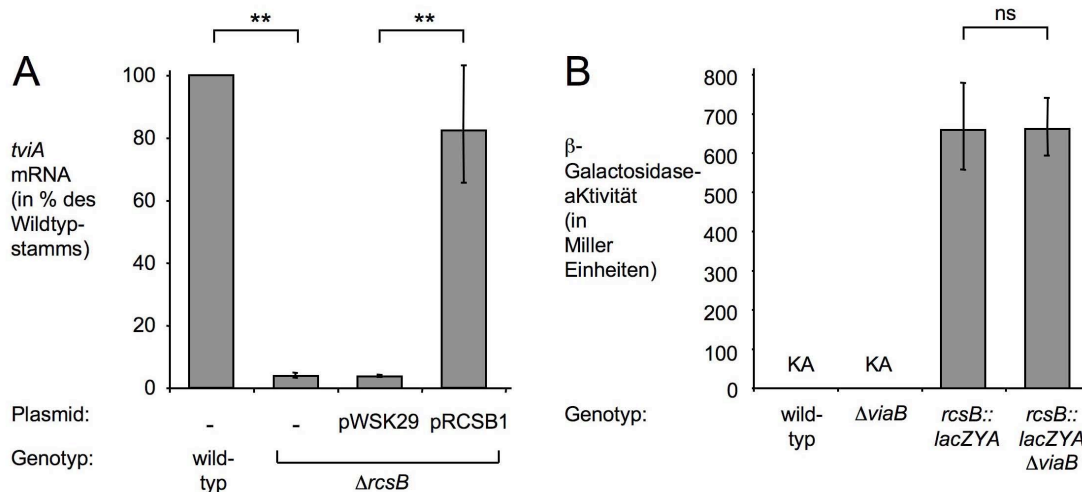


Abb. 4: Einfluss von RcsB bzw. TviA auf die Transkription von *tviA* bzw. *rcsB*. (A) Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2) und die *rcsB*-Mutante (SW513) wurden in Flüssigmedium mit niedriger Osmolarität (Trypton/Hefeextrakt) kultiviert. RNA wurde isoliert und die Expression von *tviA* durch qRT-PCR bestimmt. (B) Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die Δ *viaB*-Mutante, die *rcsB::lacZYA*-Mutante (SW237) und die Δ *viaB* *rcsB::lacZYA*-Mutante (SW239) wurden in Flüssigmedium (SOB) mit niedriger Osmolarität kultiviert und die β -Galactosidaseaktivität gemessen. Die dargestellten Werte sind das geometrische Mittel dreier unabhängiger Experimente \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Asterisk gekennzeichnet: ** $P < 0.01$; ns: nicht statistisch signifikant. KA: keine Aktivität nachweisbar.

(STY2) keine mRNA der Gene *tviBCDE* *vexABCDE* nachgewiesen (Abb. 3, Gruppe 7). In den folgenden Experimenten wurde der Effekt von TviA und RcsB auf die wichtigsten Regulationsnetzwerke, d.h. Regulation von Flagellen und T3SS-1, untersucht.

3.1.2. Regulation des Flagella-Regulons durch TviA

Die Biosynthese von Flagellen wird durch eine hierarchisch gegliederte Signalkaskade kontrolliert (Abb. 5). (Chilcott & Hughes, 2000, Macnab, 2004). An der Spitze der Kaskade steht die Expression von sog. „frühen“ Genen, d.h. *flhDC*, die durch verschiedene sensorische Systeme geregelt wird. Die Produkte der Gene *flhDC*, FlhDC, werden als „*master regulator*“ bezeichnet, da sie als Transkriptionsaktivatoren die Expression von „mittleren“ Genen erlauben, die u.a. für den alternativen Sigmafaktor FliA, den entsprechenden Anti-Sigmafaktor FlgM, den Regulator FliZ, und Strukturproteine des Basalkörpers kodieren. Sekretion von FlgM durch den fertig gestellten Basalkörper erlaubt der nun ungebundenen Form von FliA die Bindung an Promotoren der Klasse III, die Rekrutierung der RNA-Polymerase

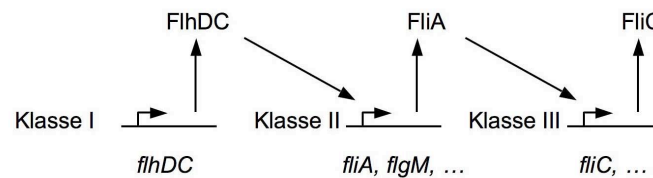


Abb. 5: Hierarchischer Aufbau des Flagella-Regulons. An der Spitze der Hierarchie stehen die frühen Gene *flhDC*, deren Transkription durch den Klasse I-Promotor bestimmt wird. Das Produkt FlhDC aktiviert die Transkription von mittleren Genen (z.B. *fliA*, *flgM* oder *fliZ*) durch Klasse II-Promotoren. Der Anti-Sigmafaktor FlgM wird durch den fertig gestellten Basalkörper und Haken sekretiert. Der so verfügbar gewordene, alternative Sigmafaktor FliA rekrutiert die RNA Polymerase zu Klasse III-Promotoren und aktiviert so die Transkription von späten Genen (z.B. *fliC*). und die Expression von „späten“ Genen, wie dem Strukturprotein des Filaments, das Flagellin FliC.

Um die Ergebnisse der Microarray-Experimente zu bestätigen, wurde die relative Expression bestimmter Gene durch „*real time*“-qRT-PCR bestimmt. Der *S. Typhi*-Wildtyp Ty2, die Δ *viaB*-Mutante (STY2), die Δ *tviB-vexE*-Mutante (SW74) und die Δ *rcsB*-Mutante (SW513) wurden in SOB-Flüssigmedium kultiviert. Unter diesen Bedingungen reprimierten sowohl RcsB als auch TviA die Transkription von *flhC* (Abb. 6A und 7A). Eine signifikant geringere Konzentration an *fliZ*- und *fliC*- mRNA wurde im *S. Typhi*-Wildtyp und der Δ *tviB-vexE*-Mutante im Vergleich zur Δ *viaB*-Mutante, die kein TviA-Protein exprimiert, gemessen (Abb. 7B und C). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung führte die Expression von TviA zu einer Repression des Flagellins FliC (Abb. 7D). In *flhDC*-Mutanten wurde die durch TviA vermittelte Repression von *fliZ* und *fliC* nicht mehr beobachtet. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass sowohl RcsB als auch TviA den Flagella-Regulon durch Regulation des „*master regulators*“ *flhDC* kontrollierten.

3.1.3. TviA kontrolliert die Expression T3SS-1 durch reprimierte Expression der Regulatoren *flhDC* und *fliZ*

Im Zentrum der Regulation von Genen des T3SS-1 steht der Aktivator HilA. HilA aktiviert die Transkription von Regulator- und Strukturgenen (Bajaj *et al.*, 1995). Sowohl RcsB als TviA reprimierten die Transkription von *hilA* (Abb. 6A und 8A). Expression von *hilE*, ein Repressor von *hilA* (Baxter *et al.*, 2003, Boddicker *et al.*, 2003), hingegen wurde nicht durch TviA beeinträchtigt (Abb. 8C). Frühere Studien haben gezeigt, dass RcsB den *flhDC*-Promoter im Bereich des Transkriptionsstarts bindet und so die Expression reprimiert (Francez-Charlot *et al.*, 2003). Im *hilA*-

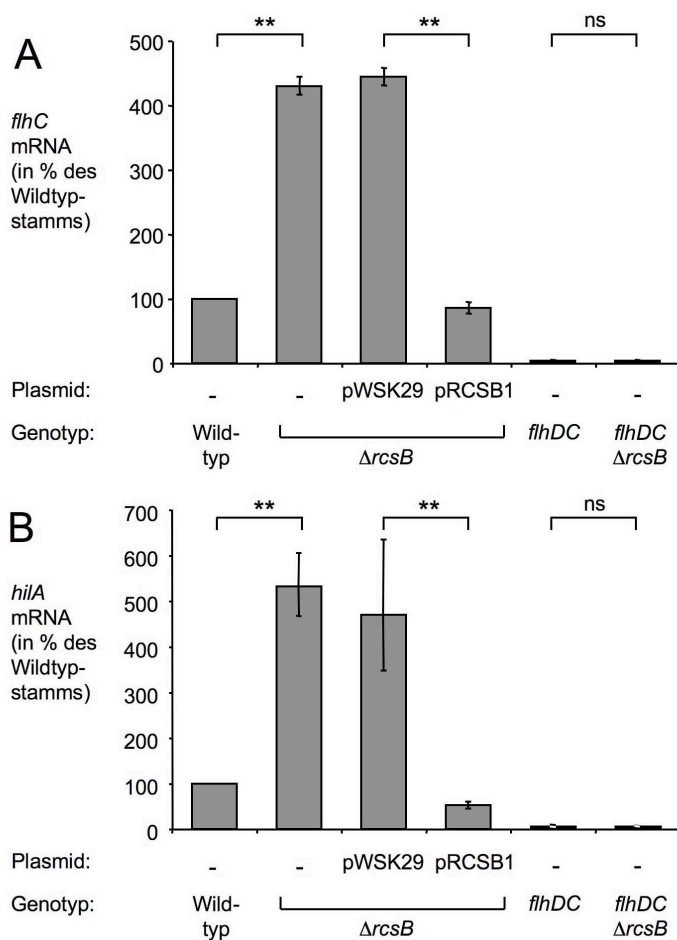


Abb. 6: Einfluss von RcsB auf die Transkription von *flhC* (A) und *hilA* (B). Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die $\Delta rcsB$ -Mutante (SW513), die *flhDC*-Mutante (SW491) und die *flhC* $\Delta rcsB$ -Mutante (SW612) wurden in Flüssigmedium (Trypton/Hefeextrakt) mit niedriger Osmolarität kultiviert und die Transkription von *flhC* und *hilA* durch qRT-PCR bestimmt. Die dargestellten Graphen sind die geometrischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Asterisk gekennzeichnet: * $P < 0.05$ bzw. ** $P < 0.01$; ns: nicht statistisch signifikant.

Promotorbereich wurde keine RcsB-Konsensussequenz gefunden. Dies bedeutet, dass die Regulation von *hilA* durch das RcsCDB-Phosphorelay-System und TviA wahrscheinlich indirekt erfolgt.

Der Regulator *fliZ*, ein Aktivator innerhalb des Flagella-Regulons, kann die Transkription von *hilD* aktivieren (Lucas *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 2008, Kage *et al.*, 2008). HilD, zusammen mit HilC, aktiviert die Expression von *hilA* auf Basis der Transkription (Ellermeier *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob TviA die Expression von Invasionsgenen durch *flhDC* und *fliZ* reguliert, wurde die relative Konzentration an *hilA* und *invG* (ein Strukturprotein des T3SS-1) in *flhDC*- und *fliZ*-Mutanten bestimmt (Abb. 7A und B). Wie erwartet führte die Mutation der Aktivatoren *flhDC* und *fliZ* zu einer geringeren Expression von *hilA* und *invG*. Mutation von *tviA* im Wildtyp-Hintergrund führte zu einer erhöhten Konzentration von *hilA* und *invG*. Diese Derepression durch Mutation des *tviA*-Gens wurde jedoch nicht in den *flhDC*- oder *fliZ*-Mutanten beobachtet. Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass TviA die Expression des T3SS-1 durch die Regulatoren *flhDC* und *fliZ* kontrollierte.

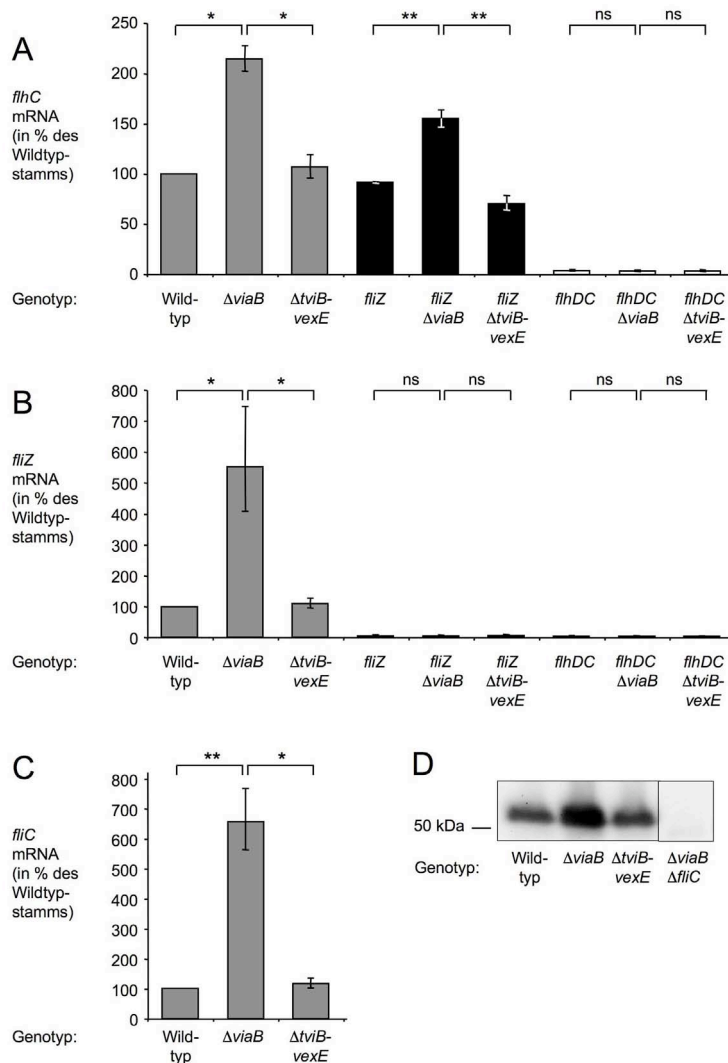


Abb. 7: Einfluss von TviA auf die Transkription von Genen des Flagella-Regulons. Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die $\Delta viaB$ -Mutante (SWSTY2), die $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74), die *fliZ*-Mutante (SW531), die *fliZ* $\Delta viaB$ -Mutante (SW532), die *fliZ* $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW533), die *flhDC*-Mutante (SW491), die *flhDC* $\Delta viaB$ -Mutante (SW492) und die *flhDC* $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW477) wurden in Flüssigmedium mit niedriger Osmolarität (Trypton/Hefeextrakt) kultiviert und die Transkription von *flhC* (A), *fliZ* (B) und *fliC* (C) durch qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist das geometrische Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern gekennzeichnet: * $P < 0.05$ bzw. ** $P < 0.01$; ns: nicht statistisch signifikant. (D) Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die $\Delta viaB$ -Mutante (SWSTY2), die $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74) und die $\Delta viaB \Delta fliC$ -Mutante (SW483) wurden in Flüssigmedium mit niedriger Osmolarität (SOB) kultiviert und die Expression von FliC durch Western-Blot mit *Salmonella*-H-Antiserum nachgewiesen.

Ebenso wurden zur Repression des T3SS-1 durch RcsB die Gene *flhDC* benötigt (Abb. 6B).

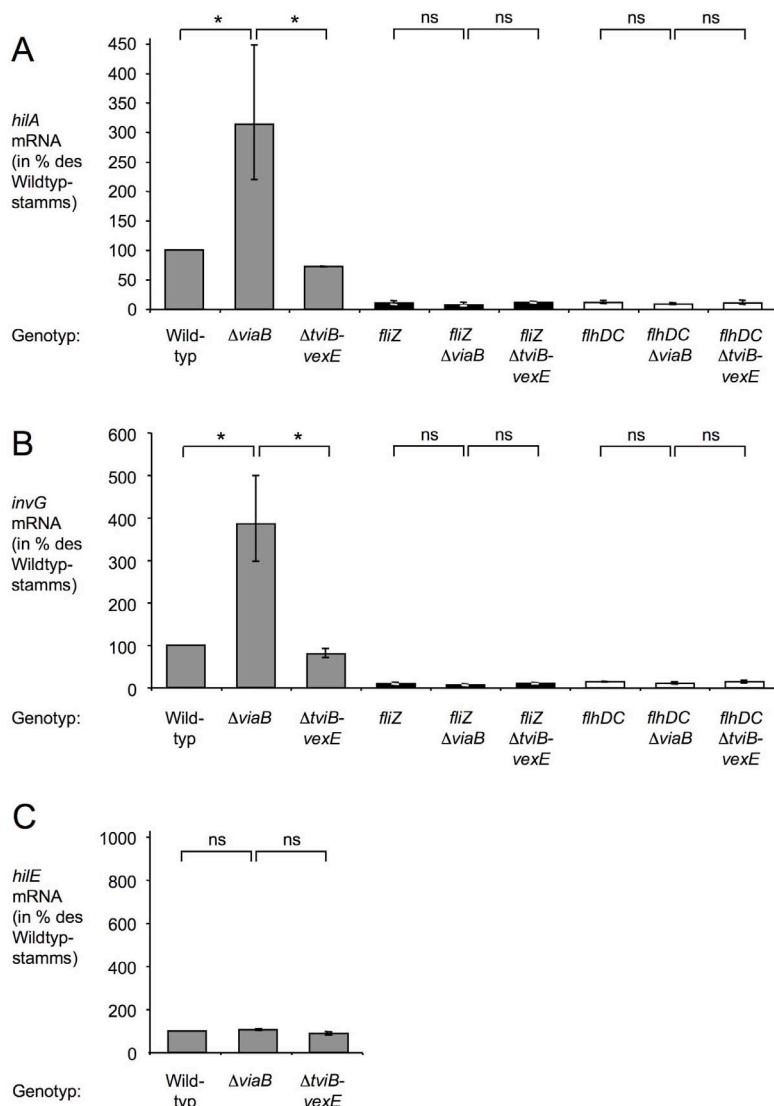


Abb. 8: Einfluss von TviA auf die Transkription von Genen des T3SS-1. Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die $\Delta viaB$ -Mutante (SWSTY2), die $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74), die *fljZ*-Mutante (SW531), die *fljZ* $\Delta viaB$ -Mutante (SW532), die *fljZ* $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW533), die *flhDC*-Mutante (SW491), die *flhDC* $\Delta viaB$ -Mutante (SW492) und die *flhDC* $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW477) wurden in Flüssigmedium mit niedriger Osmolarität (Trypton/Hefeextrakt) kultiviert und die Transkription von *hilA* (A), *invG* (B) und *hilE* (C) durch qRT-PCR bestimmt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern gekennzeichnet: * $P < 0.05$ bzw. ** $P < 0.01$; ns: nicht statistisch signifikant.

3.1.4. TviA reduziert die Invasivität gegenüber menschlichen Epithelzellen unabhängig von der Expression des Vi-Antigens

Sowohl das T3SS-1 als auch Flagellen (Beweglichkeit) sind wichtige bakterielle Faktoren, die zur Invasion von nicht-phagozytären Zellen wie Darmepithelzellen (Enterozyten) durch *Salmonella* beitragen (Galan & Curtiss, 1989, Jones et al., 1981). Als Modell zur Untersuchung der Invasivität wurde für die hier vorliegende Studie T84-Zellen, eine menschliche Adenokarzinom-Zelllinie, in Gentamicin-Schutzexperimenten mit *S. Typhi* infiziert. In Übereinstimmung mit oben genannten Studien führte die Mutation von *invA* (SW222), das für ein Strukturprotein des T3SS-1 kodiert, zu einer deutlich reduzierten Invasivität (Abb. 9C; $P < 0.01$; 6-fach). Ebenso wurde die Invasivität im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert, wenn das einzige Flagellin deletiert (Δ *fliC*-Mutante; SW359) und der Stamm somit unbeweglich gemacht wurde (Abb. 9A, B und C; $P < 0.01$; 340-fach).

S. Typhi-Stämme, die entweder kein *viaB*-Operon besitzen oder exprimieren, sind wesentlich invasiver als Stämme, die das Vi-Antigen produzieren (Miyake *et al.*, 1998, Arricau et al., 1998, Zhao *et al.*, 2001). Expression von Polysacchariden auf der Zelloberfläche kann die Funktion des T3SS von *Shigella* hemmen (West *et al.*, 2005). Auf Grund dieser Beobachtung wird in der Literatur vorgeschlagen, dass das Vi-Antigen die Invasivität von *S. Typhi* in ähnlicher Weise einschränkt (Bishop *et al.*, 2008). TviA kontrolliert sowohl Beweglichkeit (Abb. 9A und B) als auch die Transkription von Genen des T3SS-1 (Abb. 8A und B). Deshalb sollte untersucht werden, ob TviA oder das Vi-Antigen die Invasivität von *S. Typhi* entscheidend beeinflussen können. Dazu wurde *S. Typhi* in Medium mit geringer Osmolarität (Trypton/Hefeextrakt) bis zum Ende des logarithmischen Wachstums kultiviert und T84-Zellen in einem Gentamicin-Schutzexperiment infiziert. Mutation der Biosynthesegene des Vi-Antigens (Δ *tviB-vexE*-Mutante) hatte nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten Einfluss auf das Eindringen von *S. Typhi* in Epithelzellen (Abb. 9D; 1,9-fach im Vergleich zum Wildtyp Ty2). Wenn zusätzlich zu den Biosynthesegenen das *tviA*-Gen entfernt wurde (Δ *viaB*-Mutante; SW347), wurde eine wesentlich stärkere Invasion beobachtet (5,3-fach im Vergleich zur Δ *tviB-vexE*-Mutante; $P > 0.01$). Dieses Ergebnis zeigte, dass unter diesen Bedingungen TviA, und nicht das Vi-Antigen, die Invasion signifikant reduzierte.

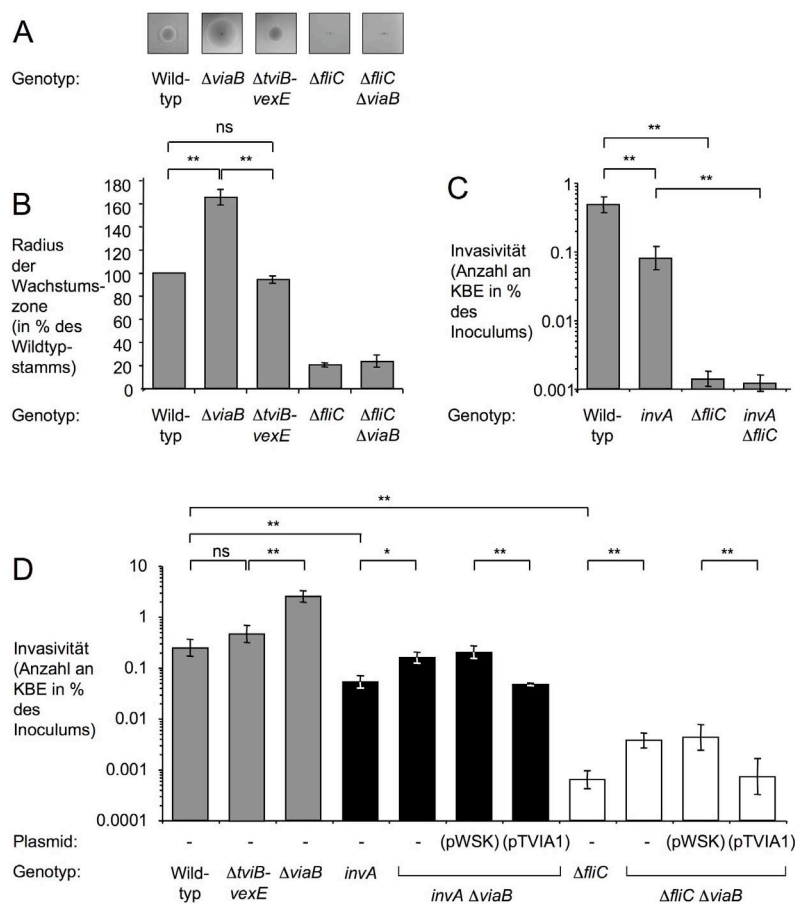


Abb. 9: Einfluss von TviA auf Invasion von T84-Epithelzellen. (A) *tviA* reprimiert die Beweglichkeit von *S. Typhi*. Platten mit 0,3 % Agargehalt wurden mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (SWSTY2), der $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74), der $\Delta fliC$ -Mutante (SW359) und der $\Delta viaB \Delta fliC$ -Mutante (SW483) angeimpft. (B) Quantitative Messung der Beweglichkeit durch Berechnung des Wachstumsbereichs. (C) Einfluss des T3SS-1 und Beweglichkeit auf die Invasion. T84-Zellen wurden in einem Gentamycin-Schutzexperiment mit *S. Typhi* Wildtyp (Ty2), der *invA*-Mutante (SW222), der $\Delta fliC$ -Mutante (SW359) und der $\Delta fliC \Delta invA$ -Mutante (SW550), die in Medium mit niedriger Osmolarität (Trypton/Hefeextrakt) kultiviert wurden, infiziert. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde durch Plattieren auf Agarplatten bestimmt. (D) Einfluss von *tviA* auf die Invasion. T84 Zellen wurden wie beschrieben mit dem Typhi Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2), der $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74), der *invA*-Mutante (SW222), der $\Delta viaB invA$ -Mutante (SW224), der $\Delta fliC$ -Mutante (SW359) und der $\Delta fliC \Delta viaB$ -Mutante (SW483) infiziert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien bestimmt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern gekennzeichnet: * $P < 0.05$ bzw. ** $P < 0.01$; ns: nicht statistisch signifikant. pWSK: pWSK29

Als nächstes wurde untersucht, ob die Repression von Genen des Flagellen-Regulons und/oder des T3SS-1 zur TviA-abhängigen Senkung des Invasionsvermögens verantwortlich sind. Dazu wurden Gentamicin-Schutzexperimente mit unbeweglichen Mutanten ($\Delta fliC$; SW359) oder mit Mutanten, die kein intaktes T3SS-1 mehr besitzen (*invA*, SW222), durchgeführt (Abb. 9D).

Wenn in der beweglichen, T3SS-1 defizienten *invA*-Mutante zusätzlich der *viaB*-Operon (und somit *tviA*) deletiert wurde (Δ *viaB invA*-Mutante; STY4), wurde eine gesteigerte Invasivität beobachtet (Abb. 9D, schwarze Säulen). Expression von *tviA* durch ein „low-copy number“-Plasmid (pTVIA1) in diesem Stamm reduzierte die Invasion hingegen wieder auf ein Niveau vergleichbar mit der *invA*-Mutante. Ebenso führte die Mutation des *viaB*-Operons in der unbeweglichen, jedoch T3SS-1-exprimierenden Δ *fliC*-Mutante zu einer signifikant Steigerung des Eindringungsvermögens (Abb. 9D, weiße Säulen). Dieser Phänotyp konnte ebenfalls durch das *tviA*-Gen (kodiert durch pTVIA1) komplementiert werden. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass TviA das Invasionsvermögen überwiegend durch Repression des Flagella-Regulons und des T3SS-1 kontrollierte.

3.1.5. Einfluss von TviA und RcsB auf die Osmoregulation von *flhC* in *S. Typhi*

Die osmolaritätsabhängige Expression von Flagellen und des T3SS-1 ist in *S. Typhi* wesentlich ausgeprägter als in *S. Typhimurium* (Arricau *et al.*, 1998). In einer vorhergehenden Studie wurde gezeigt, dass das RcsCDB-Phosphorelay-System in die Osmoregulation des T3SS-1 und die Sekretion von Flagellin involviert ist (Arricau *et al.*, 1998). Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Osmoregulation dieser Virulenzfaktoren im Wesentlichen durch das RcsCDB-System vermittelt wird (Arricau *et al.*, 1998), obwohl die Aminosäuresequenzen von RcsB, RcsC und RcsD der beiden Serotypen zu mehr als 99 % identisch sind (McClelland *et al.*, 2001, Deng *et al.*, 2003). Die Expression von *tviA* hingegen wird durch das Osmo-sensitive Zwei-Komponenten-System EnvZ/OmpR reguliert (Pickard *et al.*, 1994). TviA ist damit als reprimierendes Hilfsprotein nur bei geringer Osmolarität verfügbar.

Im Folgenden sollte die Hypothese getestet werden, dass TviA (kontrolliert durch EnvZ/OmpR), und nicht das RcsCDB-System die Expression des zentralen Regulators *flhDC* in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Mediums kontrolliert. Dazu wurde die Transkription von *flhC* durch Fusion mit dem Reporter β -Galactosidase (kodiert durch *lacZ*) gemessen (Abb. 10A). Um die Osmolarität des Trypton/Hefeextrakt-Flüssigmediums zu erhöhen, wurde NaCl zugegeben. Ein Anstieg der Osmolarität korrelierte direkt mit der Transkription von *flhC* in dem *S. Typhi*-Wildtyp (Abb. 10A, schwarze Säulen). Wie erwartet führte die Deletion des *viaB*-Operons führte zu einer generellen Derepression der *flhC* Transkription. Diese Derepression war jedoch wesentlich stärker ausgeprägt in Medium mit geringer Salzkonzentration. Um diese Beobachtung klarer darzustellen, wurde die Repression

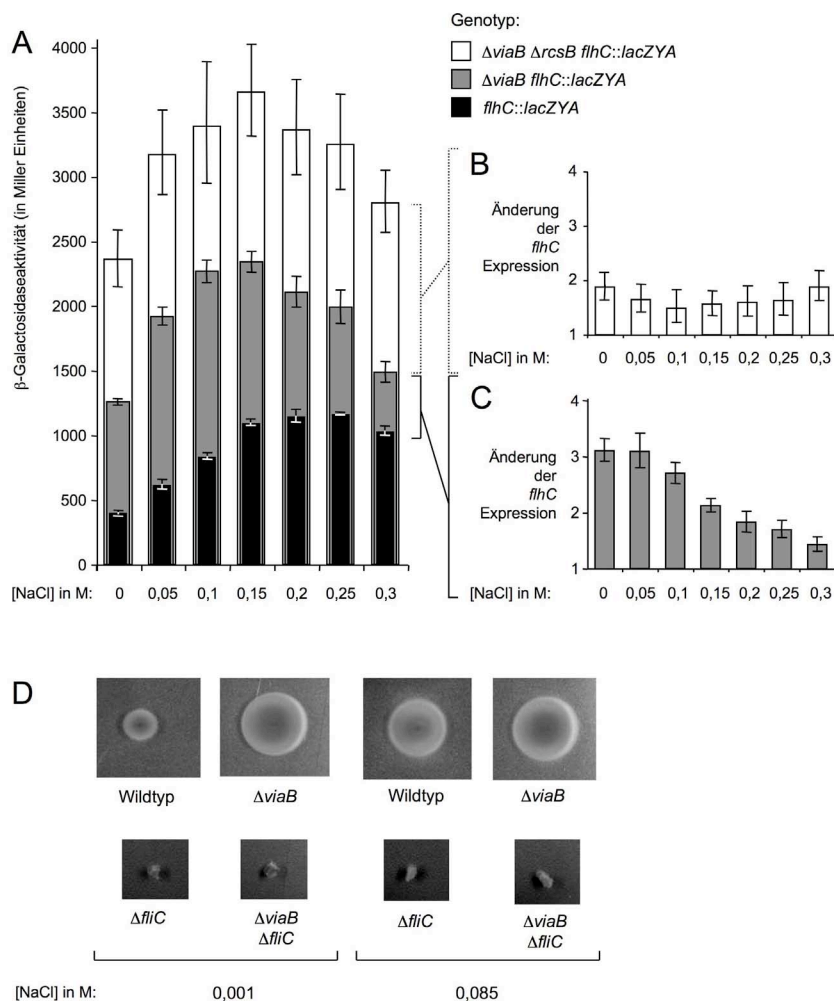


Abb. 10: Einfluss von TviA und RcsB auf die Osmoregulation von *flhC* und auf die Beweglichkeit. (A) Die *flhC::lacZYA*-Mutante (SW197, schwarze Säulen), die $\Delta viaB flhC::lacZYA$ -Mutante (SW186, graue Säulen) und die $\Delta viaB \Delta rcsB flhC::lacZYA$ -Mutante (SW452, weiße Säulen) wurden in Medium mit niedriger Osmolarität kultiviert (Trypton/Hefeextrakt) und die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die Repression, die durch RcsB (B) und TviA (C) ausgeübt wird, wurde durch Dividieren der β -Galaktosidase-Aktivität der $\Delta viaB flhC::lacZYA$ -Mutante bzw. der $\Delta viaB \Delta rcsB flhC::lacZYA$ -Mutante durch den dazugehörigen Wert der *flhC::lacZYA*-Mutante bzw. der $\Delta viaB flhC::lacZYA$ -Mutante berechnet. (D) Agarplatten mit 0,3 % Agar und der angegebenen Konzentration an NaCl wurden mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (SW347), der $\Delta fliC$ -Mutante (SW359) und der $\Delta viaB \Delta fliC$ -Mutante (SW483) angeimpft. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler.

als Verhältnis der β -Galaktosidaseaktivität der $\Delta viaB flhC::lacZYA$ -Mutante gegenüber der *flhC::lacZYA*-Mutante berechnet (Abb. 10C). Ebenso ist *tviA* notwendig zur Osmoregulation der Beweglichkeit von *S. Typhi* (Abb. 10D). Diese Ergebnisse zeigten, dass TviA die Beweglichkeit und die Transkription von *flhC* in Abhängigkeit von der Osmolarität reprimierte.

Um den Beitrag von RcsB ohne den Einfluss von TviA zu betrachten, wurde die β -Galaktosidaseaktivität einer $\Delta viaB \Delta rcsB flhC::lacZYA$ -Mutante gemessen

(Abb. 10A, weiße Säulen) und wie beschrieben mit der Aktivität der $\Delta viaB$ *flhC::lacZYA*-Mutante verglichen (Abb. 10B). Ohne *tviA* wurde die Transkription von *flhC* durch RcsB um einen Faktor 2 reprimiert. Diese Repression jedoch war unabhängig von der Osmolarität des Mediums. Zusammengenommen kann deshalb gefolgert werden, dass das TviA als Hilfsprotein des RcsCDB-Phosphorelay-Systems die Expression des Flagella-Regulons in Abhängigkeit von der Osmolarität reprimierte. RcsB war als integraler Bestandteil des RcsCDB-Phosphorelay-Systems und als Aktivator der Transkription von *tviA* für diese Funktion notwendig, jedoch alleine nicht hinreichend.

3.1.6. Beitrag von TviA zur Osmoregulation der Invasion von Epithelzellen

Die Invasivität von *S. Typhi* gegenüber Epithelzellen ist wesentlich gesteigert, wenn die Bakterien in Medium mit hoher Osmolarität kultiviert werden (Tartera & Metcalf, 1993, Mills & Finlay, 1994). Um die Hypothese zu testen, dass TviA zur Osmoregulation der Invasion beiträgt, wurde der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2) und die $\Delta viaB$ -Mutante (SW347) in Medium unterschiedlicher Salzkonzentration kultiviert und die Invasivität in Gentamicin-Schutzexperimenten mit T84-Epithelzellen untersucht

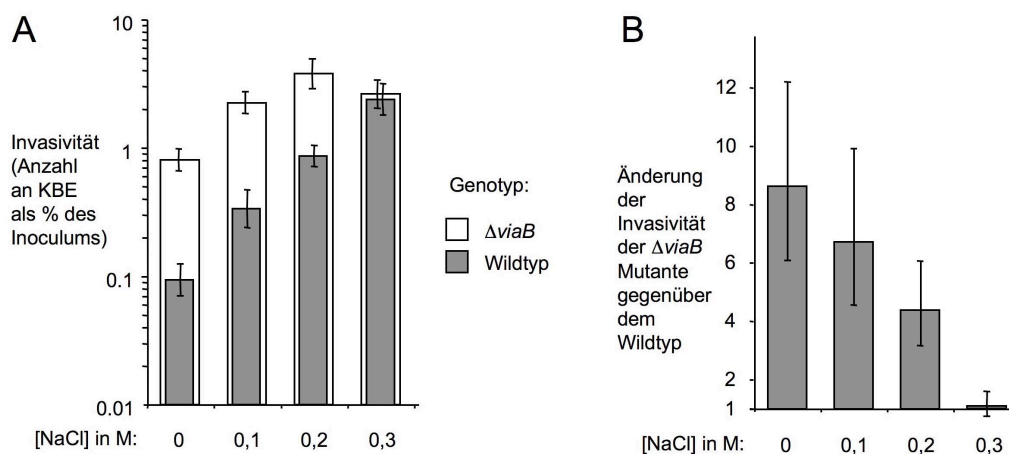


Abb. 11: Auswirkung von *tviA* auf Osmoregulation der Invasivität. (A) Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2) und die $\Delta viaB$ -Mutante (SW347) wurden in Trypton/Hefeextrakt-Flüssigmedium kultiviert und T84-Epithelzellen infiziert. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde durch Gentamicin-Schutzexperimente bestimmt. (B) Die Repression, die durch TviA ausgeübt wird, wurde durch dividieren der Invasivität der $\Delta viaB$ -Mutante durch den dazugehörigen Wert des Wildtyps berechnet. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler.

(Abb. 11A). Die Repression der Invasivität wurde wie oben beschrieben berechnet (Abb. 11B). Die Invasivität des Wildtyps korrelierte direkt mit der Salzkonzentration des Vorkulturmediums: relative hohe Invasivität bei erhöhter Osmolarität, geringe Invasion nach Wachstum in Medium mit geringer NaCl-Konzentration. Bei erhöhter Osmolarität (0.3 M NaCl) des Mediums war die Invasivität der $\Delta viaB$ -Mutante und des Wildtyps vergleichbar (2,4 % bzw. 2.6 %, $P = 0,85$, Repression: 1,1-fach). Bei geringer Osmolarität hingegen war die $\Delta viaB$ -Mutante wesentlich invasiver als der Wildtyp (0,8 % bzw. 0,09 %, $P < 0,05$, Repression: 8,6-fach). Zusammenfassend unterstützten diese Experimente die Hypothese, dass die Eingliederung des Hilfsproteins TviA in das RcsCDB-Phosphorelay-System von *S. Typhi* die Osmoregulation des Rcs Regulons ermöglicht. Dieses Signal erlaubt die koordinierte Expression wichtiger Virulenzfaktoren (Flagellen, Vi-Antigen und T3SS-1) abhängig von den Umgebungsbedingungen.

3.2. Einfluss des *viaB*-Operons auf die durch TLR5-vermittelte CXC-Chemokin Produktion menschlicher Darm-Epithelzellen

Aktivierung von polarisierten Epithelzellen wie z. B. T84-Zellen mit *S. Typhimurium* führt zur Sekretion von IL-8 (Zeng *et al.*, 2003). Diese Stimulation hängt überwiegend von der Fähigkeit der Bakterien ab, Flagellin zu sekretieren. Flagellin aktiviert durch TLR5 und durch das Adaptorprotein MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) den MAP-Kinase-Signalweg (Yu *et al.*, 2003, Gewirtz *et al.*, 2001a). Der MAP-Kinase-Signalweg ist hierarchisch gegliederte Abfolge von aktivierenden Phosphorylierungen von MAPKKK-, MAPKK- und MAP-Kinasen. MAP-Kinasen sind befähigt, Transkriptionsfaktoren wie AP-1 durch Phosphorylierung zu aktivieren. Des Weiteren führt die Stimulation von TLRs zu einer Phosphorylierung des Inhibitors von NF κ B, I κ B, der durch Ubiquitinierung dem Proteasom zugeführt wird. Dies ermöglicht die Translokation des (freien) aktiven Transkriptionsfaktors NF κ B in den Nukleus (Takeda & Akira, 2007, Foster & Medzhitov, 2009).

Diese TLR-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs wird in mit *S. Typhi* infizierten Epithelzellen nicht beobachtet (Zeng *et al.*, 2003). Das *viaB*-Operon reduziert die Aktivierung von TLR4 und TLR5 durch *S. Typhi* entscheidend (Raffatellu *et al.*, 2005a) und klinische Isolate von *S. Typhi*, die kein Vi-Antigen exprimieren, induzieren die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK (*extracellular signal regulated kinase*) (Sharma & Qadri, 2004). Vi-exprimierende Stämme hingegen können dies vermeiden (Sharma & Qadri, 2004). Ein detaillierter

Mechanismus, wie der *viaB*-Operon in *S. Typhi* die Erkennung durch TLR verhindert, wurde jedoch noch nicht beschrieben. Auf der Basis der Literatur können mehrere Arbeitshypothesen formulieren:

Gereinigtes Vi-Antigen bindet spezifisch an Prohibitin, ein von vielen Zelltypen exprimiertes Oberflächenprotein (Sharma & Qadri, 2004). Prohibitin selbst wird zur Aktivierung von ERK durch die regulatorische GTPase Ras benötigt (Rajalingam *et al.*, 2005). Experimente mit ERK-spezifischen Inhibitoren haben gezeigt, dass die Aktivierung dieser MAP-Kinase durch LPS für die Sekretion von IL-8 durch Monozyten zwingend notwendig ist (Scherle *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Befunde kann die folgende Hypothese formuliert werden: Epithelzellen werden durch bakterielle TLR-Liganden aktiviert. Das Vi-Antigen jedoch bindet und inhibiert Prohibitin. Dadurch kann die MAP-Kinase ERK nicht aktiviert werden, und es kommt zu einer reduzierten Expression von IL-8.

Alternativ kann das Vi-Antigen als flächendeckende Struktur auf der Zelloberfläche die Freisetzung bzw. die Verfügbarkeit von TLR-Liganden einschränken. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass das Vi-Antigen die Agglutination von LPS und Typ-1 Fimbrien verhindert, unterstützt (Felix & Pitt, 1934b, Felix & Pitt, 1934a).

Als dritte Erklärungsmöglichkeit kommt eine veränderte Regulation von Virulenzfaktoren durch *TviA* in Frage. Diese Hypothese wird durch die in Kapitel 3.1. gemachten Beobachtungen unterstützt: *TviA* reprimierte die Expression des T3SS-1 und des TLR5-Liganden Flagellin. Beide Virulenzfaktoren können zur Aktivierung von Epithelzellen beitragen (Hobbie *et al.*, 1997, Hayashi *et al.*, 2001, Gewirtz *et al.*, 2001a).

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, durch welchen dieser drei vorgeschlagenen Mechanismen das *viaB*-Operon die Erkennung von *S. Typhi* durch menschliche Epithelzellen verhindert.

3.2.1. Einfluss des Regulators *tviA* auf die Sekretion von IL-8 durch menschliche Epithelzellen

Die Infektion von T84- und Caco-2-Epithelzellen mit einer Vi-negativen Δ *viaB*-Mutante führte zu einer wesentlich stärkeren Transkription und Sekretion von IL-8 als die Infektion mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Abb. 12) (Raffatellu *et al.*, 2005a). Um zu untersuchen, ob das *viaB*-Operon bzw. das Vi-Antigen die Phosphorylierung von ERK spezifisch inhibiert, wurden T84-Zellen mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2) und der Δ *viaB*-Mutante (STY2) infiziert, nach 15, 30 und 60 min lysiert und die Aktivierung

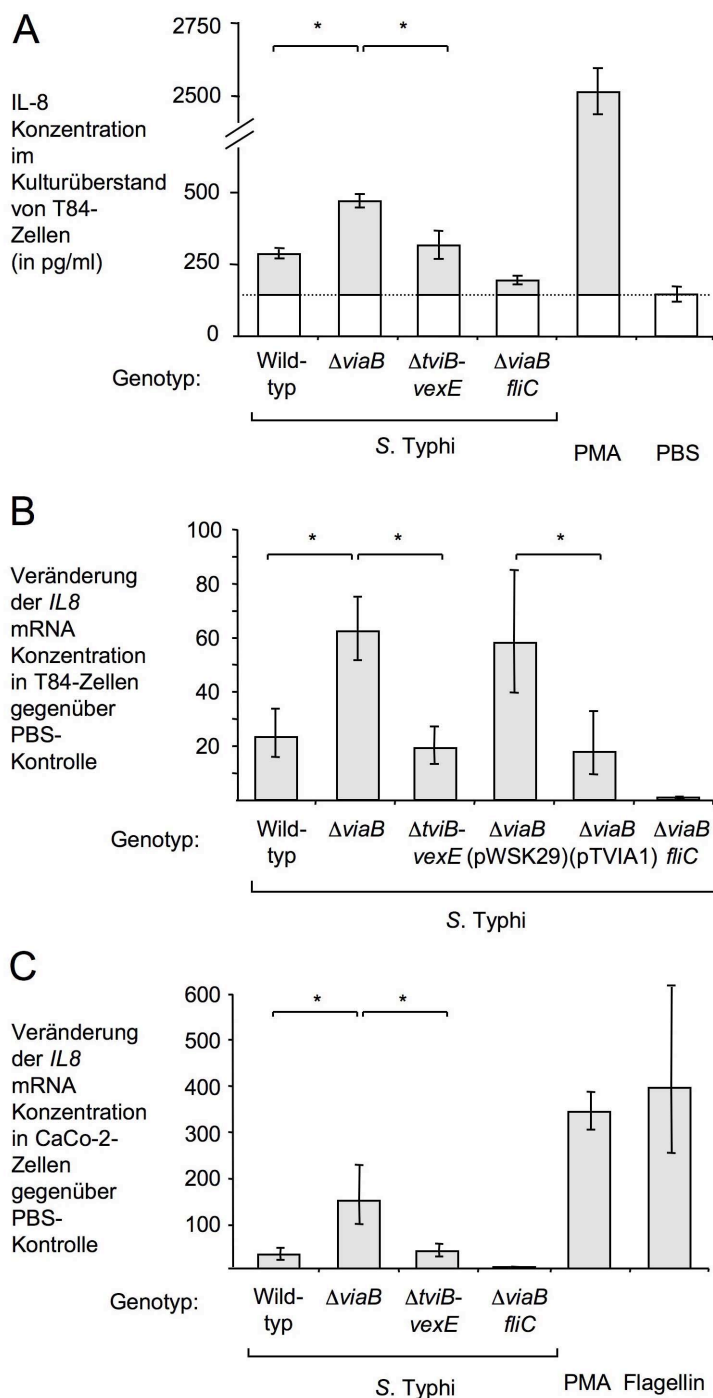


Abb. 12: Expression und Sekretion von IL-8 durch T84- und Caco-2-Epithelzellen als Folge der Infektion mit *S. Typhi*. Zellen wurden 1 h mit PMA, gereinigtem Flagellin (*S. Typhimurium*), PBS oder *S. Typhi* infiziert. Der *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), die $\Delta viaB$ -Mutante (STY2), die $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74) und die $\Delta viaB fliC$ -Mutante (STY3) wurden vor der Infektion in SOB kultiviert. (A) Die IL-8 Sekretion von T84-Epithelzellen wurde durch ELISA gemessen. (B und C) Die relative Expression von *IL8* mRNA in T84- bzw. Caco-2-Zellen wurde durch qRT-PCR bestimmt. Die Werte sind als Veränderung gegenüber der mit PBS behandelten Kontrolle berechnet worden. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

(Phosphorylierung) der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 durch Western-Blot mit phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb 13A). Als Kontrolle wurden Antikörper verwendet, die sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form erkennen. Zellen wurden mit dem Phorbol ester PMA stimuliert, um die maximale Reaktion (Phosphorylierung) abzuschätzen (Abb. 13B). Die Phosphorylierung von ERK, JNK und p38 durch *S. Typhi* wurde 60 min nach der Infektion mit der $\Delta viaB$ Mutante beobachtet (Abb 13A). In Übereinstimmung mit der Literatur (Sharma & Qadri, 2004) induzierte der Wildtyp keine Phosphorylierung von

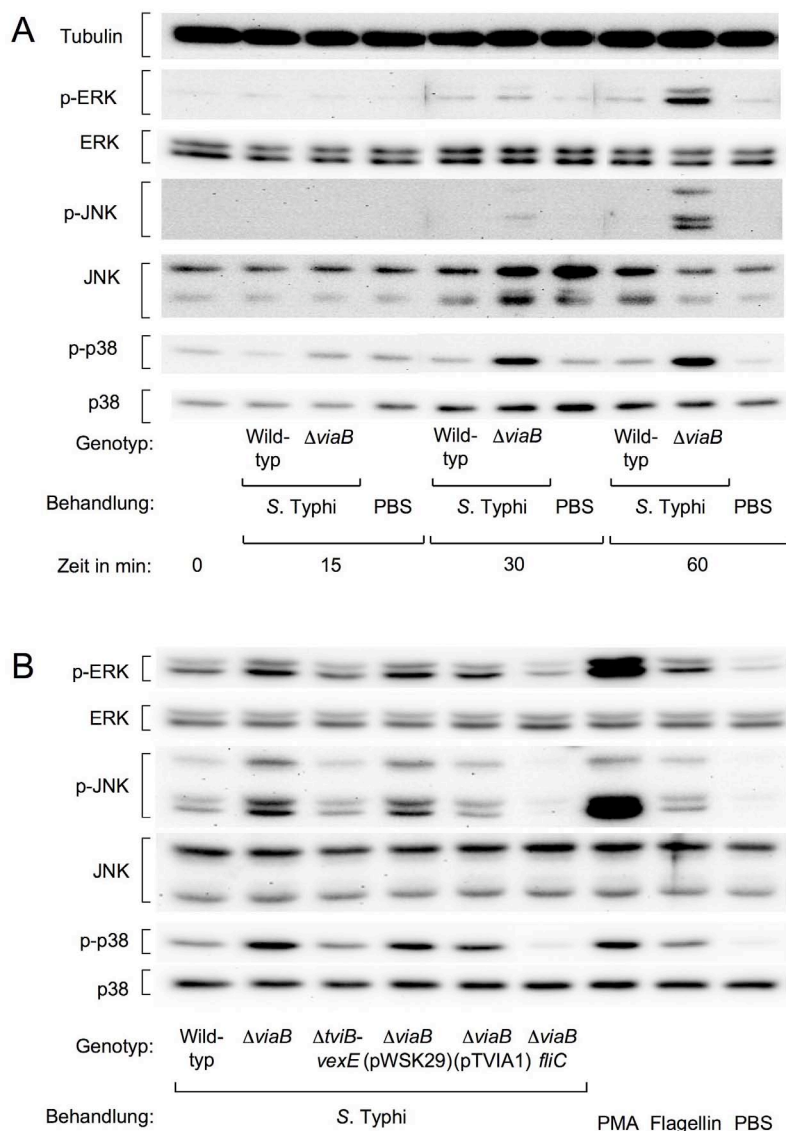


Abb. 13: Aktivierung der MAP-Kinasen in T84-Zellen, hervorgerufen durch die Infektion mit *S. Typhi*. Zelllysate wurden durch Western-Blot mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern gegen p-ERK, p-JNK und p-p38 bzw. Antikörpern, die sowohl das phosphorylierte als auch das unphosphorylierte Protein erkennen, durchgeführt. (A) Zeitabhängige Aktivierung von T84-Zellen durch *S. Typhi*. Zellen wurden 15, 30 und 60 min mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2) und sterilem PBS behandelt. (B) Aktivierung von MAP-Kinasen 1 h nach der Infektion mit verschiedenen *S. Typhi*-Mutanten. Zellen wurden mit PMA, gereinigtem Flagellin (*S. Typhimurium*), PBS, dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2), der $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (SW74) oder der $\Delta viaB fliC$ -Mutante (STY3) stimuliert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

ERK. Überraschenderweise wurde jedoch keine Phosphorylierung von p38 und JNK in mit dem Wildtyp infizierten Zellen beobachtet. Diese Beobachtung ist mit der Hypothese, dass das Vi-Antigen spezifisch die Aktivierung von ERK inhibiert, (Sharma & Qadri, 2004) nicht vereinbar.

Um weiter zu untersuchen, ob das Vi-Antigen prinzipiell die Phosphorylierung der MAP-Kinasen verhindert, wurden T84-Zellen mit dem Vi-exprimierenden Wildtyp (Ty2), der Vi-negativen $\Delta tviB-vexE$ -Mutante (die jedoch noch den Regulator *tviA* exprimiert) (SW74) und der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2) infiziert und die Aktivierung der MAP-Kinasen wie beschrieben bestimmt (Abb. 13B). Sowohl der Vi-positive Wildtyp

als auch die Vi-negative $\Delta tvlB-vexE$ -Mutante induzierten im Gegensatz zu der $\Delta viaB$ -Mutante nur eine sehr geringe Phosphorylierung von ERK, JNK und p38. Durch die Expression des *tvIA*-Gens in der $\Delta viaB$ -Mutante mittel des Plasmids pTVIA1 konnte der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. Diese Beobachtungen widerlegten die Hypothese, dass das Vi-Antigen direkt zu einer reduzierten Aktivierung der MAP-Kinasen beitrug. Notwendig für diese Eigenschaft war hingegen die Expression von *tvIA*.

Als nächstes wurde überprüft, ob das Vi-Antigen oder der Regulator *tvIA* die Expression von IL-8 in Epithelzellen reduziert. Dazu wurden T84- und Caco-2-Zellen 1 h mit dem *S. Typhi*-Wildtyp, der $\Delta viaB$ - und der $\Delta tvlB-vexE$ -Mutante infiziert und die Transkription *IL8*-Gens (kodiert für IL-8) durch qRT-PCR (Abb. 12B und C) bzw. die Sekretion von IL-8 in den Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt (Abb. 12A). Die Infektion von T84-Zellen mit dem *S. Typhi*-Wildtyp führte im Vergleich zu Zellen, die mit PBS behandelt wurden, zu einem signifikanten Anstieg der *IL8*-Transkription bzw. IL-8-Sekretion. Die Vi-negative $\Delta viaB$ -Mutante induzierte jedoch eine wesentlich stärkere Reaktion als der Wildtyp (3-fach bis 5-fach). Infektion mit der *tvIA*-exprimierenden $\Delta tvlB-vexE$ -Mutante verursachte eine *IL8*-Transkription bzw. IL-8 Sekretion, die vergleichbar mit der des Wildtyps war.

Zusammengenommen liessen diese Experimente den Schluss zu, dass *tvIA* der genetische Bestandteil des *viaB*-Operons war, der die Aktivierung von MAP-Kinasen, *IL8*-Transkription und IL-8-Sekretion nach der Infektion von Epithelzellen mit *S. Typhi* verhinderte. In diesem Modell wurde kein Einfluss des Vi-Antigens selbst auf die Ausbildung einer angeborenen Immunantwort beobachtet.

3.2.2. Effekt des T3SS-1 auf die durch *tvIA* ausgeübte Minderung der IL-8-Expression in T84-Epithelzellen

Translokation von Effektorproteinen in Epithelzellen kann zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs und Sekretion von IL-8 führen (Hobbie et al., 1997, Hardt et al., 1998). Da *TviA* die Transkription von Genen des T3SS-1 reprimiert (Kapitel 3.1.) (Arricau et al., 1998), könnte die verminderte Aktivierung von Epithelzellen durch eine reduzierte Aktivität des T3SS-1 verursacht werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden T84-Zellen mit dem *S. Typhi*-Wildtyp, der *invA*-Mutante (SW222), der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2) und der $\Delta viaB invA$ -Doppelmutante (STY4) infiziert, die relative *IL8*-Transkription durch qRT-PCR (Abb. 14A) und die Invasivität durch ein Gentamicin-Schutzexperiment bestimmt (Abb. 14B). Im Vergleich zum Wildtyp war

die $\Delta viaB$ -Mutante wesentlich invasiver. Das *invA*-Gen kodiert für ein essentielles Strukturprotein des T3SS-1. Wie erwartet reduzierte die Mutation des T3SS-1 Gens *invA* die Invasivität des Wildtyps und der $\Delta viaB$ -Mutante signifikant. Die *IL8*-Transkription war in dem hier untersuchten Epithelzell-Modell jedoch nicht anhängig von der Funktion des T3SS-1, da der Wildtyp und die *invA*- bzw. die $\Delta viaB$ -Mutante und die $\Delta viaB invA$ -Doppelmutante eine vergleichbare Veränderung der *IL8*-mRNA

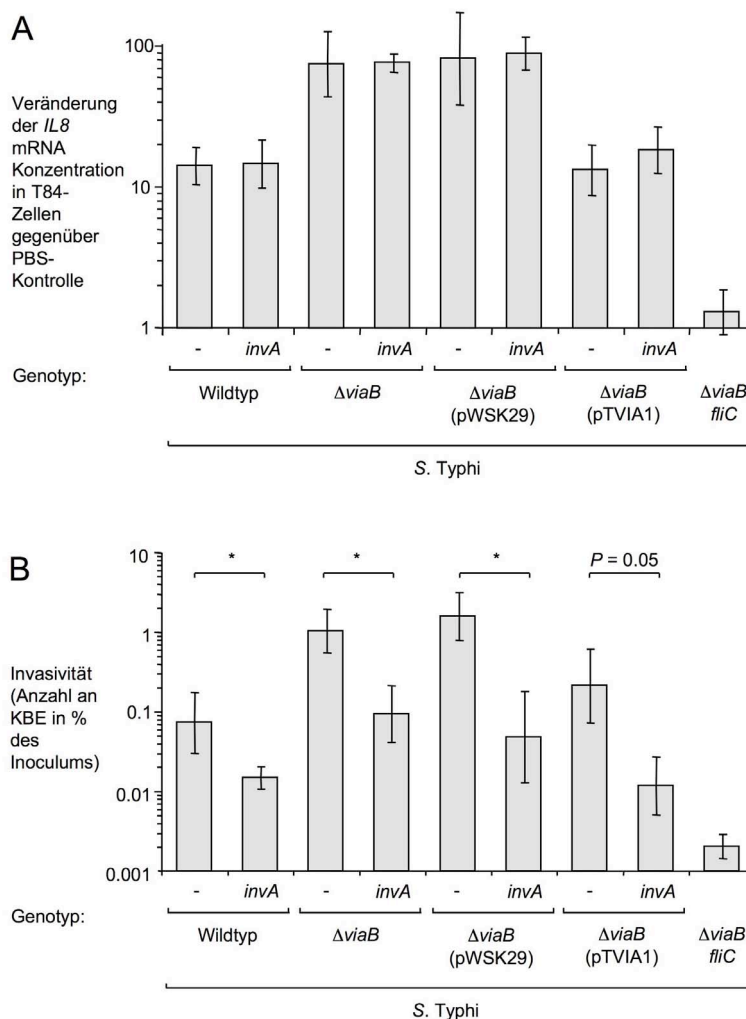


Abb. 14: Einfluss des T3SS-1 und Invasion auf die durch *S. Typhi* induzierte *IL-8* Expression in T84-Epithelzellen. Zellen wurden 1 h mit dem *S. Typhi*-Wildtyp (Ty2), der $\Delta viaB$ -Mutante (STY2), der *invA*-Mutante (SW222), der $\Delta viaB invA$ -Mutante (STY4) und der $\Delta viaB fliC$ -Mutante (STY3) infiziert. (A) Die relative Expression von *IL8* in T84-Zellen wurde durch qRT-PCR gemessen. Die Werte sind als Veränderung gegenüber der mit PBS behandelten Kontrolle berechnet worden. (B) Die Invasivität der Stämme wurde durch Gentamicin-Schutzexperimente ermittelt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Konzentration auslösten. Damit wurde die IL-8-Produktion nicht durch die veränderte Regulation des T3SS-1 verursacht.

3.2.3. Auswirkung der durch *tviA* reprimierten Sekretion von Flagellin auf die *IL8*-Transkription in T84-Zellen

Um zu untersuchen, ob die durch *tviA* vermittelte Minderung der IL-8-Expression durch einen von *S. Typhi* sekretierten Faktor verursacht wurde, wurden T84-Zellen mit sterilen Bakterienkulturüberständen stimuliert und die relative *IL8*-Transkription durch qRT-PCR gemessen (Abb. 15B). Der Kulturüberstand des *S. Typhi*-Wildtyps (Ty2) induzierte eine signifikante Steigerung der *IL8*-Transkription (25-fach) gegenüber nicht-infizierten Zellen (PBS-Kontrolle). Behandlung der Zellen mit Kulturüberstand der Δ *viaB*-Mutante (STY2) hingegen führte zu einer wesentlich stärkeren Induktion (90-fach gegenüber PBS-Kontrolle). Diese Aktivierung konnte durch Expression des plasmidkodierten *tviA*-Gens (pTVIA1) wieder auf Wildtyp-Niveau reduziert werden. Somit konnte der mit lebenden Bakterien beobachtete Phänotyp (Abb. 12) mit sterilen Kulturüberständen reproduziert werden (Abb. 15B).

Bakterielles Flagellin kann die Expression entzündungsfördernder Gene in T84- und Caco-2-Epithelzellen durch Aktivierung von TLR5 induzieren (Gewirtz *et al.*, 2001a). Das Chromosom von *S. Typhi* kodiert nur ein Flagellin, *fliC*. Epithelzellen, die mit einer unbegeißelten Δ *viaB fliC*-Mutante (Abb. 13A) infiziert wurden, reagierten nicht mit verstärkter *IL8*-Transkription (Abb. 12C) oder Phosphorylierung von MAP-Kinasen (Abb. 13B). Gereinigtes Flagellin von *S. Typhimurium* und *S. Typhi* ist hingegen ein sehr guter Stimulator dieser Reaktionen (Abb. 12C, 13C und 13D). Um zu testen, ob die Reduktion der *IL8*-Transkription in T84-Zellen durch eine veränderte Sekretion von Flagellin in das umgebende Kulturmedium verursacht wurde, wurden die Proteine des Kulturüberstands mit TCA gefällt bzw. Ganzzellsate erstellt und durch Western-Blot mit *Salmonella*-H-Antiserum untersucht (Abb. 13C). Stämme, die *tviA* exprimierten, d.h. der *S. Typhi*-Wildtyp, die Δ *tviB-vexE*-Mutante und die mit pTVIA1 komplementierte Δ *viaB*-Mutante exprimierten und sekretierten wesentlich weniger FliC als die Δ *viaB*-Mutante ohne funktionelles *tviA*-Gen. Die Stimulation von T84-Zellen mit Flagellin führte über einen weiten Konzentrationsbereich (0.01 μ g/ml bis 1 μ g/ml) zu einer gesteigerten Transkription von *IL8* (Abb. 15D). Zusammengefasst unterstützen diese Experimente die Hypothese, dass *tviA* in *S. Typhi* die Produktion des CXC-Chemokins IL-8 durch reprimierte Sekretion von Flagellin reduziert.

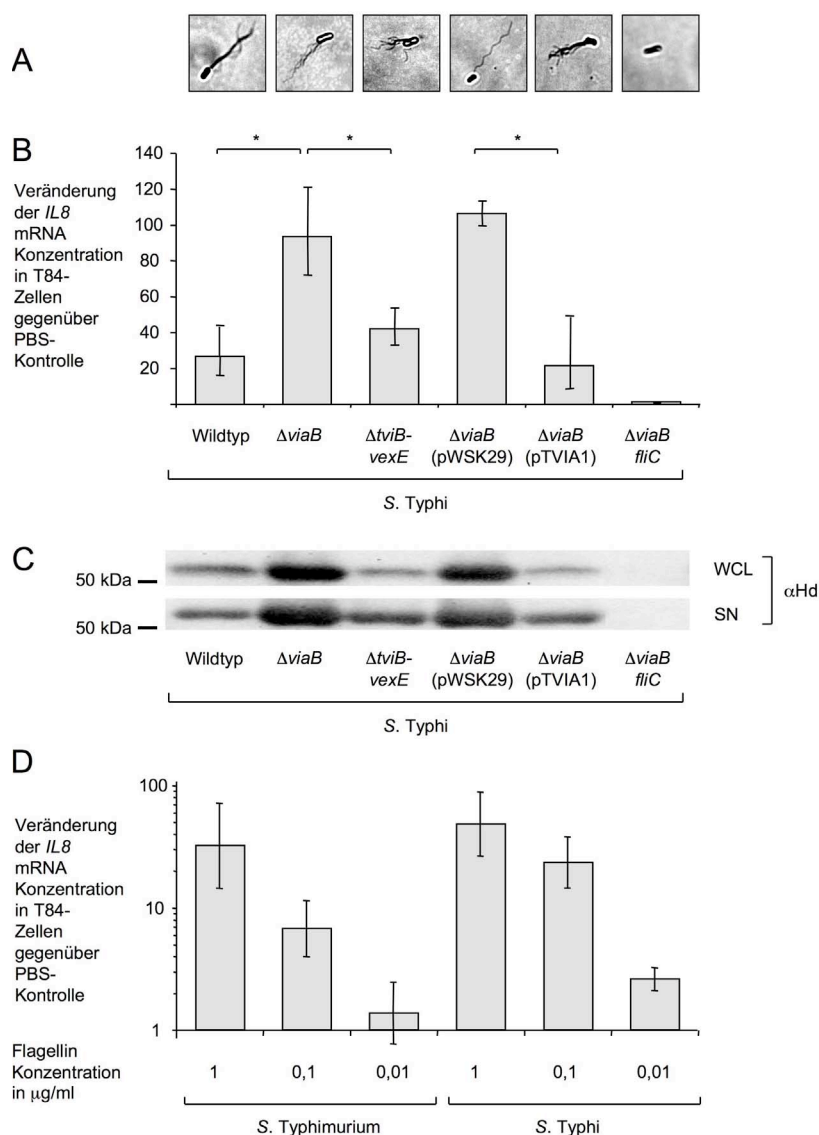


Abb. 15: Einfluss von *tviA* auf die Expression und Sekretion von Flagellin.

Der Genotyp der *S. Typhi* Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (Ty2), $\Delta viaB$ (STY2), $\Delta tviB-vexE$ (SW74) und $\Delta viaB fliC$ (STY3). (A) Färbung der Flagellen durch Kristallviolett. (B) Behandlung von T84-Zellen mit sterilen Bakterienkulturüberständen führt zur Transkription von *IL8*. Zellen wurden mit 0,05 ml Überstand 1 h stimuliert. Die relative Konzentration der *IL8* mRNA wurde durch qRT-PCR gemessen. Die Werte sind als Veränderung gegenüber der mit PBS behandelten Kontrolle berechnet worden.

(C) Nachweis von Flagellin (FliC) im Ganzzellextrakt (WCL) und in mit TCA gefällten Überständen (SN) von *S. Typhi*-Kulturen. Proben wurden durch Western-Blot mit *Salmonella*-H-Antiserum d (αHd) analysiert. Die Position und die molekulare Masse eines Standardproteins ist angegeben. (D) Konzentrationsabhängige Stimulation von T84-Zellen mit gereinigtem Flagellin, isoliert von *S. Typhi* und *S. Typhimurium*. T84-Zellen wurden mit der unter der Abbildung angegebenen Konzentration an Flagellin 1 h stimuliert und die relative Expression von *IL8* durch qRT-PCR gemessen. Die Werte sind als Veränderung gegenüber der mit PBS behandelten Kontrolle berechnet worden. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

3.2.4. Effekt der Expression von *tviA* in *S. Typhimurium* auf die Sekretion von Flagellin und die Erkennung durch Epithelzellen

Das Gen *tviA* wurde (als Teil von SPI-7) wahrscheinlich durch ein horizontales Gentransferereignis erworben (Parkhill *et al.*, 2001) und erlaubte einem möglicherweise enteritischen Vorläufer neben der Expression des Vi-Antigens eine veränderte Regulation von Virulenzfaktoren, z.B. Flagellen. Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss der Transfer des *tviA*-Gens in einen enteritischen

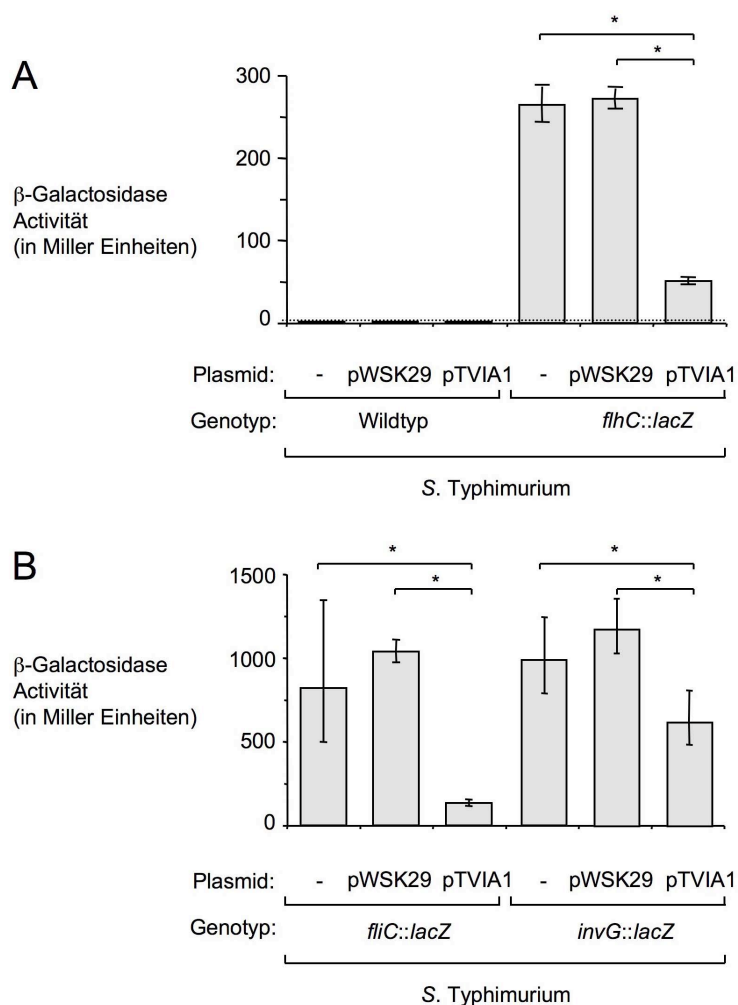


Abb. 16: Einfluss von *TviA* auf die Transkription des Flagella-Regulons und Gene des T3SS-1 in *S. Typhimurium*. Die Aktivität des *flhC*- (A), *fliC*- und *invG*- (B) Promotors wurde durch Verwendung von Operon-Fusionen mit *lacZ* gemessen. *tviA* wurde durch das Plasmid pTVIA1 in *S. Typhimurium* eingebracht. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (LT2), *flhC::lacZ* (TH4054), *fliC::lacZ* (TH1077) und *invG::lacZYA* (SW257). Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern * gekennzeichnet ($P < 0,05$).

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

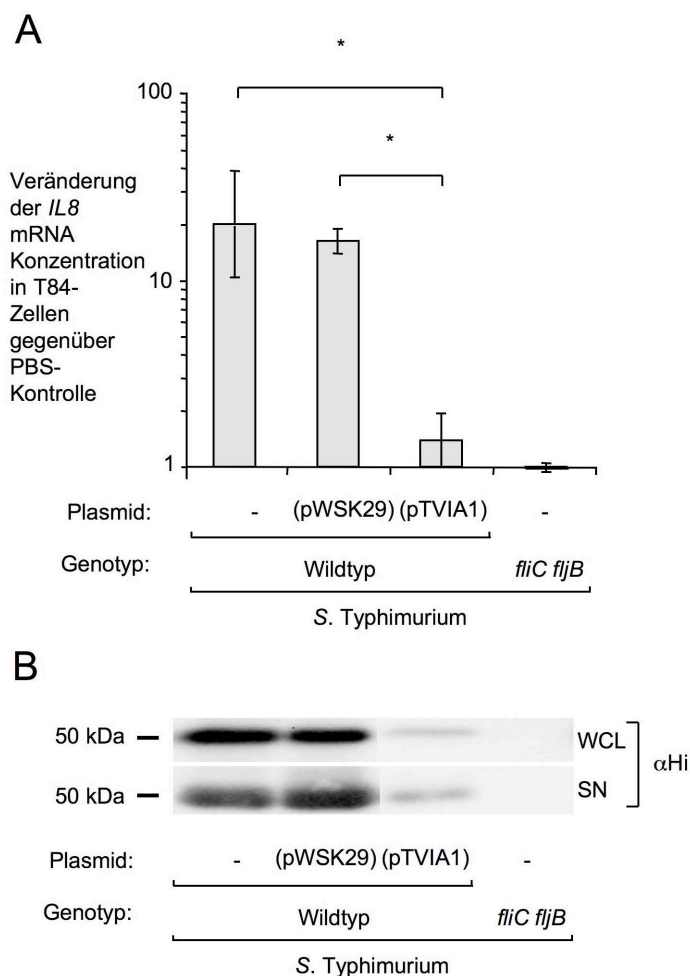


Abb. 17: Einfluss von *tviA* auf die Expression und Sekretion von FliC in *S. Typhimurium*.

(A) Expression von *IL8* durch T84-Zellen infiziert mit *S. Typhimurium*. Zellen wurden 1 h mit den unter der Abbildung angegebenen *S. Typhimurium*-Stämmen infiziert: Wildtyp (IR715) bzw. *fliC fliB* (EHW26). *tviA* wurde durch das Plasmid pTVIA1 exprimiert. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. Statistische Signifikanz ist durch einen Stern * gekennzeichnet ($P < 0,05$). (B) Nachweis der Expression und Sekretion von FliC durch *S. Typhimurium*. Ganzellextrakte (WCL) und durch TCA gefällte Kulturüberstände (SN) wurden durch Western Blot mit *Salmonella*-H-Antiserum i (α Hi) untersucht. Die molekulare Masse und die Position eines Standardproteins ist angegeben.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Serotyp hat. Dazu wurde das *tviA*-Gen unter Kontrolle des nativen Promotors (pTVI75

A1) in *S. Typhimurium* eingebracht und die Transkription der Gene *flhC*, *fliC* und *invG* durch transkriptionelle Fusionen mit dem *lacZ*-Gen gemessen (Abb. 16A und B).

Wie in *S. Typhi* (Abb. 7 und 8) reprimierte TviA die Transkription dieser Gene. Des Weiteren reduzierte das *tviA*-Genprodukt die Expression und Sekretion des Phase-1-Flagellins, FliC, in *S. Typhimurium* (Abb. 17B). Diese Ergebnisse zeigten, dass TviA in beiden Serotypen ähnliche Gruppen von Genen reguliert. Vergleichbar mit *S. Typhi* (Abb. 12) reduzierte die Expression von *tviA* in *S. Typhimurium* die Transkription von *IL8* in infizierten T84-Epithelzellen (Abb. 17A). Zusammenfassend unterstützen diese Befunde die Hypothese, dass der horizontale Transfer des

Regulators TviA und die damit verbundene Regulation vorhandener Virulenzfaktoren (T3SS-1, Flagellin) einen entscheidenden Einfluss auf die Evolution des an den Menschen adaptierten Serotyp Typhi gehabt haben könnte.

3.3. Beitrag von *tviA* auf das Auslösen der Entzündungsreaktion im Darmtrakt

In dem vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass TviA die Erkennung von *S. Typhi* durch Epithelzellen durch die verminderte Sekretion des TLR5-Aktivators Flagellin vermittelt. Deshalb sollte untersucht werden, ob dieser Mechanismus *in vivo* zu einer geringeren Produktion von CXC-Chemokinen und zu einer geringeren Einwanderung von Neutrophilen beiträgt. Der einzig bekannte, natürliche Wirt von *S. Typhi* ist der Mensch. Experimentelle Infektionen von höheren Primaten (Schimpansen) sind möglich (Gaines *et al.*, 1968), aber ethisch nicht zu vertreten. Als Modell der menschlichen Infektion mit *S. Typhi* wird oft die experimentelle Infektion von Mäusen mit *S. Typhimurium* eingesetzt (Tsolis *et al.*, 1999b). Diese Strategie ist zur Analyse von *S. Typhi* spezifischen Virulenzfaktoren nur eingeschränkt nutzbar, da die Infektion von Mäusen mit *S. Typhimurium* zu einer systemischen Verbreitung des Erregers ohne Entzündungsreaktion im Darmtrakt führt. Nur wenn Mäuse mit Streptomycin vorbehandelt werden, wird ein auf das Caecum beschränkter Entzündungsprozess eingeleitet (Barthel *et al.*, 2003). In dem vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass die Expression von *tviA* in *S. Typhimurium* wie in *S. Typhi* eine reprimierte Expression von Flagellin und verminderte Produktion von CXC-Chemokinen in infizierten Epithelzellen erlaubt (Abb. 16 und 17). Um zu untersuchen, ob die durch *tviA* vermittelte Repression von Flagellin die Entzündungsreaktion beeinflusst, wurden in dieser Arbeit Streptomycin-vorbehandelte Mäuse als Modell verwendet. Obwohl der Beitrag von Flagella bzw. Flagellin auf die pathologischen Veränderungen während der Infektion mit *Salmonella* ausgiebig untersucht worden ist (Iqbal *et al.*, 2005, Stecher *et al.*, 2008, Stecher *et al.*, 2004, Schmitt *et al.*, 2001), existiert jedoch keine Übereinstimmung über den genauen Ablauf oder den Mechanismus. Im Folgenden wurde deshalb die Rolle, die die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem während des Entzündungsprozesses spielt, genauer untersucht.

3.3.1. Beitrag von Flagellin zur Induktion von Enteritis durch Pathogen-assoziierte Mustererkennung

Flagellen tragen nach der Infektion mit *S. Typhimurium* maßgeblich zur Entzündungsreaktion im Darmtrakt bei. In der Mukosa des Darmtrakts von Hühnern (Iqbal *et al.*, 2005), Streptomycin-vorbehandelten Mäusen (Stecher *et al.*, 2008, Stecher *et al.*, 2004) und Rindern (*ligated ileal loops*) (Schmitt *et al.*, 2001) erzeugen unbegeißelte Mutanten im Vergleich zum begeißelten Wildtyp eine stark verminderte Entzündungsreaktion.

Es wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, durch die Flagellen zum Auslösen einer Entzündungsreaktion beitragen können. Flagellen sind die Grundvoraussetzung für die Motilität und Chemotaxis von *Salmonella*. Die Beweglichkeit der Bakterien trägt wesentlich zum Invasionsprozess von nicht-phagozytären Zellen wie Epithelzellen bei, da der Kontakt zwischen Bakterien und Wirtszelle verstärkt und die Effizienz des T3SS-1 somit erhöht wird (Jones *et al.*, 1981, Jones *et al.*, 1992). Das T3SS-1 ist ein wichtiger Faktor, der zum Auslösen der Entzündungsreaktion beiträgt (Ahmer *et al.*, 1999, Hapfelmeier *et al.*, 2004, Tsolis *et al.*, 1999a, Zhang *et al.*, 2002). Unbegeißelte Mutanten könnten deshalb weniger pathologische Veränderungen im Darmtrakt auslösen, da die Effizienz der durch das T3SS-1 vermittelten Gewebeinvasion vermindert ist.

Zusätzlich zu dem Beitrag zur Gewebeinvasion sind durch Experimente in Zellkultur Proteine identifiziert worden, welche die Erkennung des freien Monomers Flagellin durch das angeborene Immunsystem ermöglichen. Zum Einen kann die Aktivierung von Epithelzellen oder Dendritischen Zellen mit Flagellin durch TLR5 erfolgen (Gewirtz *et al.*, 2001a, Gewirtz *et al.*, 2001b, Hayashi *et al.*, 2001, Uematsu *et al.*, 2006). Zum anderen kann Flagellin, das durch das T3SS-1 in das Cytosol von Makrophagen transloziert wird, das Molekül „IL-1 β converting enzyme (ICE)-protease activating factor“ (IPAF), ein „nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor“ (NLR), aktivieren (Sun *et al.*, 2007, Franchi *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2006). Dieses Signal aktiviert das sog. Inflammasom, ein Multiproteinkomplex, dessen zentraler Bestandteil, Caspase-1, die Interleukine IL-1 β und IL-18 proteolytisch spaltet und dadurch in die aktive Form überführt (Franchi *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2006).

Obwohl diese Mechanismen detailliert in Zellkultur charakterisiert worden sind, ist nicht klar, welches Wirkprinzip *in vivo* zur Entzündungsreaktion beiträgt. Deshalb wurde vor der Untersuchung des Effekts von *tviA* auf die angeborene Immunantwort *in vivo* die Wirkung von Flagellin selbst genauer charakterisiert.

3.3.1.1. Genetischer Ansatz zur Bestimmung des Beitrag von Flagellin zum Entzündungsprozess

Der Hauptgrund für das fehlende Verständnis der Wirkprinzipien von Flagellin *in vivo* liegt in der Verwendung von unzureichenden bakteriellen Mutagenesestrategien. Die Mutation beider Flagelline (*fliC* und *fliB*) des zweiphasigen Serotyps Typhimurium führt zu einem pleiotropen Phänotyp, da sowohl die Beweglichkeit (bzw. Invasivität) des Stamms (Abb. 18) als auch die Erkennung von Flagellin durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (TLR5 und IPAF) beseitigt wird (Abb. 19 und 20). Mutanten, welche die Gene *fliC* und *fliB* nicht mehr exprimieren, induzieren eine geringere Entzündungsreaktion in verschiedenen Tiermodellen (Schmitt et al., 2001, Iqbal et al., 2005, Stecher et al., 2004, Vijay-Kumar et al., 2006). Da für diese Studien Mutanten mit pleiotropem Phänotyp verwendet worden sind, kann nicht zwischen der Erkennung durch das angeborene Immunsystem (TLR5 und IPAF) und dem Einfluss auf die Gewebeinvasion unterschieden werden.

Deshalb wurde eine neue Strategie entwickelt, um zwischen diesen beiden Mechanismen unterscheiden zu können. Die Mutation des *flgK*-Gens, das für ein haken-assoziiertes Protein kodiert, führt zu einem Verlust der Beweglichkeit, da sich das Filament nicht ausbilden kann (Suzuki et al., 1978). Die Sekretion von monomeren Flagellin hingegen wird dadurch nicht beeinträchtigt (Gillen & Hughes, 1991). Deshalb kann angenommen werden, dass eine *flgK*-Mutante und eine *flgK fliC fliB*-Dreifach-Mutante gleiche Invasivität besitzen und sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden sollten. Um die Schlüsselkomponenten dieser Strategie zu testen, wurden die *flgK*-Mutante (SW215) und die *flgK fliC fliB*-Dreifach-Mutante (SPN315) *in vitro* charakterisiert. Wie erwartet waren beide Stämme nicht begeißelt (Abb. 18A) und nicht beweglich (Abb. 18B). TLR5 wird nur durch monomeres Flagellin aktiviert, da die Bindungsstelle von TLR5 im polymerisierten Filament nicht zugänglich ist (Smith et al., 2003). Um die insgesamt zur Verfügung stehende Menge an Flagellin zu bestimmen (sekretiert oder oberflächengebunden), wurden die Oberflächenstrukturen durch Scherkräfte abgelöst, die löslichen Faktoren von den intakten Zellen durch Zentrifugation getrennt und durch Western-Blot analysiert (Abb. 18C). Im Überstand des Wildtyp als auch der *flgK*-Mutante wurden vergleichbare Mengen von FliC festgestellt, während wie erwartet keine *fliC*-Expression in der *flgK fliC fliB*-Mutante nachweisbar war. Das Prinzip der hier vorgeschlagenen Strategie ist die Trennung von Invasivität von der Erkennung durch das angeborene

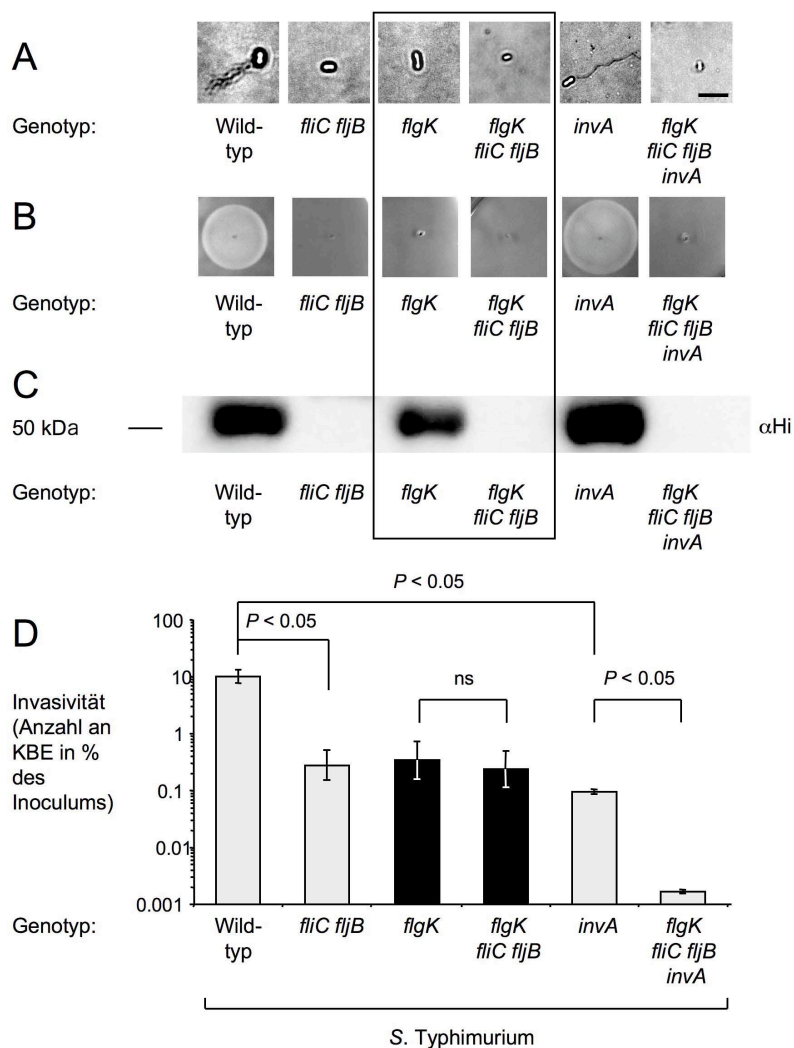


Abb. 18: Charakterisierung der *S. Typhimurium*-Flagella-Mutanten *in vitro*. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *fliC fljB* (SW473), *flgK* (SW215), *flgK fliC fljB* (SPN315), *invA* (SW399) und *flgK fliC fljB invA* (SW358). Stämme, die *in vivo* verglichen werden sollen, sind durch Umrahmung (A-C) oder schwarze Säulen (D) hervorgehoben. (A) Färbung der Flagellen mit Kristallviolett. Größeneinheit: 5 μ m. (B) Beweglichkeit der *S. Typhimurium* Stämme in Platten mit 0,3 % Agar. (C) Analyse des in den Kulturüberstand sekretierten Flagellins. Oberflächenstrukturen wurden abgeschert, zusammen mit dem Kulturüberstand durch Zugabe von TCA gefällt und durch Western-Blot mit *Salmonella*-H-Antiserum (α Hi) untersucht. Die Position und molekulare Masse eines Standardproteins ist angegeben. (D) Invasion von T84-Epithelzellen durch *S. Typhimurium*. T84-Epithelzellen wurden in Gentamicin-Schutzexperimenten 1 h mit den angegebenen Stämmen infiziert. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Immunsystem. Um nur den Effekt der Erkennung durch das Immunsystem zu betrachten, müssen die beiden zu vergleichenden Mutanten gleich Invasivität aufweisen. Deshalb wurde die Invasivität der *flgK*-Mutante und der *flgK fliC fljB*-Mutante *in vitro* in einem Gentamicin-Schutzexperiment mit T84-Epithelzellen

bestimmt (Abb. 18D). Die Invasivität der *flgK*-Mutante war im Vergleich zum Wildtyp reduziert ($P < 0.05$), jedoch mit der der *flgK fliC fljB*-Mutante nahezu identisch. Mutation von *invA* in dem *flgK fliC fljB*-Stamm reduzierte die Invasivität weiter ($P < 0,05$), was darauf hindeutete dass das T3SS-1 durch die Mutationen in *flgK*, *fliC* oder *fljB* nicht beeinträchtigt wurde. Zusammengenommen zeigten diese Experimente, dass die *flgK*-Mutante (SW215) und die *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) gleiche Invasivität besaßen und sich nur die unterschiedliche Sekretion von Flagellin auszeichneten.

3.3.1.2. Charakterisierung der *flgK*- und der *flgK fliC fljB*-Mutante bezüglich der Erkennung durch TLR5 und IPAF *in vitro*

Wie in Kapitel 3.2. erläutert, exprimieren T84-Zellen TLR5. Um die Fähigkeit der *flgK*- und der *flgK fliC fljB*-Mutante bezüglich der Erkennung durch TLR5 ohne störende Einflüsse der Invasivität zu untersuchen, wurden Oberflächenstrukturen wie

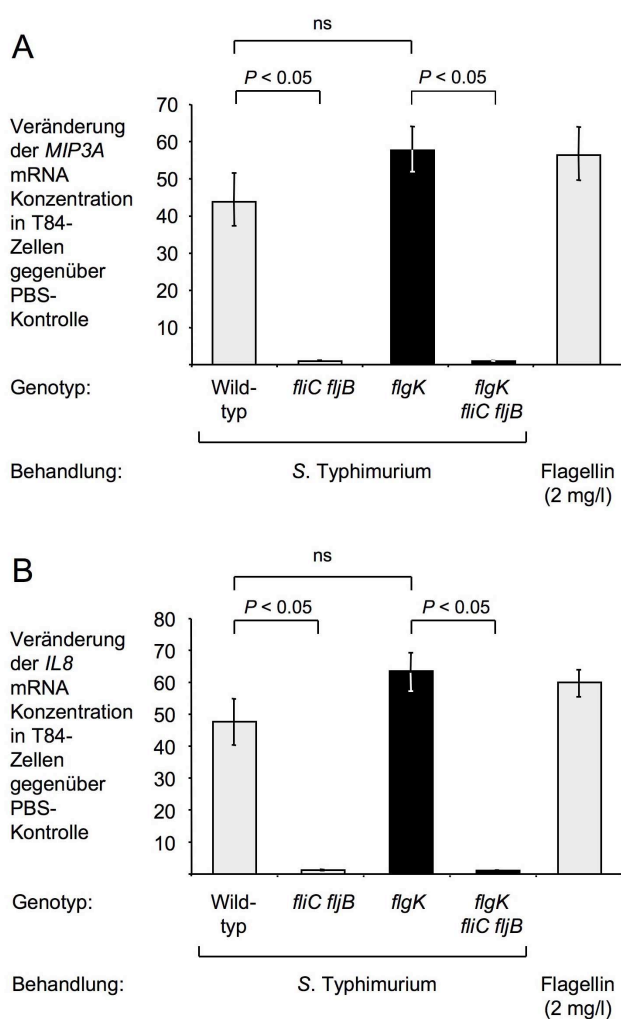


Abb. 19: Durch bakterielles Flagellin induzierte Transkription von *MIP3A* (A) und *IL8* (B) in T84-Epithelzellen. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *fliC fljB* (SW473), *flgK* (SW215) und *flgK fliC fljB* (SPN315). Stämme, die *in vivo* verglichen werden sollen, sind durch schwarze Säulen hervorgehoben.

Oberflächenstrukturen wurden abgeschert und die intakten Zellen durch Zentrifugation abgetrennt. T84-Zellen wurden mit 5 μ l des sterilen Kulturüberstands, 2 mg/ml gereinigtem Flagellin oder PBS stimuliert und die relative Konzentration an *MIP3A* (A) und *IL8* (B) mRNA durch qRT-PCR gemessen. Die Werte sind als Veränderung gegenüber der mit PBS behandelten Kontrolle berechnet worden und stellen die geometrischen Mittel aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

in Kapitel 3.3.1.1. beschrieben abgetrennt, T84-Zellen mit diesen sterilen Kulturüberständen stimuliert und die Transkription des CXC-Chemokins IL-8 und des CC-Chemokins „*macrophage inflammatory protein 3a*“ (CCL20, MIP-3 α) durch qRT-PCR bestimmt (Abb. 19). Eine erhöhte Transkription von *IL8* und *MIP3A* wurde in Zellen beobachtet, die mit Überständen des *S. Typhimurium*-Wildtyps (IR715) und der *flgK*-Mutante (SW215) stimuliert wurden. Die Überstände einer *fliC fljB*-Mutante (SW473) bzw. der *flgK fliC fljB*-Mutante induzierten keine Erhöhung der *IL8*- oder *MIP3A*-mRNA Konzentration im Vergleich zu mit PBS stimulierten Zellen. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes *S. Typhimurium* Flagellin verwendet.

Als nächstes wurden die *flgK*- und die *flgK fliC fljB*-Mutante bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, das Inflammasome, d.h. Caspase-1, durch IPAF zu aktivieren. Als Modell wurden aus Knochenmark-generierte Makrophagen verwendet, da sowohl der NLR IPAF als auch die Proteine des Inflammasoms die Erkennung von transloziertem Flagellin ermöglichen (Miao et al., 2006, Franchi et al., 2006). Knochenmark-generierte Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen wurden mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp (IR715), der *invA*-Mutante (SW399), der *fliC fljB*-Mutante (SW473), der *flgK*-Mutante (SW215) und der *flgK fliC fljB*-Mutante (SW473) infiziert und die Konzentration an IL-1 β im Kulturüberstand durch ELISA gemessen (Abb. 20A). Wie in der Literatur beschrieben (Miao et al., 2006, Franchi et al., 2006) war die Sekretion von IL-1 β abhängig von der Fähigkeit der Stämme, Flagellin und ein funktionelles T3SS-1 zu exprimieren, da weder die *fliC fljB*-Mutante noch die *invA*-Mutante eine vergleichbare Reaktion wie der Wildtyp produzierten ($P < 0,05$). Die *flgK*-Mutante und der Wildtyp induzierten eine vergleichbare IL-1 β -Sekretion ($P = 0,1$). Mit der *flgK fliC fljB*-Mutante infizierte Zellen hingegen sekretierten signifikant weniger IL-1 β als die *flgK*-Mutante ($P < 0,05$). Die Sekretion von IL-1 β , induziert durch den Wildtyp und die *flgK*-Mutante, war abhängig von der Expression von Caspase-1, da in den Überständen von Makrophagen aus Knochenmark von *Casp1*-defizienten Mäusen eine wesentlich geringere Konzentration an IL-1 β gemessen wurde (Abb. 20B). Die Anzahl an Zell-assoziierten Bakterien wurde am Ende des Experiments bestimmt und keine statistisch signifikanten Unterschiede für die einzelnen Mutanten beobachtet (Abb. 20C).

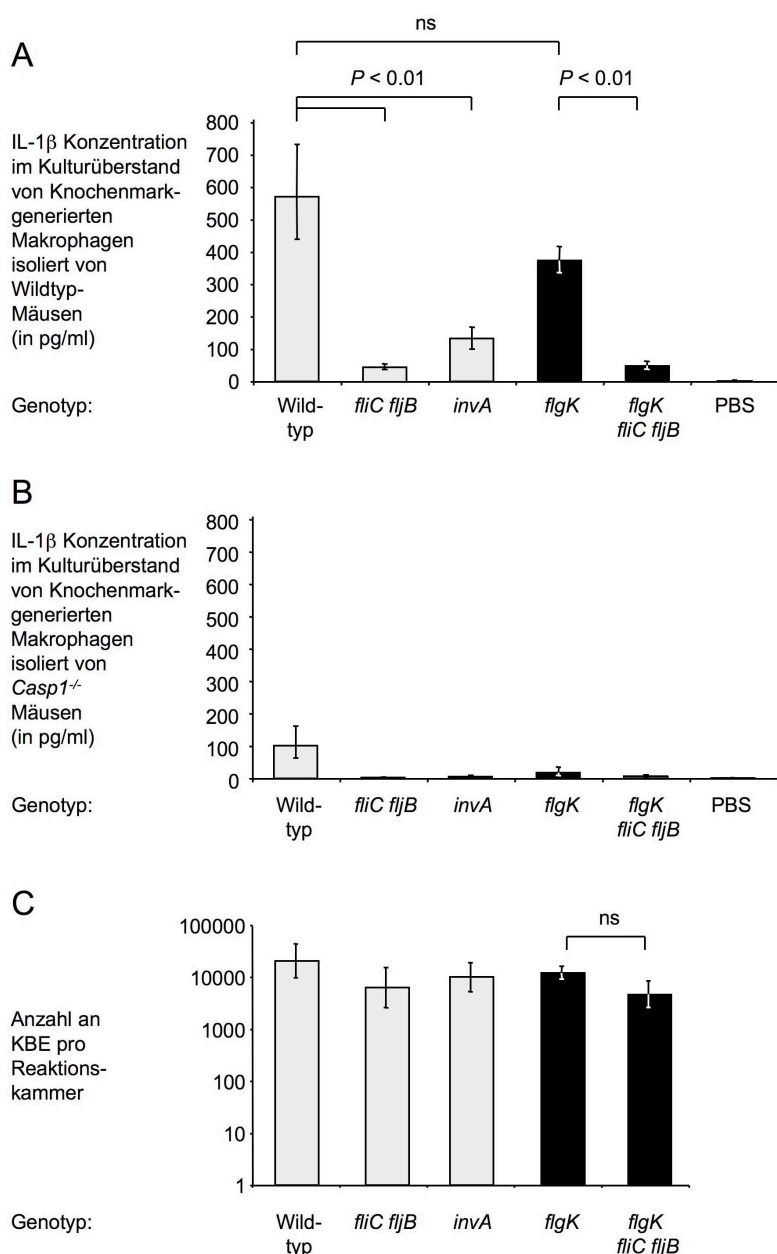


Abb. 20: Flagellin-abhängige Sekretion von IL-1 β durch Makrophagen. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *fliC fljB* (SW473), *flgK* (SW215), *flgK fliC fljB* (SPN315) und *invA* (SW399). Stämme, die *in vivo* verglichen werden sollen, sind durch schwarze Säulen hervorgehoben. Knochenmark-generierte Makrophagen von Wildtyp-Mäusen (A) und *Caspase-1*^{-/-} Mäusen (B) wurden 4 h mit 100 ng/ml LPS behandelt und mit den angegebenen *S. Typhimurium*-Stämmen 18 h lang infiziert. Die Konzentration an IL-1 β im Kulturüberstand wurde durch ELISA gemessen. Die dargestellten Werte

sind die geometrischen Mittel von drei (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten \pm Standardfehler. (C) Anzahl an KBE pro Reaktionskammer 18 h nach der Infektion. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. ns: nicht statistisch signifikant.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der *S. Typhimurium*-Wildtyp und die *fliC fljB*-Mutante sich hinsichtlich ihrer Invasivität und der Fähigkeit, das angeborene Immunsystem durch TLR5 und IPAF zu aktivieren, unterscheiden und damit ungeeignet sind, zwischen diesen Mechanismen zu differenzieren. Im Gegensatz dazu hat der Vergleich der *flgK*- und der *flgK fliC fljB*-Mutante gezeigt, dass die Invasivität beider Stämme vergleichbar war und diese sich nur in ihrem Vermögen TLR5- bzw. IPAF-abhängige Reaktionen zu erzeugen, unterscheiden.

3.3.1.3. Einfluss von Flagellin auf die Transkription von CXC-Chemokinen und *Ifng* im Caecum von Streptomycin-vorbehandelten Mäusen

Der Einfluss von Flagellin auf die Transkription entzündungsfördernder Gene wurde in zwei Tiermodellen getestet: Streptomycin-vorbehandelte Mäuse (Barthel *et al.*, 2003) und „ligated ileal loops“ in Rindern (Santos *et al.*, 2001a). Das letztere Model erlaubt die Analyse der Immunantwort in der Induktionsphase des Entzündungsprozesses bis 12 h nach der Infektion. Zum besseren Vergleich der beiden Modelle wurde die Immunantwort in Streptomycin-vorbehandelten Mäusen 12 h nach der Infektion untersucht. Zu diesem Zeitpunkt beschränken sich die pathologischen Veränderungen in Streptomycin-vorbehandelten Mäusen auf die

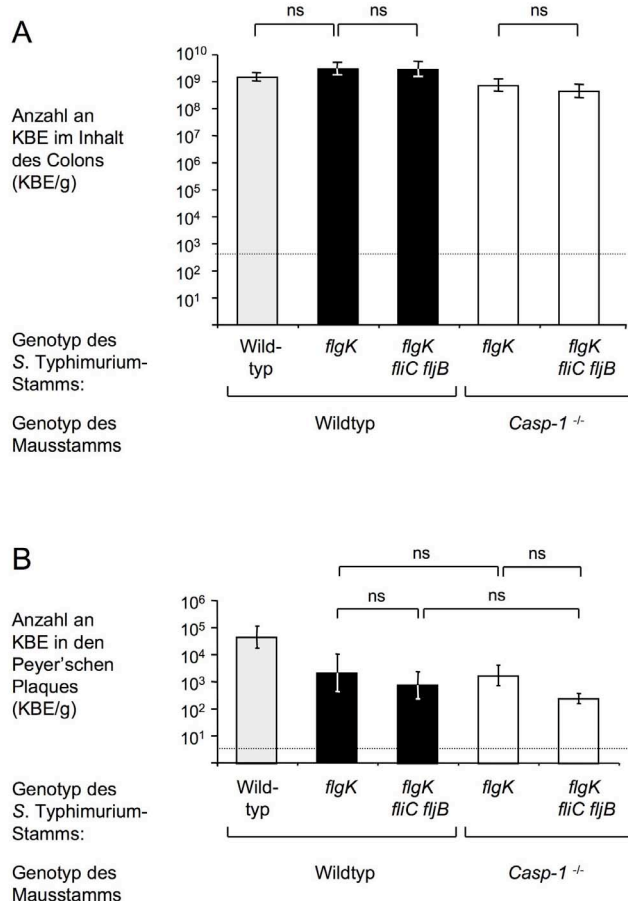


Abb. 21: Einfluss von Flagellin auf die Kolonisierung von Streptomycin-vorbehandelten Mäusen mit *S. Typhimurium*. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *flgK* (SW215), und *flgK fliC fljB* (SPN315). Stämme, die sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden, sind durch schwarze Säulen hervorgehoben. Wildtyp-Mäuse und Caspase-1 knockout-Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt und nach 24 h mit 1×10^9 KBE *S. Typhimurium* infiziert. Die Anzahl and KBE im Coloninhalt (A) und in den Peyer'schen Plaques (B) wurde 12 h nach der Infektion bestimmt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant. Die durchbrochene Linie gibt die Nachweisgrenze an.

starke Entzündungsreaktion im Caecum, während es im Ileum kaum zu entzündlichen Veränderungen kommt. Um die Hypothese zu testen, dass Flagellin zur verstärkten Transkription entzündungsfördernder Gene im Caecum beiträgt, wurden Wildtyp-Mäuse (C57BL/6) mit Streptomycin behandelt und nach 24 h mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp, der *flgK*-Mutante (SW215) bzw. der *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) oral infiziert. Als Kontrolle wurde einer Gruppe von Tieren LB-Flüssigmedium verabreicht. In alle Bakterienstämme wurde das Plasmid pHP45Ω eingebracht, um eine Streptomycinresistenz zu erreichen. 12 h später wurden die Tiere eingeschläfert und RNA aus dem Caecum isoliert. Des Weiteren wurde die Anzahl an KBE *Salmonella* in verschiedenen Geweben und Proben durch Kultivierung untersucht (Abb. 21). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen oder Bakterienstämmen wurde nicht beobachtet.

Die relative Transkription der Gene *Il6* (kodiert für IL-6), *Il17* (kodiert für IL-17), *Ifng* (kodiert für Interferon gamma, IFN-γ), *Mip2* (kodiert für das „macrophage inflammatory protein 2“, MIP2, CXCL2) und *Kc* (kodiert für das „keratinocyte-derived chemokine“, KC, CXCL1) im Caecum wurde durch qRT-PCR bestimmt (Abb. 22A, B und C; Abb. 23). Als Vergleich wurden nicht-infizierte Wildtyp-Mäuse verwendet. Im Caecum der mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp infizierten Mäuse wurde eine wesentlich höhere Konzentration von *Il6*, *Il17*, *Ifng*, *Mip2* und *Kc* mRNA als in der LB-Kontrollgruppe festgestellt ($P < 0,05$ für alle Gene). Die *flgK*-Mutante induzierte eine etwas schwächere Reaktion, die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Dieses Ergebnis zeigt, dass trotz der fehlenden Beweglichkeit der *flgK*-Mutante eine robuste Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde.

Flagellin kann das angeborene Immunsystem durch zwei unterschiedliche Signalwege (TLR5/NFκB und IPAF/Caspase-1) aktivieren. Um den jeweiligen Beitrag dieser Signalwege abschätzen zu können, sollten Wirtsgene identifiziert werden, deren Induktion nur durch einen dieser Wege erreicht wird. Dazu sollten Mäuse mit definierten Mutationen in den einzelnen Signalwegen verwendet werden. Da jedoch nicht-infizierte, TLR5^{-/-}-Mäuse eine unspezifische Entzündungsreaktion des Caecum aufweisen (Vijay-Kumar *et al.*, 2006), konnte diese Strategie nicht auf durch TLR5 regulierte Gene angewendet werden. Um Gene zu identifizieren, deren Transkription nur durch IPAF/Caspase-1 aktiviert wird, wurden mit Streptomycin vorbehandelte *Casp1-Knockout*-Mäuse mit der *flgK*-Mutante (SW215), der *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) oder LB-Flüssigmedium infiziert und 12 h später eingeschläfert. Die Anzahl an Bakterien im Darminhalt und in den Peyerschen Plaques wurde bestimmt, jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 21). Die relative

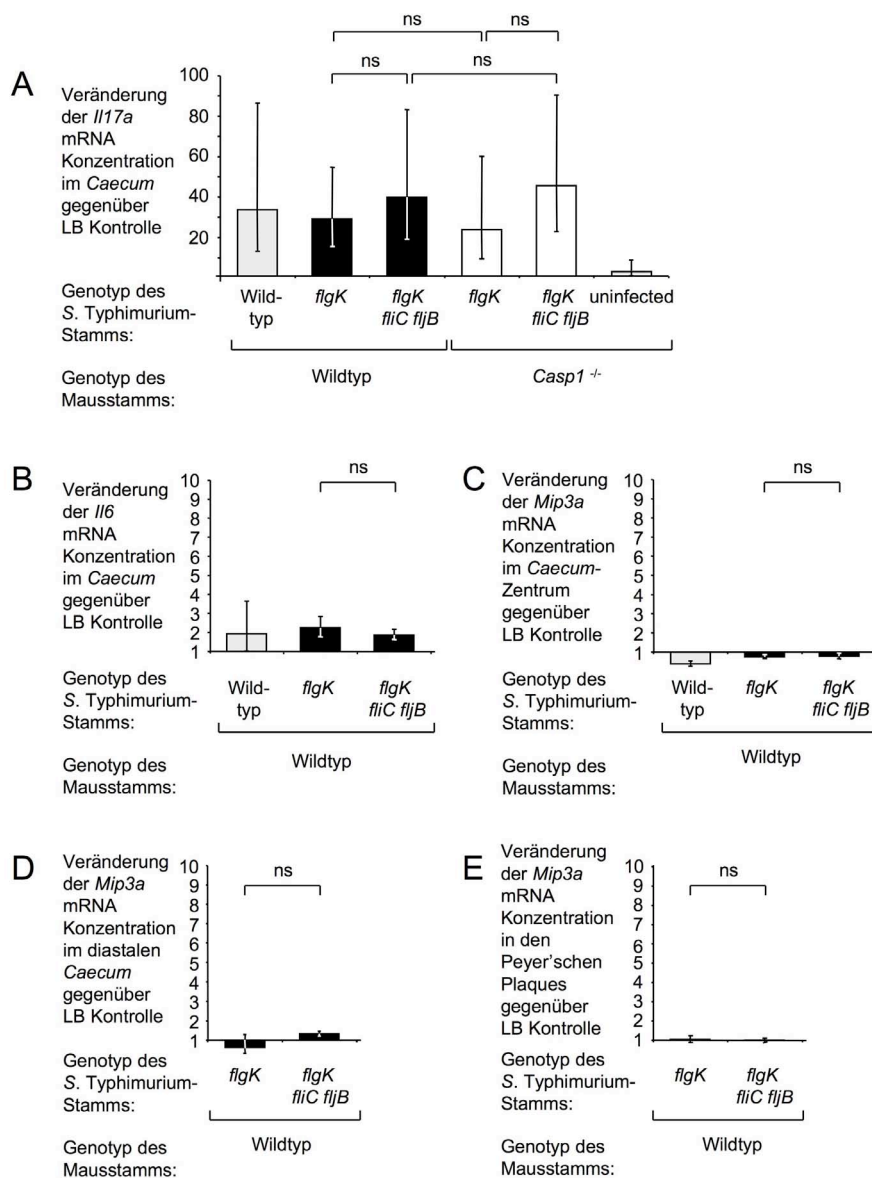


Abb. 22: Änderung der Expression von Cytokinen in der Mukosa des Caecums 12 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium*. Relative Expression von *Il17A* (A), *Il6* (B) und *Mip3a* (C) im *Caecum*-Zentrum. Transkription von *Mip3a* im distalen *Caecum* (D) und in den Peyer'schen Plaques (E). Die relative Genexpression in den Gewebeproben wurde durch qRT-PCR gemessen und die Werte als Veränderung gegenüber dem geometrischen Mittel der mit LB behandelten Kontrolltiere berechnet worden. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *flagK* (SW215) und *flagK fliC fljB* (SPN315). Stämme, die sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden, sind durch schwarze bzw. weiße Säulen hervorgehoben. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Expression von *Il17*, *IFN γ* , *Kc* und *Mip2* wurde mittels qRT-PCR gemessen (Abb. 22A und Abb. 23). Als Vergleichswert wurden nicht-infizierte Wildtyp-Mäuse benutzt. In nicht-infizierten *Casp1* *Knockout*-Mäusen wurden keine Anzeichen für kompensatorische Effekte als Folge der Mutation auf die Transkription von Chemokinen oder Cytokinen beobachtet. Die Induktion der *Il17* Transkription im

Ceacum nach der Infektion mit *S. Typhimurium* wurde durch Caspase-1 nicht beeinflusst, da im Gewebe von Wildtyp-Mäusen und *Casp1-Knockout*-Mäusen infiziert mit der *flgK*- oder der *flgK fliC fljB*-Mutante vergleichbare Konzentrationen an *Il17*-mRNA gemessen wurden. Die Transkription von *Ifng*, *Mip2* und *Kc* hingegen wurde durch die Mutation von *Caspase-1* signifikant beeinflusst (Abb. 23). Die Infektion der Tiere mit der *flgK*-Mutante oder der *flgK fliC fljB*-Mutante führte zur einer vergleichbaren Expression der Gene *Il6*, *Il17*, *Ifng*, *Mip2* und *Kc* (Abb. 22 und 23). Diese Beobachtungen lassen die folgenden Schlussfolgerungen zu: Das Inflammasom wurde im Caecum durch *S. Typhimurium* aktiviert, jedoch war diese Aktivierung unabhängig von der Fähigkeit der Salmonellen, Flagellin zu sekretieren. Ebenso war in diesem Modell das Auslösen einer entzündungsfördernden Reaktion unabhängig von der Sekretion bakteriellen Flagellins.

3.3.1.4. Einfluss der Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem auf die Entzündungsreaktion in Rindern

Ein anderes Modell zur Analyse der Wirtsantwort nach der Infektion mit *S. Typhimurium* ist das „*ligated ileal loop*“ Modell in Rindern (Santos et al., 2002, Santos et al., 2001a, Schmitt et al., 2001). Rinder stellen ein sehr gutes Modell dar, da sie ein natürlicher Wirt von *S. Typhimurium* sind und sich nach der Infektion ein entzündlicher Durchfall entwickelt, der dem des Menschen ähnelt (Santos et al., 2002, Tsolis et al., 1999b). Um den Einfluss von Flagellin auf die Entzündungsreaktion im Dünndarm von Rindern zu untersuchen, wurden Abschnitte des Ileums desselben Tieres mit *S. Typhimurium*-Wildtyp (IR715), der *flgK*-Mutante (SW215) und der *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) infiziert und die angeborene Immunantwort 2 h später untersucht. Als Kontrolle wurden Segmente des Ileums mit LB-Flüssigmedium behandelt. Das Experiment wurde in insgesamt vier Tieren ($n = 4$) wiederholt. In vorhergehenden Studien ist gezeigt worden, dass die Beweglichkeit von *Salmonella* einen direkten Einfluss auf die Induktion pathologischer Veränderung der Mukosa hat (Stecher et al., 2004, Stecher et al., 2008). Die Invasivität der einzelnen Stämme wurde durch Behandlung von Gewebeproben mit Gentamicin und Kultivierung auf Selektivmedium bestimmt (Abb. 24A). In Übereinstimmung mit diesen Veröffentlichungen wurde beobachtet, dass der bewegliche Wildtyp-Stamm wesentlich invasiver war als die unbewegliche *flgK*-Mutante oder die *flgK fliC fljB*-Mutante. Die Invasivität der *flgK*-Mutante und der die *flgK fliC fljB*-Mutante hingegen war nahezu identisch.

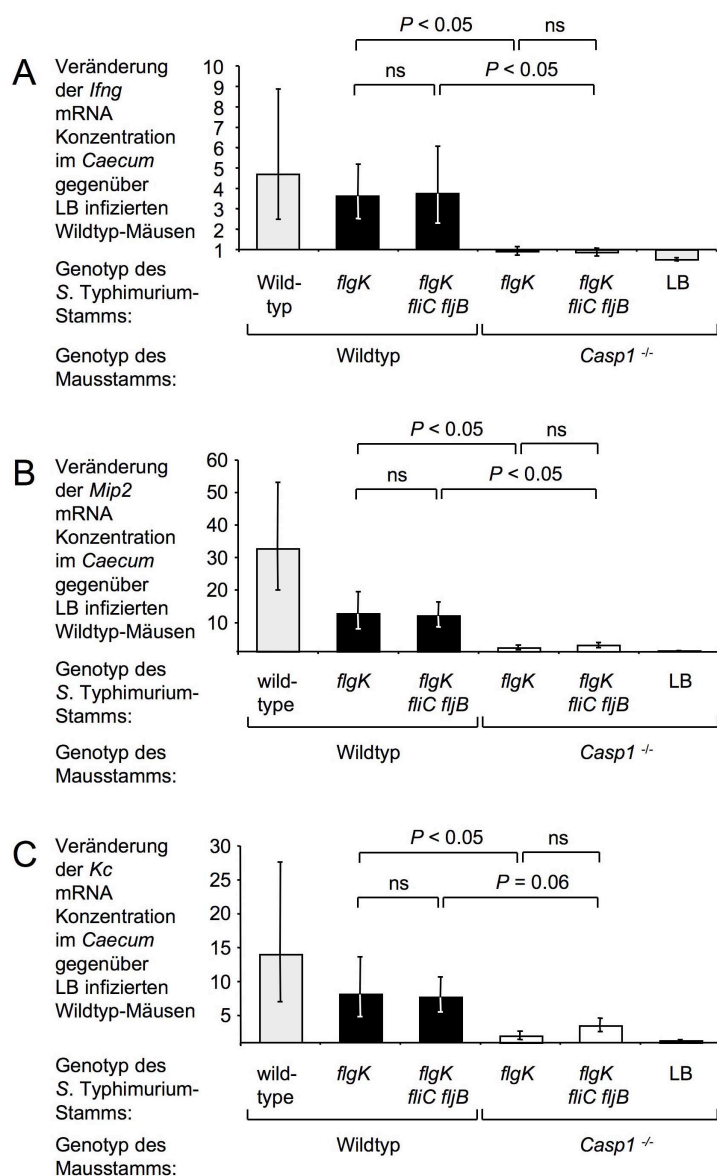


Abb. 23: Caspase-1 abhängige Änderung der Expression von *Ifng* (A), *Mip2* (B) und *Kc* (C) in der Mukosa des *Caecums* 12 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium*. Die relative Genexpression in den Gewebeproben wurde durch qRT-PCR gemessen und die Werte als Veränderung gegenüber dem Mittel der mit LB behandelten Kontrolltiere berechnet worden. Der Genotyp der *S. Typhimurium* Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben: Wildtyp (IR715), *flgK* (SW215) und *flgK fliC fljB* (SPN315). Stämme, die sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden, sind durch schwarze bzw. weiße Säulen hervorgehoben. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Zur Analyse der angeborenen Immunantwort wurde das Gewicht der im Lumen der Darmabschnitte angestauten Flüssigkeit gemessen (Abb. 24B). Diese Flüssigkeitsansammlung ist ein Surrogat des entzündlichen Durchfalls. Die *flgK*-Mutante induzierte weniger Flüssigkeitsansammlung (36 %) als der Wildtyp. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf das bessere Eindringen des beweglichen Wildtyp-Stamms zurückzuführen und zeigt, dass Motilität eine wesentliche Rolle in der Induktion der angeborenen Immunantwort spielt. Infektion mit der *flgK fliC fljB*-Mutante hingegen führte zu weniger Flüssigkeitsansammlung im Vergleich zum Wildtyp (12 %) und der *flgK*-Mutante ($P < 0,05$). Dieses Ergebnis zeigt, dass in diesem Modell 2 h nach der Infektion die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem zur Entwicklung einer entzündlichen Reaktion beiträgt.

Als nächstes wurde die relative Expression von *MIP3A*, *IL8*, *GRO*, *IL17A* und *IFNG* durch qRT-PCR gemessen (Abb. 25). Da die Sequenz der Gene, die für $GRO\alpha$

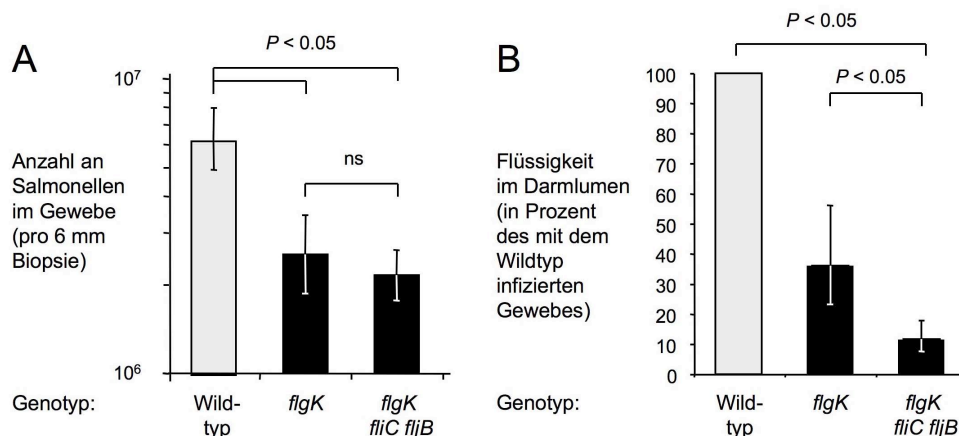


Abb. 24: Beitrag von Beweglichkeit der Bakterien und Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem zur Entzündungsreaktion in der Mukosa von Rindern nach der Infektion mit *S. Typhimurium*. Darmabschnitte wurden mit dem Wildtyp (IR715), der *flgK*-Mutante (SW215) und der *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) infiziert. (A) Invasivität der *S. Typhimurium*-Stämme *in vivo*. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien in 6 mm Biopsien wurde durch Behandlung mit Gentamycin und Kultur auf Selektivmedium bestimmt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von 4 Tieren \pm Standardfehler. (B) Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen ausgelöst durch *S. Typhimurium*. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von 3 Tieren \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant. Stämme, die sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden, sind durch schwarze Säulen hervorgehoben.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

(CXCL1), GRO β (CXCL2) und GRO γ (CXCL3) kodieren nahezu identisch sind und die Primer zur Bestimmung der Expression alle Produkte mit vergleichbarer Effizienz amplifizieren sollten, wurden die Transkription dieser Gene als die der GRO-Familie bezeichnet.

Die Infektion mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp (IR715) führte zur verstärkten Transkription von *MIP3A*, *IL8*, *GRO*, *IL17A* und *IFNG*. Die *flgK*-Mutante hingegen induzierte eine schwächere Reaktion, obwohl dieser Unterschied für keines der untersuchten Gene statistisch signifikant war. Die *flgK fliC fljB*-Mutante und die *flgK*-Mutante riefen eine vergleichbare Transkription von *IL8*, *GRO*, *IL17A* und *IFNG* hervor. Die erhöhte Transkription von *MIP3A* hingegen wurde nur durch die *flgK*-Mutante, nicht jedoch durch die *flgK fliC fljB*-Mutante induziert ($P < 0,05$) und war somit abhängig von der Erkennung des Flagellins durch das angeborene Immunsystem. Im Gegensatz dazu wurde im Zentrum des Caecums, im Lymphgewebe des Caecums und in den Peyer'schen Plaques von mit Streptomycin-vorbehandelten Mäusen keine erhöhte Transkription von *Mip3a* 12 h nach der Infektion beobachtet (Abb. 22C, D und E).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem signifikant zur Ansammlung von

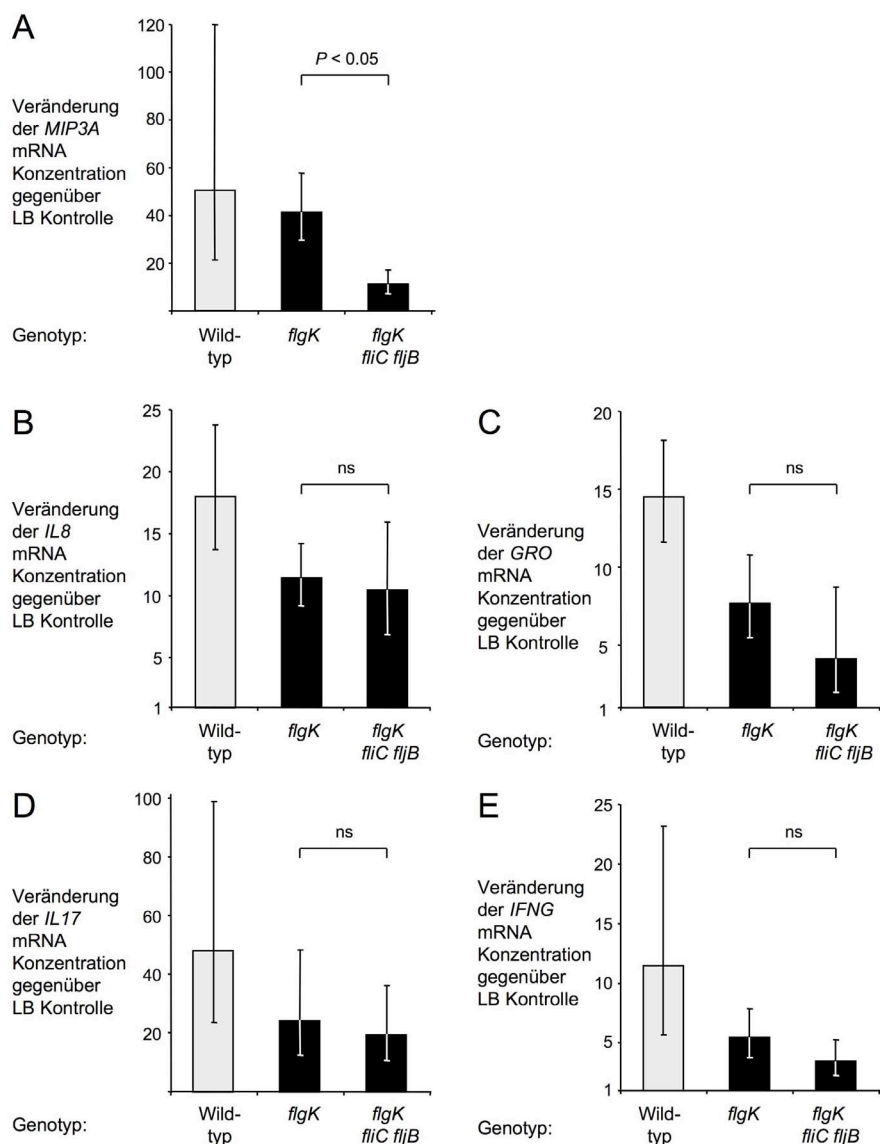


Abb. 25: Änderung der relativen Expression von *MIP3A* (A), *IL8* (B), *GRO* (C), *IL17* (D) bzw. *IFNG* (E) in der Mukosa von mit *S. Typhimurium* infizierten Rindern. Darmabschnitte wurden mit dem *S. Typhimurium*-Wildtyp (IR715), der *flgK*-Mutante (SW215) und der *flgK fliC fljB*-Mutante (SPN315) infiziert. Genexpression in den Gewebeproben wurde durch qRT-PCR gemessen und die Werte als Veränderung gegenüber dem mit LB behandelten, korrespondierenden Darmabschnitt berechnet worden. Der Genotyp der *S. Typhimurium*-Stämme ist unter jeder Abbildung wiedergegeben. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von 4 Tieren \pm Standardfehler. ns: nicht statistisch signifikant. Stämme, die sich nur in der Sekretion von Flagellin unterscheiden, sind durch schwarze Säulen hervorgehoben.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung des Verlages.

Flüssigkeit im Darmlumen und zur Induktion der *MIP3A* Transkription im Ileum infizierter Rinder beiträgt.

3.3.1.5. Einfluss von *tvIA* auf die Entzündungsreaktion im Ileum von Rindern

In den vorhergehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem zur Entzündungsreaktion beiträgt. Da *tvIA* die Expression von Flagellin reprimiert, sollte die Hypothese getestet werden, dass *tvIA* die Stärke der Entzündungsreaktion in der Mukosa von Rindern durch reduzierte Sekretion von Flagellin mindert. Dazu wurden Darmabschnitte mit dem Wildtyp bzw. einem *S. Typhimurium*-Stamm infiziert, der das *tvIA*-Gen exprimiert. Da *tvIA* das Invasions-assoziierte T3SS-1 *in vitro* reguliert und so durch verminderte Gewebeinvasion den Entzündungsprozess beeinflussen könnte, wurde die Anzahl von KBE im Gewebe wie in Kapitel 3.3.1.4. beschrieben bestimmt. *In vivo* wurde die Invasivität kaum durch *tvIA* beeinflusst ($P > 0,05$) (Abb. 26A). Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass *tvIA* im Darmlumen als Folge der Osmolarität nicht exprimiert wird (siehe Kapitel 4.6.). Zur Analyse der Wirtsantwort wurde die Ansammlung von Flüssigkeit im Darmlumen 2 h nach der Infektion gemessen und mit der des Wildtyps verglichen (Abb. 26B). Der *tvIA*-exprimierende Stamm (SW474) induzierte eine geringere Flüssigkeitsansammlung (50 %) als der Wildtyp. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,06$).

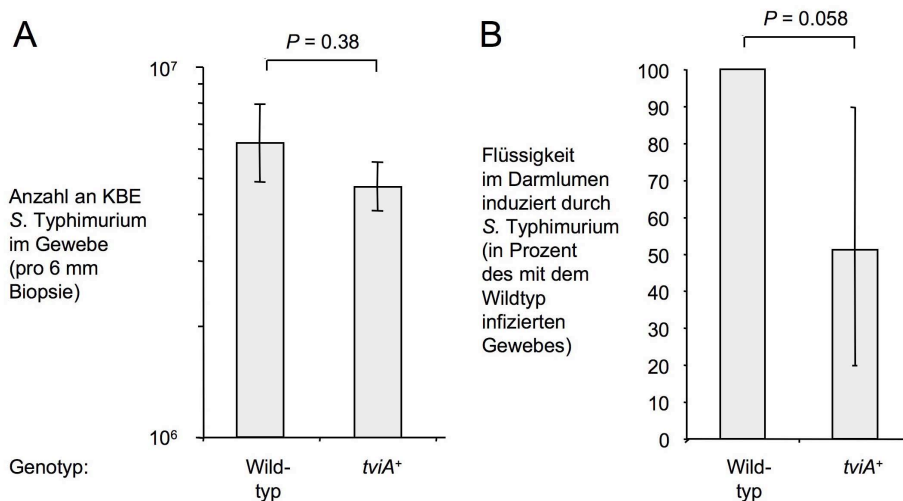


Abb. 26: Beitrag von *tvIA* auf die Invasivität und die Flüssigkeitsansammlung in infizierten Rinder-Darmabschnitten. Darmabschnitte wurden mit dem Wildtyp (IR715) und einer *tvIA*-exprimierenden Mutante (SW474) infiziert. (A) Invasivität der *S. Typhimurium*-Stämme *in vivo*. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde durch Behandlung der 6 mm Biopsien mit Gentamycin und Kultivierung von Proben des Gewebehomogenisats auf Selektivmedium bestimmt. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von 4 Tieren \pm Standardfehler. (B) Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen ausgelöst durch *S. Typhimurium*. Die dargestellten Werte sind die geometrischen Mittel von 3 Tieren \pm Standardfehler.

4. Diskussion

4.1. Eingliederung von TviA in das RcsCDB-Phosphorelay-System

Die Biosynthese von extrazellulären Polysaccharidkapseln in Enterobacteriaceae wie *E. coli*, *S. enterica*, *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* und *Erwinia* spp. wird durch Homologe des RcsCDB-Phosphorelay-Systems reguliert (Erickson & Detweiler, 2006, Majdalani & Gottesman, 2005). Die Ausbildung von Homodimeren erhöht die Aktivität des Antwortregulators RcsB. Hilfsproteine, die selbst nicht durch die Histidinkinase RcsC bzw. die Histidinphosphotransferase RcsD aktiviert werden, können Heterodimere mit RcsB bilden und so die Rekrutierung der RNA-Polymerase beeinflussen (Majdalani & Gottesman, 2005). In *E. coli* und *S. Typhimurium* wird diese Aufgabe durch das Hilfsprotein RcsA erfüllt. RcsA ist ein Aktivator der *cps*-Gene, die zur Biosynthese des Polysaccharids Colansäure benötigt werden (Wehland & Bernhard, 2000, Mouslim *et al.*, 2003, Costa *et al.*, 2003). Die Verfügbarkeit von RcsA wird durch die Protease Lon kontrolliert. In *Klebsiella pneumoniae* wird die Biosynthese der K2 Kapsel durch das plasmid-kodierte Hilfsprotein RmpA reguliert und kann funktionell RcsA ersetzen (Vasselon *et al.*, 1991, Nassif *et al.*, 1989a, Nassif *et al.*, 1989b, Wacharotayankun *et al.*, 1992). In *S. Typhi* aktiviert RcsB zusammen mit dem Hilfsprotein TviA die Transkription der Biosynthesegene des Vi-Antigens (Virlogeux *et al.*, 1996).

In *S. Typhimurium* reprimiert RcsB die Expression von Genen des Invasions-assoziierten T3SS-1 (Lin *et al.*, 2008) und des Flagella-Regulon (Wang *et al.*, 2007). Konstitutive Aktivierung des RcsCDB-Phosphorelay-Systems vermindert die Virulenz von *S. Typhimurium* in Mäusen (Mouslim *et al.*, 2004). Das RcsCDB-Phosphorelay-System ist in die Osmoregulation von Flagellen und des T3SS-1, die in dieser Ausprägung nur in *S. Typhi* zu beobachten ist, involviert. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass das RcsCDB-Phosphorelay-System in *S. Typhi* für die unterschiedliche Regulation dieser Virulenzfaktoren im Vergleich zu *S. Typhimurium* verantwortlich ist. Da die Aminosäuresequenzen des RcsCDB-Phosphorelay-System in diesen beiden Serotypen zu mehr als 99 % identisch sind (McClelland *et al.*, 2001, Deng *et al.*, 2003), wurde der Einfluss des *S. Typhi* spezifische Gens *tviA* auf die Expression von Virulenzfaktoren näher untersucht.

Durch Vergleich von Expressionsprofilen wurden Gene, deren Transkription durch RcsB bzw. TviA reguliert wurde, identifiziert. Ein Arbeitsmodell des regulatorischen Netzwerks ist in Abb. 27 dargestellt. Die Biosynthesegene des Vi-

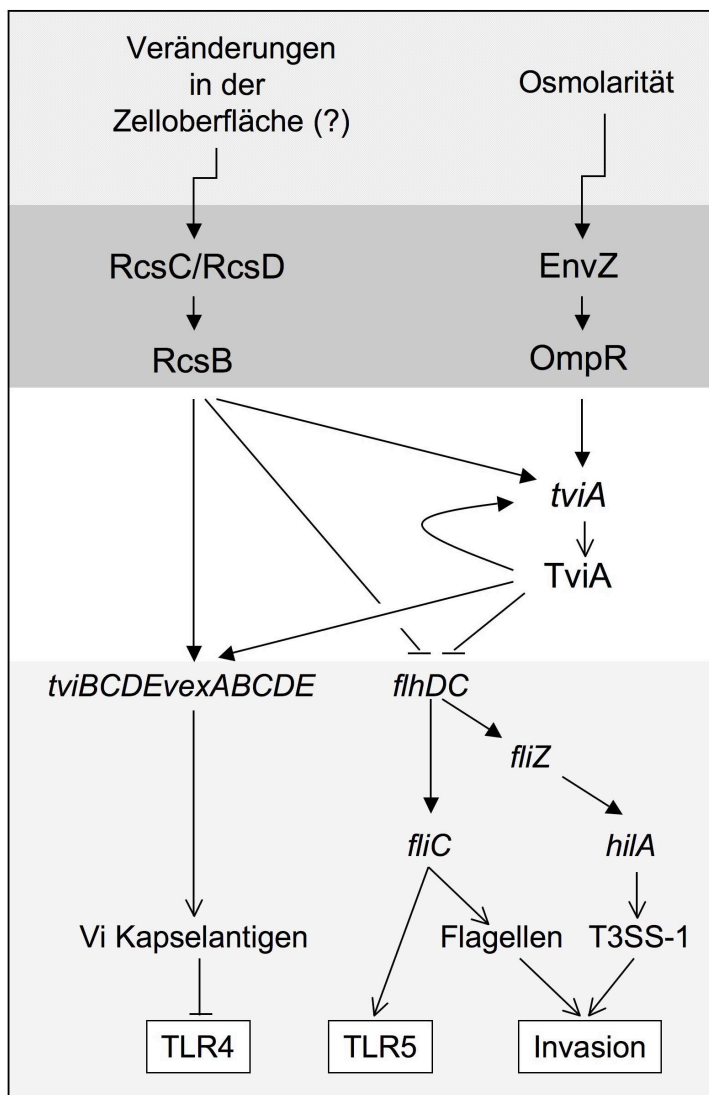


Abb. 27: Schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerks von TviA. Details siehe Text. Nicht gezeigt ist die direkte Interaktion von TviA und RcsB.

Antigens (*viaB*-Operon), des Flagella-Regulons und des Invasion-assoziierten T3SS-1 wurden sowohl durch RcsB als auch TviA reguliert. Die Regulation des zentralen Regulators der Geißelbiosynthese *flhDC* durch TviA und RcsB beeinflusste die Beweglichkeit und das Invasionsverhalten gegenüber menschlichen Epithelzellen entscheidend. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass TviA und RcsB durch *flhDC* auf andere Ziele wirken, wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass Mutation von *flhDC* in *S. Typhimurium* zu einem vergleichbaren Genexpressionsprofil wie das von RcsB und TviA führt (Frye *et al.*, 2006). In *S. Typhimurium* wird die Transkription von *flhDC* durch RcsB zusammen mit dem Hilfsprotein RcsA kontrolliert (Cano *et al.*, 2002). In *S. Typhi* hingegen wird die Transkription des *viaB*-Operons durch RcsB und TviA, nicht jedoch durch RcsA, reguliert (Virlogeux *et al.*, 1996). Die Expression von Genen des T3SS-1 wird durch das FliZ-Protein aktiviert (Lucas *et al.*, 2000). Das *fliZ*-Gen ist selbst Bestandteil des Flagella-Regulons; die Transkription wird durch

FlhDC aktiviert. FlhZ aktiviert die Expression von Invasionsgenen durch die Verfügbarkeit von *hilD*, einem Aktivator des zentralen T3SS-1 Regulators *hilA* (Lin et al., 2008, Kage et al., 2008). Deshalb wird vorgeschlagen, dass TviA zusammen mit RcsB die Transkription der Gene des T3SS-1 durch die Repression von *flhDC* und *fliZ* gesteuert wird.

4.2. Osmoregulation von Virulenzfaktoren durch TviA

S. Typhi-Wildtypstämme, die in Medium mit hoher Osmolarität kultiviert werden, exprimieren Flagellenbiosynthesegene und Gene des T3SS-1 wesentlich stärker und sind deshalb wesentlich invasiver gegenüber Epithelzellen (Zhao et al., 2001, Tartera & Metcalf, 1993, Arricau et al., 1998). Die Expression des *viaB*-Operons (und *tviA*) ist optimal in Medium mit geringer Osmolarität und wird somit entgegengesetzt zu der Expression von Invasionsgenen reguliert (Pickard et al., 1994). Das EnvZ/OmpR-Zwei-Komponenten-System reagiert auf Veränderungen der Osmolarität und ist ein essentieller Aktivator des *viaB*-Operons (Pickard et al., 1994). Diese Beobachtungen führten in dieser Arbeit zu der Hypothese, dass EnvZ/OmpR durch das Hilfsprotein TviA die Beweglichkeit und die Expression von T3SS-1-Genen in *S. Typhi* reprimiert. In *S. Typhimurium* wird die Expression des T3SS-1 zwar auch durch Osmolarität reguliert, jedoch spielt das EnvZ/OmpR-Zwei-Komponenten-System keine Rolle (Galan & Curtiss, 1990). Durch Experimente mit gezielten Mutationen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Osmoregulation von *flhDC* durch TviA zusammen mit RcsB, nicht jedoch RcsB allein, ausgeübt wird. Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass der Antwortregulator RcsB Zielgene abhängig von der Osmolarität kontrolliert, dieses Verhalten jedoch durch die Verfügbarkeit von TviA bestimmt wird, die durch das Osmo-sensitive EnvZ/OmpR-System reguliert wird (Abb. 29). Da das *tviA*-Gen nicht im Genom von *S. Typhimurium* vorhanden ist, ist die Expression von Flagellen und des T3SS-1 in diesem Serotyp unabhängig von EnvZ/OmpR.

4.3. Molekulare Mechanismen der Immunevasion von *S. Typhi* vermittelt durch TviA und das Vi-Antigen

Die Epithelzellen des Ileums sind die ersten Zellen, mit denen *Salmonella* durch den Invasionsprozess in Kontakt tritt. Epithelzellen exprimieren Neutrophile-rekrutierende CXC-Chemokine während der Infektion mit *S. Typhimurium* (Zhang et al., 2003a). *In vitro* werden exprimieren polarisierte Epithelzellen den Rezeptor TLR5

auf der basolateralen Seite und werden durch Flagellin zur Sekretion von CXC-Chemokinen angeregt (Zeng et al., 2003, Uematsu et al., 2006, Gewirtz et al., 2001a). Sharma und Quadri haben gezeigt, dass das Vi-Antigen die Expression von CXC-Chemokinen durch Inaktivierung von Prohibitin verhindert (Sharma & Qadri, 2004). Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit mit Hilfe isogenetischer Mutanten getestet und gezeigt, dass der Regulator TviA und nicht das Vi-Antigen für diese Eigenschaft benötigt wird. Zusätzlich wurde demonstriert, dass TviA die Sekretion von Flagellin reprimiert und so die Aktivierung von Epithelzellen reduziert. Die Aktivierung dieser menschlichen Darmkarzinomzelllinie erfolgt unabhängig von der Funktionalität des T3SS-1, ein Faktor der zur Sekretion von IL-8 durch Epithelzellen beitragen kann (Hobbie et al., 1997). Diese Untersuchung ist der erste Bericht, der eine detaillierte Erklärung der verminderten Erkennung von *S. Typhi* durch das angeborene Immunsystem vorschlägt: *tviA* erlaubt *S. Typhi*, die Erkennung durch TLR5-exprimierende Darmepithelzellen durch reprimierte Sekretion von Flagellin zu verhindern.

Das *viaB*-Operon beeinflusst auch die Interaktion von *S. Typhi* mit anderen Zelltypen. Makrophagen, manche Dendritischen Zellen, aktivierte Epithelzellen und Neutrophile werden durch bakterielles LPS (Endotoxin) aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt durch TLR4 im Verbindung mit den Proteinen „*LPS-binding protein*“ (LBP), MD2 und CD14 (Foster & Medzhitov, 2009). Die Infektion der menschlichen Makrophagenzelllinie THP-1 mit *S. Typhi* Mutanten, die spontan die Expression des Vi-Antigens verloren hatten, führt zu einer verstärkten Sekretion von TNF- α (Hirose et al., 1997). Das Ausmaß dieser spontanen Deletion war jedoch nicht bekannt. Da SPI-7 genetisch instabil ist (Bueno et al., 2004, Nair et al., 2004), ist deshalb anzunehmen, dass die Deletion wahrscheinlich diese 134 kb große Pathogenitätsinsel umfasst. Raffatellu et al. haben gezeigt, dass das *viaB*-Operon die durch LPS/TLR4 vermittelte IL-8-Produktion in transfizierten HEK293-Zellen (Raffatellu et al., 2005a) reduziert. Diese Beobachtung kann nicht allein durch die Funktion von *tviA* erklärt werden (Wilson et al., 2008). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie wurde durch isogenetische Mutanten gezeigt, dass das Vi-Antigen (und nicht *tviA* alleine) die Erkennung von *Salmonella* durch TLR4 inhibiert (Wilson et al., 2008). Die Expression des *viaB*-Operons in *S. Typhimurium* verringert die Transkription von IL-6 und TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) in infizierten Makrophagen. In einem Tiermodell von *Salmonella*-induzierter Sepsis reduziert das Vi-Antigen die Produktion von TNF- α und iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) in der Leber. Zusammengenommen verhindert somit das *viaB*-Operon durch zwei

unterschiedliche Mechanismen die Erkennung von *S. Typhi* durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, TLR4 und TLR5.

4.4. Transfer von *tviA* überträgt die Eigenschaft der Immunevasion von *S. Typhi* teilweise auf *S. Typhimurium*

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TviA als Hilfsprotein die Eingliederung eines neuen Signals (Osmolarität) in das konservierte RcsDCB-Phosphorelay-System ermöglicht. Das *viaB*-Operon als Bestandteil von SPI-7 wurde wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben (Parkhill *et al.*, 2001). Der Transfer eines mobilen genetischen Elements (Plasmid), welches den *tviA*-Promoter und das *tviA*-Gen kodierte, führte zu einer Repression von *flhDC*, die vergleichbar mit der in *S. Typhi* war. Ähnlich wie in *S. Typhi* regulierte *tviA* die Expression von Genen des T3SS-1 und die Sekretion des Flagellins FliC. Die durch *tviA* reprimierte Sekretion reduziert die Sekretion von IL-8 durch infizierte, menschliche Epithelzellen wie sie sonst nur bei *S. Typhi* beobachtet wird. Zusammengenommen erlauben diese Beobachtungen die Schlussfolgerung, dass sich durch den Transfer eines einzigen Gens (*tviA*) einige wichtige Eigenschaften von *S. Typhi* auf *S. Typhimurium* übertragen lassen. Des Weiteren unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass der Erwerb neuer genetischer Informationen (*viaB*-Operon) und die geänderte Regulation existierender Virulenzfaktoren (Geißeln, T3SS-1) ein wichtiger Schritt in der Evolution von *S. Typhi* waren. Diese Hypothese steht im Gegensatz zu dem Dogma, dass die Wirtsanpassung von *Salmonella* Serotypen überwiegend auf die Ansammlung von Pseudogenen zurückzuführen sei (Liu *et al.*, 2007, Holt *et al.*, 2009). Es ist wahrscheinlicher, dass die Expression neuer Virulenzfaktoren bzw. die Regulation bestehender Faktoren die Pathogenese verändert haben und als Folge Gene, deren Funktion nicht mehr essentiell oder sogar hinderlich war, verloren gingen.

4.5. Einfluss von Flagellin auf das Auslösen des Entzündungsprozesses

Die reprimierte Expression von Flagellin durch *tviA* reduziert die Produktion von CXC-Chemokinen in Epithelzellen *in vitro*. Da die Experimente in Zellkultur nicht das gesamte Zusammenwirken unterschiedlicher Zelltypen der Mukosa modellieren können (Godinez *et al.*, 2008), erscheint es sinnvoll, die Auswirkungen dieses Wirkprinzips *in vivo* zu testen. Der Beitrag von Flagellen zum Auslösen von Gastroenteritis ist bereits in verschiedenen Tiermodellen untersucht worden (Schmitt

et al., 2001, Stecher et al., 2004). Dabei wurden Mutanten mit dem jeweiligen Wildtyp verglichen. Die verwendeten Mutationen sind jedoch pleiotrop, da sowohl die Beweglichkeit (vermittelt durch Flagellen) als auch die Erkennung von Flagellin durch das Immunsystem betroffen ist. In dieser Arbeit wurde eine Strategie zur Unterscheidung dieser beiden Mechanismen vorgeschlagen: der Vergleich einer unbeweglichen, Flagellin-sekretierenden Mutante mit einer unbeweglichen, nicht Flagellin-sekretierenden Mutante hinsichtlich ihrer Fähigkeit, das angeborene Immunsystem zu stimulieren, erlaubt es den Beitrag von Flagellin zu untersuchen.

In vitro wird Flagellin durch das angeborene Immunsystem durch zwei unterschiedliche Mechanismen erkannt. Zum einen kann monomeres Flagellin an TLR5 binden und auf diese Weise MyD88-abhängige Signalwege stimulieren (Gewirtz et al., 2001a, Uematsu et al., 2006). Zum anderen aktiviert in das Zytosol von Wirtszellen eingeschleustes Flagellin das Inflammasom (d.h. Caspase-1) durch den NLR IPAF (Franchi et al., 2006, Miao et al., 2006). Caspase-1 prozessiert IL-1 β und IL-18 zu der jeweils biologisch aktiven Form (Ghayur et al., 1997). Stimulation von T-Zellen mit IL-18, auch bekannt als IGIF (*interferon gamma stimulation factor*) führt zu einer Antigen-unabhängigen Sekretion von IFN- γ (Okamura et al., 1995). IL-1 β regt Makrophagen und Epithelzellen zur Produktion von CXC-Chemokinen an (Puren et al., 1998, Yoshimura et al., 1987). Durch Experimente mit Streptomycin-vorbehandelten Wildtyp und Caspase-1 *Knockout*-Mäusen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass zur Transkription von *Ifng* und der CXC-Chemokine *Kc* und *Mip2* im Caecum 12 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* Caspase-1 benötigt wird. Das heißt, das Inflammasom wird *in vivo* durch *S. Typhimurium* aktiviert. Obwohl diese Aktivierung *in vitro* durch Flagellin erfolgen kann (Franchi et al., 2006, Miao et al., 2006), konnte in dem verwendeten Tiermodell kein Einfluss von Flagellin festgestellt werden. Möglicherweise sind andere NLRs und bakterielle Liganden an diesem Prozess *in vivo* beteiligt.

Die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem trug hingegen zur Flüssigkeitsansammlung in Darmabschnitten (*ligated ileal loops*) und zur verstärkten Transkription von *MIP3A* in der Mukosa von Rindern 2 h nach der Infektion mit *S. Typhimurium* bei. In Übereinstimmung mit der Literatur (Gewirtz et al., 2001a) wurde *in vitro* die Expression von *MIP3A* in T84-Epithelzellen als Folge der Stimulation von TLR5 durch Flagellin beobachtet. Obwohl diese Experimente keine Kausalzusammenhang zeigen, stehen sie jedoch im Einklang mit der Hypothese, dass *in vivo* Flagellin die Transkription bestimmter

entzündungsfördernder Gene in Epithelzellen kurz nach der Invasion durch *S. Typhimurium* aktiviert.

In vivo wird MIP-3 α (CCL20) überwiegend durch Follikel-assoziierte Epithelzellen (FAE), die organisierte lymphatische Strukturen wie die Peyer'schen Plaques bedecken, exprimiert (Fujie *et al.*, 2001). MIP-3 α ist der einzig bekannte Chemokin-Ligand des Rezeptors CCR6. CCR6 wird sowohl von B-Zell- und T-Zell-Populationen, als auch von bestimmten Populationen Dendritischer Zellen exprimiert (Baba *et al.*, 1997, Liao *et al.*, 1997, Power *et al.*, 1997). MIP-3 α und CCR6 spielen eine Rolle in der Gewebemöostase (Cook *et al.*, 2000, Varona *et al.*, 2001). Die Expression von MIP-3 α kann jedoch durch verschiedene entzündungsfördernde Reize erhöht werden (Johanesen & Dwinell, 2006, Fujie *et al.*, 2001). Polarisierete Epithelzellen, die mit *S. Typhimurium*-Flagellin behandelt werden, zeigen eine erhöhte Expression von *MIP3A* und erlauben eine effizientere Migration von Dendritischen Zellen in Richtung Epithel (Sierro *et al.*, 2001). Im Verlauf der oralen Infektion von Mäusen mit *S. Typhimurium* wird die Einwanderung von CCR6 exprimierenden Dendritischen Zellen in die Nähe des FAEs beobachtet (Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006). Diese Rekrutierung ist eine wichtige Voraussetzung zur Aktivierung von T-Zellen (Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006). Interessanterweise erkennen etwa 50 % der *Salmonella*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die als Folge der Infektion mit *S. Typhimurium* generiert werden, Flagellin (Alaniz *et al.*, 2006). Auf der Basis dieser Studien und der hier dargelegten Experimente kann vorgeschlagen werden, dass die Flagellin-induzierte Expression von MIP-3 α zur Koordination der Immunantwort gegen *S. Typhimurium* beiträgt.

In Streptomycin-vorbehandelten Mäusen tragen Flagellen zum Auslösen des Entzündungsprozesses überwiegend durch die erhöhte Beweglichkeit der Erreger bei (Stecher *et al.*, 2008, Stecher *et al.*, 2004). Ebenso wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Beweglichkeit von *S. Typhimurium* zur Ausbildung der Entzündungsreaktion in der Mukosa von Rindern beitrug. Zusätzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Teil der Entzündungsreaktion des Ileums von Rindern durch die Erkennung von Flagellin durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems verursacht wird. Dieser Phänotyp wurde jedoch nicht in Streptomycin-vorbehandelten Mäusen beobachtet. Angesichts der Tatsache, dass die Pathogenese der *S. Typhimurium*-Infektion in Mäusen und in Rindern grundsätzlich verschieden ist (Zhang *et al.*, 2003a, Santos *et al.*, 2001b, Zhang *et al.*, 2003b), ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Orale Infektion von Kälbern mit *S. Typhimurium* führt zu einer auf den Darm beschränkten eitrigen Entzündung (Tsolis

et al., 1999a). Pathologische Veränderung des Darmgewebes nach der Infektion von Streptomycin-vorbehandelten Mäusen mit *S. Typhimurium* sind auf das Caecum beschränkt (Barthel *et al.*, 2003). Außerdem findet gleichzeitig eine systemische Verbreitung der Erreger statt (Barthel *et al.*, 2003).

4.6. *TviA* koordiniert die Immunevasion von *S. Typhi*

Die Fähigkeit, die Expression von Invasionsfaktoren (Flagellen und T3SS-1) und des Vi-Antigens durch Osmolarität zu regulieren, könnte *S. Typhi* ein schnelle Umstellung während des Invasionsprozesses vom Lumen des Ileums in die Mukosa erlauben: Die hyperosmotischen Bedingungen des Darmlumen reprimieren die Expression des Vi-Antigens und *tviA*. Gleichzeitig werden Flagellen und das T3SS-1 optimal exprimiert, um eine effiziente Gebebeinvasion zu ermöglichen. Die physiologische Salzkonzentration des Gewebes könnte die Expression von *tviA* aktivieren. Als Folge würde das Vi-Antigen exprimiert werden und die Expression der nicht mehr benötigten Invasionsfaktoren reprimiert werden. In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass sowohl Flagellen als auch das T3SS-1 wichtige Faktoren sind, die zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems und somit zum Entzündungsprozess im Darmtrakt beitragen (Santos *et al.*, 2001b, Schmitt *et al.*, 2001, Galan & Curtiss, 1989, Stecher *et al.*, 2004, Barthel *et al.*, 2003). Die Repression dieser Faktoren nach dem Eindringen in das Gewebe könnte die Erkennung durch das Immunsystem reduzieren. Zusätzlich verhindert das Vi-Antigen die Erkennung durch TLR4 und die Phagozytose durch Makrophagen und Denritische Zellen (Looney & Steigbigel, 1986, Wilson *et al.*, 2008). Im Einklang mit diesen Überlegungen steht die Beobachtung, dass die Expression des *viaB*-Operon die Entzündungsreaktion in der Mukosa von mit *Salmonella* infizierten Rindern und Streptomycin-vorbehandelten Mäuse abschwächt (Raffatellu *et al.*, 2007, Haneda *et al.*, 2009). Die Expression des *tviA*-Gens in *S. Typhimurium* reduzierte die Flüssigkeitsansammlung in infizierten Darmabschnitten um 50 %. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($P = 0,06$) und es müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Des Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob weitere Mechanismen, die nicht von Flagellin abhängen (z.B. T3SS-1), zu diesem Phänotyp beitragen.

Die Funktionen des *viaB*-Operons liefern eine gute Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Pathogenese von *S. Typhi* und *S. Typhimurium*: Nach der Invasion des Ileums durch *S. Typhimurium* wird das angeborene Immunsystem aktiviert und es kommt zu einer entzündlichen Reaktion, die durch die Einwanderung

von Neutrophilen und die verstärkte Sekretion antimikrobieller Substanzen (Lipocalin-2, Defensine, etc) gekennzeichnet ist (Tsolis et al., 2008, Raffatellu et al., 2009, Raffatellu et al., 2007). Neutrophile stellen einen Bestandteil der zellulären Barriere gegen die systemische Verbreitung von *Salmonella* dar (Karim et al., 1991). *S. Typhimurium* nutzt diesen Entzündungsprozess aus, um die normale Darmflora zu reduzieren und um selbst in größeren Mengen ausgeschieden zu werden (Stecher et al., 2007, Ackermann et al., 2008). Die unzureichende Erkennung von *S. Typhi* durch das angeborene Immunsystem wird durch die Funktion des *viaB*-Operons, die Aktivierung TLR4 und TLR5 zu reduzieren, erreicht. Folglich kommt es nur zu einer begrenzten Rekrutierung von Neutrophilen. Dies erlaubt die primäre systemische Verbreitung in immunkompetenten Menschen, eine charakteristische Eigenschaft der Pathogenese von *S. Typhi*.

5. Zusammenfassung

Die orale Infektion mit enteritischen Salmonellen wie z. B. *S. Typhimurium* führt in immunkompetenten Patienten zu einer lokal begrenzten Entzündung des Ileums und Kolons, die sich durch die Einwanderung von Neutrophilen in die Mukosa und das Darmlumen (eitrige Entzündung) auszeichnet. Im Gegensatz dazu verursachen typhöse Salmonellen wie *S. Typhi* eine Allgemeininfektion (*Typhus abdominalis*), bei der nur etwa ein Drittel aller Patienten im späteren Verlauf Durchfallssymptome mit neutrophilarmen Infiltraten entwickeln. Das *tviABCDEvexABCDE* (*viaB*)-Operon ermöglicht die Expression des Vi-Antigens und ist eine DANN-Region, die im Chromosom von *S. Typhi*, aber nicht von *S. Typhimurium* vorhanden ist. Das *viaB*-Operons verhindert die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) 4 bzw. 5 des angeborenen Immunsystems und trägt so zur Immunevasion bei. Der genaue molekulare Mechanismus dieser Immunevasion war jedoch bisher unbekannt. Die Expression des *viaB*-Operons wird durch die Zwei-Komponenten-Systeme EnvZ/OmpR und RcsBCD und das mit dem Antwortregulator RcsB interagierende Hilfsprotein TviA (kodiert durch das erste Gen des *viaB*-Operons) reguliert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss des *S. Typhi*-spezifischen Hilfsproteins TviA auf die Immunevasion von *S. Typhi* untersucht. Durch Vergleich von Genexpressionsprofilen wurde gezeigt, dass sowohl das Invasions-assoziierte Typ-3-Sekretionssystem (T3SS-1) als auch das Flagella-Regulon durch TviA und RcsB reprimiert wird. Die Repression von Invasionsgenen durch TviA wird durch die Regulatoren des Flagella-Regulons FliHDC und FliZ ausgeübt. Im Gegensatz zu früheren Studien wurde hier zum ersten Mal experimentell belegt, dass die für *S. Typhi* charakteristische Osmoregulation der Beweglichkeit und Invasivität durch die Regulation von TviA (wahrscheinlich durch das osmo-sensitive Zwei-Komponentensystem EnvZ/OmpR), und nicht durch RcsB, vermittelt wird. In menschlichen Darmepithelzellen, die *in vitro* mit *S. Typhi* infiziert wurden, reduzierte TviA die Transkription und Sekretion des CXC-Chemokins IL-8 durch reprimierte Expression des TLR5-Liganden Flagellin. Die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem wurde in zwei Tiermodellen untersucht. In Streptomycin-vorbehandelten Mäusen als auch in Rindern trugen Flagellen (Beweglichkeit) zur Gewebeinvasion bei. In der Mukosa von Rindern führte die Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem zur erhöhten Transkription des CC-Chemokines MIP-3 α und zur Flüssigkeitsansammlung im Darmlumen. Zusätzlich zu diesem möglichen Mechanismus verhindert das Vi-Kapselantigen die Erkennung von LPS durch TLR4. Zusammengefasst unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass TviA

durch die Koordination der Expression des T3SS-1, des Flagella-Regulons und des Vi-Antigens zur Immunevasion von *S. Typhi* beiträgt und damit der Erwerb des *viaB*-Operons ein entscheidender Schritt in der Evolution von *S. Typhi* dargestellt haben muss. Des Weiteren unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass nicht nur der Erwerb (horizontaler Gentransfer) oder Verlust (Ansammlung von Pseudogenen) von Virulenzfaktoren, sondern die Regulation bereits existierender Faktoren eine entscheidende Rolle in der Wirtsanpassung von *S. Typhi* spielt.

6. Literaturverzeichnis

- (2005) 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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**: 519-520.
- Ackermann, M., B. Stecher, N. E. Freed, P. Songhet, W. D. Hardt & M. Doebeli, (2008) Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* **454**: 987-990.
- Ahmer, B. M., J. van Reeuwijk, P. R. Watson, T. S. Wallis & F. Heffron, (1999) *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Molecular microbiology* **31**: 971-982.
- Alaniz, R. C., L. A. Cummings, M. A. Bergman, S. L. Rassouljian-Barrett & B. T. Cookson, (2006) *Salmonella typhimurium* coordinately regulates FlhC location and reduces dendritic cell activation and antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J Immunol* **177**: 3983-3993.
- Aldridge, P., J. Karlinsey & K. T. Hughes, (2003) The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL. *Molecular microbiology* **49**: 1333-1345.
- Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey & M. Y. Popoff, (1998) The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Molecular microbiology* **29**: 835-850.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl, (1994) Current Protocols in Molecular Biology. New York: J. Wiley & Sons.
- Baba, M., T. Imai, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, K. Hieshima, H. Nomiyama & O. Yoshie, (1997) Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *The Journal of biological chemistry* **272**: 14893-14898.
- Bajaj, V., C. Hwang & C. A. Lee, (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Molecular microbiology* **18**: 715-727.
- Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Russmann & W. D. Hardt, (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and immunity* **71**: 2839-2858.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, P. J. Valentine, T. A. Ficht & F. Heffron, (1997) Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infection and immunity* **65**: 2254-2259.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, A. W. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic & F. Heffron, (1996) Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*. *Gene* **183**: 207-213.
- Baxter, M. A., T. F. Fahlen, R. L. Wilson & B. D. Jones, (2003) *HilE* interacts with *HilD* and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infection and immunity* **71**: 1295-1305.
- Ben-Dor, A., R. Shamir & Z. Yakhini, (1999) Clustering gene expression patterns. *J Comput Biol* **6**: 281-297.
- Bishop, A., D. House, T. Perkins, S. Baker, R. A. Kingsley & G. Dougan, (2008) Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells:

- roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* **154**: 1914-1926.
- Boddicker, J. D., B. M. Knosp & B. D. Jones, (2003) Transcription of the Salmonella invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *Journal of bacteriology* **185**: 525-533.
- Bohez, L., R. Ducatelle, F. Pasmans, N. Botteldoorn, F. Haesebrouck & F. Van Immerseel, (2006) Salmonella enterica serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. *Veterinary microbiology* **116**: 202-210.
- Bueno, S. M., C. A. Santiviago, A. A. Murillo, J. A. Fuentes, A. N. Trombert, P. I. Rodas, P. Youderian & G. C. Mora, (2004) Precise excision of the large pathogenicity island, SPI7, in Salmonella enterica serovar Typhi. *Journal of bacteriology* **186**: 3202-3213.
- Cano, D. A., G. Dominguez-Bernal, A. Tierrez, F. Garcia-Del Portillo & J. Casadesus, (2002) Regulation of capsule synthesis and cell motility in Salmonella enterica by the essential gene *igaA*. *Genetics* **162**: 1513-1523.
- Chilcott, G. S. & K. T. Hughes, (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.
- Cleveland, W. S., (1979) Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Amer. Stat. Assoc.* **74**: 829-836.
- Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp & S. A. Lira, (2000) CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**: 495-503.
- Costa, C. S., M. J. Pettinari, B. S. Mendez & D. N. Anton, (2003) Null mutations in the essential gene *yrfF* (*mucM*) are not lethal in *rcsB*, *yojN* or *rscC* strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* **222**: 25-32.
- Day, D. W., B. K. Mandal & B. C. Morson, (1978) The rectal biopsy appearances in Salmonella colitis. *Histopathology* **2**: 117-131.
- Delgado, M. A., C. Mouslim & E. A. Groisman, (2006) The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the Salmonella O-antigen chain length determinant. *Molecular microbiology* **60**: 39-50.
- Deng, W., S. R. Liou, G. Plunkett, 3rd, G. F. Mayhew, D. J. Rose, V. Burland, V. Kodoyianni, D. C. Schwartz & F. R. Blattner, (2003) Comparative genomics of Salmonella enterica serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *Journal of bacteriology* **185**: 2330-2337.
- Eckmann, L., M. F. Kagnoff & J. Fierer, (1993) Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infection and immunity* **61**: 4569-4574.
- Ellermeier, C. D., J. R. Ellermeier & J. M. Schlauch, (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* **57**: 691-705.
- Erickson, K. D. & C. S. Detweiler, (2006) The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent Salmonella infection of mice. *Molecular microbiology* **62**: 883-894.
- Felix, A. & R. M. Pitt, (1934a) A new antigen of *B. typhosus*. *Lancet* **227**: 186-191.
- Felix, A. & R. M. Pitt, (1934b) Virulence of *B. Typhosus* and resistance to O antibody. *J. Pathol. Bacteriol* **38**: 409-420.
- Foster, S. L. & R. Medzhitov, (2009) Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* **130**: 7-15.
- Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M. P. Castanie-Cornet, C. Gutierrez & K. Cam, (2003) RcsCDB His-Asp

- phosphorelay system negatively regulates the flhDC operon in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **49**: 823-832.
- Franchi, L., A. Amer, M. Body-Malapel, T. D. Kanneganti, N. Ozoren, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant & G. Nunez, (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nature immunology* **7**: 576-582.
- Frost, A. J., A. P. Bland & T. S. Wallis, (1997) The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Veterinary pathology* **34**: 369-386.
- Frye, J., J. E. Karlinsey, H. R. Felise, B. Marzolf, N. Dowidar, M. McClelland & K. T. Hughes, (2006) Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* **188**: 2233-2243.
- Fujiie, S., K. Hieshima, D. Izawa, T. Nakayama, R. Fujisawa, H. Ohyanagi & O. Yoshie, (2001) Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB [correction of NK-kappaB]. *International immunology* **13**: 1255-1263.
- Gaines, S., H. Sprinz, J. G. Tully & W. D. Tigertt, (1968) Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge, and the relationship between the numbers of bacilli and morphologic lesions. *The Journal of infectious diseases* **118**: 293-306.
- Galan, J. E., (1999) Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Current opinion in microbiology* **2**: 46-50.
- Galan, J. E. & R. Curtiss, 3rd, (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 6383-6387.
- Galan, J. E. & R. Curtiss, 3rd, (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infection and immunity* **58**: 1879-1885.
- Galan, J. E. & R. Curtiss, 3rd, (1991) Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infection and immunity* **59**: 2901-2908.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski & J. L. Madara, (2001a) Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**: 1882-1885.
- Gewirtz, A. T., P. O. Simon, Jr., C. K. Schmitt, L. J. Taylor, C. H. Hagedorn, A. D. O'Brien, A. S. Neish & J. L. Madara, (2001b) *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *The Journal of clinical investigation* **107**: 99-109.
- Ghayur, T., S. Banerjee, M. Hugunin, D. Butler, L. Herzog, A. Carter, L. Quintal, L. Sekut, R. Talanian, M. Paskind, W. Wong, R. Kamen, D. Tracey & H. Allen, (1997) Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* **386**: 619-623.
- Gillen, K. L. & K. T. Hughes, (1991) Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **173**: 2301-2310.
- Godinez, I., T. Haneda, M. Raffatellu, M. D. George, T. A. Paixao, H. G. Rolan, R. L. Santos, S. Dandekar, R. M. Tsolis & A. J. Baumler, (2008) T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infection and immunity* **76**: 2008-2017.

- Haneda, T., S. E. Winter, B. P. Butler, R. P. Wilson, C. Tukel, M. G. Winter, I. Godinez, R. M. Tsois & A. J. Baumler, (2009) The capsule encoding viaB locus reduces intestinal inflammation by a Salmonella Pathogenicity Island 1 independent mechanism. *Infection and immunity*.
- Hapfelmeier, S., K. Ehrbar, B. Stecher, M. Barthel, M. Kremer & W. D. Hardt, (2004) 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. *Infection and immunity* **72**: 795-809.
- Hapfelmeier, S., A. J. Muller, B. Stecher, P. Kaiser, M. Barthel, K. Endt, M. Eberhard, R. Robbiani, C. A. Jacobi, M. Heikenwalder, C. Kirschning, S. Jung, T. Stallmach, M. Kremer & W. D. Hardt, (2008) Microbe sampling by mucosal dendritic cells is a discrete, MyD88-independent step in DeltainvG S. Typhimurium colitis. *The Journal of experimental medicine* **205**: 437-450.
- Haraga, A., M. B. Ohlson & S. I. Miller, (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews* **6**: 53-66.
- Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo & J. E. Galan, (1998) S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.
- Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill & A. Aderem, (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
- Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton & D. W. Holden, (1995) Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science (New York, N.Y)* **269**: 400-403.
- Herikstad, H., Y. Motarjemi & R. V. Tauxe, (2002) Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology and infection* **129**: 1-8.
- Herrero, M., V. de Lorenzo & K. N. Timmis, (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* **172**: 6557-6567.
- Heyns, K. & G. Kiessling, (1967) Strukturaufklärung des Vi-antigens aus Citrobacter freundii (*E. coli*) 5396/38. *Carbohydrate Res.* **3**: 340-353.
- Hirose, K., T. Ezaki, M. Miyake, T. Li, A. Q. Khan, Y. Kawamura, H. Yokoyama & T. Takami, (1997) Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted Salmonella typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiol Lett* **147**: 259-265.
- Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis & J. E. Galan, (1997) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* **159**: 5550-5559.
- Holt, K. E., N. R. Thomson, J. Wain, G. C. Langridge, R. Hasan, Z. A. Bhutta, M. A. Quail, H. Norbertczak, D. Walker, M. Simmonds, B. White, N. Bason, K. Mungall, G. Dougan & J. Parkhill, (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of Salmonella enterica serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC genomics* **10**: 36.
- Houng, H. S., K. F. Noon, J. T. Ou & L. S. Baron, (1992) Expression of Vi antigen in Escherichia coli K-12: characterization of ViaB from Citrobacter freundii and identity of ViaA with RcsB. *Journal of bacteriology* **174**: 5910-5915.
- Hu, L., V. D. Dixit, V. de Mello-Coelho & D. D. Taub, (2004) Age-associated alterations in CXCL1 chemokine expression by murine B cells. *BMC immunology* **5**: 15.
- Iqbal, M., V. J. Philbin, G. S. Withanage, P. Wigley, R. K. Beal, M. J. Goodchild, P. Barrow, I. McConnell, D. J. Maskell, J. Young, N. Bumstead, Y. Boyd & A. L. Smith, (2005) Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with

- Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infection and immunity* **73**: 2344-2350.
- Iwasaki, A. & R. Medzhitov, (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* **5**: 987-995.
- Johanesen, P. A. & M. B. Dwinell, (2006) Flagellin-independent regulation of chemokine host defense in Campylobacter jejuni-infected intestinal epithelium. *Infection and immunity* **74**: 3437-3447.
- Johnson, E. M. & L. S. Baron, (1969) Genetic transfer of the Vi antigen from Salmonella typhosa to Escherichia coli. *Journal of bacteriology* **99**: 358-359.
- Jones, B. D., C. A. Lee & S. Falkow, (1992) Invasion by Salmonella typhimurium is affected by the direction of flagellar rotation. *Infection and immunity* **60**: 2475-2480.
- Jones, B. D., H. F. Paterson, A. Hall & S. Falkow, (1993) Salmonella typhimurium induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10390-10394.
- Jones, G. W., L. A. Richardson & D. Uhlman, (1981) The invasion of HeLa cells by Salmonella typhimurium: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *Journal of general microbiology* **127**: 351-360.
- Kage, H., A. Takaya, M. Ohya & T. Yamamoto, (2008) Coordinated regulation of expression of Salmonella pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *Journal of bacteriology* **190**: 2470-2478.
- Karim, M., W. Khan, B. Farooqi & I. Malik, (1991) Bacterial isolates in neutropenic febrile patients. *Jpma* **41**: 35-37.
- Karlinsey, J. E., S. Tanaka, V. Bettenworth, S. Yamaguchi, W. Boos, S. I. Aizawa & K. T. Hughes, (2000) Completion of the hook-basal body complex of the Salmonella typhimurium flagellum is coupled to FlgM secretion and fliC transcription. *Molecular microbiology* **37**: 1220-1231.
- Kingsley, R. A. & A. J. Baumler, (2002) Pathogenicity islands and host adaptation of Salmonella serovars. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 67-87.
- Kingsley, R. A., R. Reissbrodt, W. Rabsch, J. M. Ketley, R. M. Tsolis, P. Everest, G. Dougan, A. J. Baumler, M. Roberts & P. H. Williams, (1999) Ferrioxamine-mediated Iron(III) utilization by Salmonella enterica. *Applied and environmental microbiology* **65**: 1610-1618.
- Kraus, M. D., B. Amatya & Y. Kimula, (1999) Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. *Mod Pathol* **12**: 949-955.
- Lawes, M. & S. Maloy, (1995) MudSacl, a transposon with strong selectable and counterselectable markers: use for rapid mapping of chromosomal mutations in Salmonella typhimurium. *Journal of bacteriology* **177**: 1383-1387.
- Liao, F., R. Alderson, J. Su, S. J. Ullrich, B. L. Kreider & J. M. Farber, (1997) STRL22 is a receptor for the CC chemokine MIP-3alpha. *Biochemical and biophysical research communications* **236**: 212-217.
- Lilleengen, K., (1948) Typing of *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **77**: 2-125.
- Lin, D., C. V. Rao & J. M. Slauch, (2008) The Salmonella SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. *Journal of bacteriology* **190**: 87-97.
- Liu, W. Q., G. R. Liu, J. Q. Li, G. M. Xu, D. Qi, X. Y. He, J. Deng, F. M. Zhang, R. N. Johnston & S. L. Liu, (2007) Diverse genome structures of Salmonella paratyphi C. *BMC genomics* **8**: 290.
- Looney, R. J. & R. T. Steigbigel, (1986) Role of the Vi antigen of Salmonella typhi in resistance to host defense in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **108**: 506-516.

- Lucas, R. L., C. P. Lostroh, C. C. DiRusso, M. P. Spector, B. L. Wanner & C. A. Lee, (2000) Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology* **182**: 1872-1882.
- Macnab, R. M., (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et biophysica acta* **1694**: 207-217.
- Majdalani, N. & S. Gottesman, (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annual review of microbiology* **59**: 379-405.
- Mayfield, C. I. & W. E. Inniss, (1977) A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Canadian journal of microbiology* **23**: 1311-1313.
- McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R. K. Wilson, (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852-856.
- McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller & J. L. Madara, (1993) *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *The Journal of cell biology* **123**: 895-907.
- McGovern, V. J. & L. J. Slavutin, (1979) Pathology of salmonella colitis. *The American journal of surgical pathology* **3**: 483-490.
- Meade, K. G., E. Gormley, M. B. Doyle, T. Fitzsimons, C. O'Farrelly, E. Costello, J. Keane, Y. Zhao & D. E. MacHugh, (2007) Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BMC genomics* **8**: 400.
- Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller & A. Aderem, (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature immunology* **7**: 569-575.
- Miller, J. H., (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller, V. L. & J. J. Mekalanos, (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.
- Mills, S. D. & B. B. Finlay, (1994) Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. *Microbial pathogenesis* **17**: 409-423.
- Miyake, M., L. Zhao, T. Ezaki, K. Hirose, A. Q. Khan, Y. Kawamura, R. Shima, M. Kamijo, T. Masuzawa & Y. Yanagihara, (1998) Vi-deficient and nonfimbriated mutants of *Salmonella typhi* agglutinate human blood type antigens and are hyperinvasive. *FEMS Microbiol Lett* **161**: 75-82.
- Mousslim, C., M. Delgado & E. A. Groisman, (2004) Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Molecular microbiology* **54**: 386-395.
- Mousslim, C., T. Latifi & E. A. Groisman, (2003) Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated *ugd* gene. *The Journal of biological chemistry* **278**: 50588-50595.
- Mukawi, T. J., (1978) Histopathological study of typhoid perforation of the small intestines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **9**: 252-255.
- Nair, S., S. Alokam, S. Kothapalli, S. Porwollik, E. Proctor, C. Choy, M. McClelland, S. L. Liu & K. E. Sanderson, (2004) *Salmonella enterica* serovar Typhi strains from which SPI7, a 134-kilobase island with genes for Vi exopolysaccharide and other functions, has been deleted. *Journal of bacteriology* **186**: 3214-3223.

- Nassif, X., J. M. Fournier, J. Arondel & P. J. Sansonetti, (1989a) Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infection and immunity* **57**: 546-552.
- Nassif, X., N. Honore, T. Vasselon, S. T. Cole & P. J. Sansonetti, (1989b) Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular microbiology* **3**: 1349-1359.
- Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander & R. A. Young, (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1503-1508.
- Nguyen, Q. C., P. Everest, T. K. Tran, D. House, S. Murch, C. Parry, P. Connerton, V. B. Phan, S. D. To, P. Mastroeni, N. J. White, T. H. Tran, V. H. Vo, G. Dougan, J. J. Farrar & J. Wain, (2004) A clinical, microbiological, and pathological study of intestinal perforation associated with typhoid fever. *Clin Infect Dis* **39**: 61-67.
- Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon & E. A. Groisman, (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 7800-7804.
- Okamura, H., H. Tsutsi, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori & et al., (1995) Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**: 88-91.
- Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon & C. Mathieu, (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech* **14**: 33-43.
- Pace, J., M. J. Hayman & J. E. Galan, (1993) Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. *Cell* **72**: 505-514.
- Pal, D., T. Venkova-Canova, P. Srivastava & D. K. Chattoraj, (2005) Multipartite regulation of *rctB*, the replication initiator gene of *Vibrio cholerae* chromosome II. *Journal of bacteriology* **187**: 7167-7175.
- Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead & B. G. Barrell, (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**: 848-852.
- Pickard, D., J. Li, M. Roberts, D. Maskell, D. Hone, M. Levine, G. Dougan & S. Chatfield, (1994) Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella typhi*: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infection and immunity* **62**: 3984-3993.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton & B. Beutler, (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science (New York, N.Y)* **282**: 2085-2088.
- Power, C. A., D. J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A. E. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani & T. N. Wells, (1997) Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **186**: 825-835.
- Prentki, P. & H. M. Krisch, (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313.

- Promponas, V. J., A. J. Enright, S. Tsoka, D. P. Kreil, C. Leroy, S. Hamodrakas, C. Sander & C. A. Ouzounis, (2000) CAST: an iterative algorithm for the complexity analysis of sequence tracts. Complexity analysis of sequence tracts. *Bioinformatics (Oxford, England)* **16**: 915-922.
- Puren, A. J., G. Fantuzzi, Y. Gu, M. S. Su & C. A. Dinarello, (1998) Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14 $^{+}$ human blood mononuclear cells. *The Journal of clinical investigation* **101**: 711-721.
- Quackenbush, J., (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics* **32 Suppl**: 496-501.
- Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, R. Dusold, S. Rubino & A. J. Baumler, (2005a) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infection and immunity* **73**: 3367-3374.
- Raffatellu, M., M. D. George, Y. Akiyama, M. J. Hornsby, B. P. Butler, S. P. Nuccio, T. A. Paixao, H. Chu, R. L. Santos, T. Berger, T. W. Mak, R. M. Tsois, C. L. Bevins, J. V. Solnick, S. Dandekar & A. J. Bäumler, (2009) Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. *Cell Host & Microbe in press*.
- Raffatellu, M., R. L. Santos, D. Chessa, R. P. Wilson, S. E. Winter, C. A. Rossetti, S. D. Lawhon, H. Chu, T. Lau, C. L. Bevins, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2007) The capsule encoding the *viaB* locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and immunity* **75**: 4342-4350.
- Raffatellu, M., Y. H. Sun, R. P. Wilson, Q. T. Tran, D. Chessa, H. L. Andrews-Polymeris, S. D. Lawhon, J. F. Figueiredo, R. M. Tsois, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2005b) Host restriction of *Salmonella enterica* serotype Typhi is not caused by functional alteration of *SipA*, *SopB*, or *SopD*. *Infection and immunity* **73**: 7817-7826.
- Rajalingam, K., C. Wunder, V. Brinkmann, Y. Churin, M. Hekman, C. Sievers, U. R. Rapp & T. Rudel, (2005) Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat Cell Biol* **7**: 837-843.
- Rappleye, C. A. & J. R. Roth, (1997) A Tn10 derivative (T-POP) for isolation of insertions with conditional (tetracycline-dependent) phenotypes. *Journal of bacteriology* **179**: 5827-5834.
- Rolan, H. G. & R. M. Tsois, (2007) Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* *virB* mutant colonization. *Infection and immunity* **75**: 2965-2973.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush & J. Quackenbush, (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**: 374-378.
- Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, D. J. Zammit, R. Ravindran, A. Srinivasan, J. R. Maxwell, T. Stoklasek, R. Yadav, I. R. Williams, X. Gu, B. A. McCormick, M. A. Pazos, A. T. Vella, L. Lefrancois, H. C. Reinecker & S. J. McSorley, (2006) CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* **24**: 623-632.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Santander, J., S. Y. Wanda, C. A. Nickerson & R. Curtiss, 3rd, (2007) Role of RpoS in fine-tuning the synthesis of Vi capsular polysaccharide in *Salmonella enterica* serotype Typhi. *Infection and immunity* **75**: 1382-1392.

- Santos, R. L., R. M. Tsolis, S. Zhang, T. A. Ficht, A. J. Baumler & L. G. Adams, (2001a) Salmonella-induced cell death is not required for enteritis in calves. *Infection and immunity* **69**: 4610-4617.
- Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsolis, A. J. Baumler & L. G. Adams, (2002) Morphologic and molecular characterization of Salmonella typhimurium infection in neonatal calves. *Veterinary pathology* **39**: 200-215.
- Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsolis, R. A. Kingsley, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2001b) Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**: 1335-1344.
- Scherle, P. A., E. A. Jones, M. F. Favata, A. J. Daulerio, M. B. Covington, S. A. Nurnberg, R. L. Magolda & J. M. Trzaskos, (1998) Inhibition of MAP kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol* **161**: 5681-5686.
- Schmitt, C. K., J. S. Ikeda, S. C. Darnell, P. R. Watson, J. Bispham, T. S. Wallis, D. L. Weinstein, E. S. Metcalf & A. D. O'Brien, (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infection and immunity* **69**: 5619-5625.
- Seo, Y. S., M. Sriariyanun, L. Wang, J. Pfeiff, J. Phetsom, Y. Lin, K. H. Jung, H. H. Chou, A. Bogdanove & P. Ronald, (2008) A two-genome microarray for the rice pathogens Xanthomonas oryzae pv. oryzae and X. oryzae pv. oryzicola and its use in the discovery of a difference in their regulation of hrp genes. *BMC microbiology* **8**: 99.
- Sharma, A. & A. Qadri, (2004) Vi polysaccharide of Salmonella typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17492-17497.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl & J. C. Sirard, (2001) Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 13722-13727.
- Simon, R., U. Priefer & A. Puhler, (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* **1**: 784-791.
- Smith, K. D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson & A. Aderem, (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology* **4**: 1247-1253.
- Snella, M. C., (1986) Production of a neutrophil chemotactic factor by endotoxin stimulated alveolar macrophages in vitro. *British journal of experimental pathology* **67**: 801-807.
- Sprinz, H., E. J. Gangarosa, M. Williams, R. B. Hornick & T. E. Woodward, (1966) Histopathology of the upper small intestines in typhoid fever. Biopsy study of experimental disease in man. *Am J Dig Dis* **11**: 615-624.
- Stecher, B., M. Barthel, M. C. Schlumberger, L. Haberli, W. Rabsch, M. Kremer & W. D. Hardt, (2008) Motility allows S. Typhimurium to benefit from the mucosal defence. *Cellular microbiology* **10**: 1166-1180.
- Stecher, B., S. Hapfelmeier, C. Muller, M. Kremer, T. Stallmach & W. D. Hardt, (2004) Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and immunity* **72**: 4138-4150.
- Stecher, B., R. Robbiani, A. W. Walker, A. M. Westendorf, M. Barthel, M. Kremer, S. Chaffron, A. J. Macpherson, J. Buer, J. Parkhill, G. Dougan, C. von Mering & W. D. Hardt, (2007) Salmonella enterica serovar typhimurium exploits

- inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**: 2177-2189.
- Stojilkovic, I., A. J. Baumler & F. Heffron, (1995) Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*: nucleotide sequence, protein expression, and mutational analysis of the *cchA cchB eutE eutJ eutG eutH* gene cluster. *Journal of bacteriology* **177**: 1357-1366.
- Stylianou, E., A. Yndestad, L. I. Sikkeland, V. Bjerkeli, J. K. Damas, T. Haug, H. G. Eiken, P. Aukrust & S. S. Froland, (2002) Effects of interferon-alpha on gene expression of chemokines and members of the tumour necrosis factor superfamily in HIV-infected patients. *Clinical and experimental immunology* **130**: 279-285.
- Sun, Y. H., H. G. Rolan & R. M. Tsolis, (2007) Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *The Journal of biological chemistry* **282**: 33897-33901.
- Suzuki, T., T. Iino, T. Horiguchi & S. Yamaguchi, (1978) Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **133**: 904-915.
- Takeda, K. & S. Akira, (2007) Toll-like receptors. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al]* **Chapter 14**: Unit 14 12.
- Tartera, C. & E. S. Metcalf, (1993) Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infection and immunity* **61**: 3084-3089.
- Tindall, B. J., P. A. Grimont, G. M. Garrity & J. P. Euzeby, (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **55**: 521-524.
- Tsolis, R. M., L. G. Adams, T. A. Ficht & A. J. Baumler, (1999a) Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infection and immunity* **67**: 4879-4885.
- Tsolis, R. M., R. A. Kingsley, S. M. Townsend, T. A. Ficht, L. G. Adams & A. J. Baumler, (1999b) Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other *Salmonella* infections. *Advances in experimental medicine and biology* **473**: 261-274.
- Tsolis, R. M., G. M. Young, J. V. Solnick & A. J. Baumler, (2008) From bench to bedside: stealth of enteroinvasive pathogens. *Nature reviews* **6**: 883-892.
- Tukel, C., M. Raffatellu, D. Chessa, R. P. Wilson, M. Akcelik & A. J. Baumler, (2006) Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS immunology and medical microbiology* **46**: 320-329.
- Uematsu, S., M. H. Jang, N. Chevrier, Z. Guo, Y. Kumagai, M. Yamamoto, H. Kato, N. Sougawa, H. Matsui, H. Kuwata, H. Hemmi, C. Coban, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Takeuchi, M. Miyasaka, K. Takeda & S. Akira, (2006) Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nature immunology* **7**: 868-874.
- Varona, R., R. Villares, L. Carramolino, I. Goya, A. Zaballos, J. Gutierrez, M. Torres, A. C. Martinez & G. Marquez, (2001) CCR6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *The Journal of clinical investigation* **107**: R37-45.
- Vasselon, T., P. J. Sansonetti & X. Nassif, (1991) Nucleotide sequence of *rmpB*, a *Klebsiella pneumoniae* gene that positively controls, colanic biosynthesis in *Escherichia coli*. *Research in microbiology* **142**: 47-54.
- Vijay-Kumar, M., H. Wu, R. Jones, G. Grant, B. Babbin, T. P. King, D. Kelly, A. T. Gewirtz & A. S. Neish, (2006) Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *The American journal of pathology* **169**: 1686-1700.
- Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J. O. Lee & M. Y. Popoff, (1996) Characterization of the *rcsA* and *rcsB* genes from *Salmonella typhi*: *rcsB*

- through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *Journal of bacteriology* **178**: 1691-1698.
- Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon & M. Y. Popoff, (1995) Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* **141 (Pt 12)**: 3039-3047.
- Voetsch, A. C., T. J. Van Gilder, F. J. Angulo, M. M. Farley, S. Shallow, R. Marcus, P. R. Cieslak, V. C. Deneen & R. V. Tauxe, (2004) FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* **38 Suppl 3**: S127-134.
- Wacharotayankun, R., Y. Arakawa, M. Ohta, T. Hasegawa, M. Mori, T. Horii & N. Kato, (1992) Involvement of *rcsB* in *Klebsiella K2* capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **174**: 1063-1067.
- Wain, J., D. House, A. Zafar, S. Baker, S. Nair, C. Kidgell, Z. Bhutta, G. Dougan & R. Hasan, (2005) Vi antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *Journal of clinical microbiology* **43**: 1158-1165.
- Wang, Q., Y. Zhao, M. McClelland & R. M. Harshey, (2007) The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *Journal of bacteriology* **189**: 8447-8457.
- Wang, R. F. & S. R. Kushner, (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.
- Waterman, S. R. & D. W. Holden, (2003) Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular microbiology* **5**: 501-511.
- Wehland, M. & F. Bernhard, (2000) The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *The Journal of biological chemistry* **275**: 7013-7020.
- Weil, E. & A. Felix, (1920) Ueber den Doppeltypus der Rezeptoren in der Typhus-Paratyphusgruppe. *Zeitschr. Immunitaetsforsch.* **29**.
- West, N. P., P. Sansonetti, J. Mounier, R. M. Exley, C. Parsot, S. Guadagnini, M. C. Prevost, A. Prochnicka-Chalufour, M. Delepierre, M. Tanguy & C. M. Tang, (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science (New York, N.Y)* **307**: 1313-1317.
- Westrell, T., N. Ciampa, F. Boelaert, B. Helwigh, H. Korsgaard, M. Chriel, A. Ammon & P. Makela, (2009) Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* **14**.
- Wilson, R. P., M. Raffatellu, D. Chessa, S. E. Winter, C. Tukel & A. J. Baumler, (2008) The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular microbiology* **10**: 876-890.
- Winter, S. E., M. Raffatellu, R. P. Wilson, H. Russmann & A. J. Baumler, (2008) The *Salmonella enterica* serotype Typhi regulator *TviA* reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion. *Cellular microbiology* **10**: 247-261.
- Winter, S. E., P. Thiennimitr, S. P. Nuccio, T. Haneda, M. G. Winter, R. P. Wilson, J. M. Russell, T. Henry, Q. T. Tran, S. D. Lawhon, G. Gomez, C. L. Bevins, H. Russmann, D. M. Monack, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2009a) Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection. *Infection and immunity* **77**: 1904-1916.
- Winter, S. E., M. G. Winter, P. Thiennimitr, V. A. Gerriets, H. Rüssmann & A. J. Baumler, (2009b) The *TviA* auxiliary protein makes the *Salmonella enterica* serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *submitted*.

-
- Wozniak, C. E. & K. T. Hughes, (2008) Genetic dissection of the consensus sequence for the class 2 and class 3 flagellar promoters. *Journal of molecular biology* **379**: 936-952.
- Yang, I. V., E. Chen, J. P. Hasseman, W. Liang, B. C. Frank, S. Wang, V. Sharov, A. I. Saeed, J. White, J. Li, N. H. Lee, T. J. Yeatman & J. Quackenbush, (2002) Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome biology* **3**: research0062.
- Yoshimura, T., K. Matsushima, J. J. Oppenheim & E. J. Leonard, (1987) Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* **139**: 788-793.
- Yu, Y., H. Zeng, S. Lyons, A. Carlson, D. Merlin, A. S. Neish & A. T. Gewirtz, (2003) TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G282-290.
- Zeng, H., A. Q. Carlson, Y. Guo, Y. Yu, L. S. Collier-Hyams, J. L. Madara, A. T. Gewirtz & A. S. Neish, (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. *J Immunol* **171**: 3668-3674.
- Zhang, S., L. G. Adams, J. Nunes, S. Khare, R. M. Tsois & A. J. Baumler, (2003a) Secreted effector proteins of Salmonella enterica serotype typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. *Infection and immunity* **71**: 4795-4803.
- Zhang, S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsois, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2003b) Molecular pathogenesis of Salmonella enterica serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infection and immunity* **71**: 1-12.
- Zhang, S., R. L. Santos, R. M. Tsois, S. Stender, W. D. Hardt, A. J. Bäumler & L. G. Adams, (2002) The Salmonella enterica serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infection and immunity* **70**: 3843-3855.
- Zhao, L., T. Ezak, Z. Y. Li, Y. Kawamura, K. Hirose & H. Watanabe, (2001) Vi-Suppressed wild strain Salmonella typhi cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. *Microbiology and immunology* **45**: 149-158.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Holger Rüssmann für die Vergabe des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, viele hilfreiche Diskussionen und die exzellente Betreuung. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, der als Institutsleiter ein hervorragendes Arbeitsumfeld geschaffen hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas J. Bäuml (UC Davis) für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die außerordentliche Betreuung und die vielen, interessanten Diskussionen.

Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Renée M. Tsois (UC Davis) für ihre Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Vorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. L. Garry Adams (Texas A&M University), Prof. Dr. Denise Monack (Stanford University), Prof. Dr. Charles L. Bevins (UC Davis) und Prof. Dr. Helene Andrews-Polymenis (Texas A&M University) für die gute Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zur Erkennung von Flagellin durch das angeborene Immunsystem bedanken.

Mein Dank gebührt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Dr. Bäuml, Dr. Tsois und Dr. Rüssmann, die mir mit technischen und wissenschaftlichen Ratschlägen stets zur Seite standen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Klaus Panthel, Sean-Paul Nuccio, Dr. Parameth Thiennimitr, Valerie Gerriets, R. Paul Wilson, Dr. Takeshi Haneda, Dr. Manuela Raffatellu, Ivan Godinez, Dr. Cagla Tükel, Dr. Daniela Chessa, Dr. Marijke Keestra, Dr. Torsten Sterzenbach, Jess Nishimori, Yuko Akiyama, Alanna O'Leary, Andreas den Hartigh, Dr. Tena Rolan, Dr. Dr. Yao-Hui Sun, Maarten de Jong, Dr. Brian Butler, Vydia Atluri und Joseph Russell.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit ist meiner Frau Maria Winter gewidmet, die durch ihre Diskussionsbereitschaft, ihre hilfreichen Vorschläge, die Organisation des Labors und ihre außerordentliche Geduld maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat.