

Genexpressionsanalysen der frühen angeborenen  
Immunantwort des Haushuhns induziert durch eine  
Infektion mit *Salmonella enteritidis* mit Hilfe der  
Microarray Technologie



**Ute Breithaupt**

Aus dem  
Department für Veterinärwissenschaften der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Genexpressionsanalysen der frühen angeborenen  
Immunantwort des Haushuhns induziert durch eine  
Infektion mit *Salmonella enteritidis* mit Hilfe der  
Microarray Technologie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Ute Breithaupt  
aus Bühl / Baden

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Korb

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

## **Den Versuchstieren**

Sie bringen das größte Opfer.

Tierschutzgesetz, § 1:

*„Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen.“*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>Zoonose-Problematik durch Salmonellen</b> .....	<b>17</b>
2.1.1.	Infektionsquellen .....	17
<b>2.2.</b>	<b>Salmonelleninfektion beim Geflügel</b> .....	<b>18</b>
2.2.1.	Wirtspektren und Serovare .....	18
2.2.2.	Aktuelle Lage .....	19
2.2.3.	Impfung als Präventionsmaßnahme .....	20
2.2.4.	Klinik .....	20
2.2.5.	Infektionswege .....	21
2.2.6.	Wirts-Pathogen-Interaktion .....	23
2.2.7.	Zytokine – Mediatoren der Immunantwort .....	31
2.2.8.	Unterschiede des Immunsystems von Huhn und Säuger .....	32
<b>2.3.</b>	<b>Methodik der Gentranskriptionsanalysen</b> .....	<b>34</b>
2.3.1.	Microarray .....	34
2.3.2.	qRT-PCR .....	35
<b>3.</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>Tiere und Tierhaltung</b> .....	<b>38</b>
4.1.1.	Hühner .....	38
<b>4.2.</b>	<b>Gewinnung primärer Makrophagen</b> .....	<b>38</b>
4.2.1.	Material .....	38
4.2.2.	Gewinnung von peripheren Blutleukozyten .....	39
4.2.3.	Gewinnung von Leukozyten aus Organen .....	39
<b>4.3.</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>40</b>
4.3.1.	Medien und Zusätze .....	40
4.3.2.	primäre Zellen .....	40
4.3.3.	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau .....	40
<b>4.4.</b>	<b>RNA-Präparation</b> .....	<b>41</b>
4.4.1.	Material .....	41
4.4.2.	Lysieren von Zellen .....	41
4.4.3.	Homogenisieren von Gewebe .....	42
4.4.4.	Isolation von RNA .....	42
4.4.5.	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	43
4.4.6.	Natriumacetat Fällung .....	44
4.4.7.	Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™ .....	45
<b>4.5.</b>	<b>cDNA-Synthese</b> .....	<b>45</b>

---

<b>4.6.</b>	<b>Erstellen von Primern.....</b>	<b>46</b>
4.6.1.	Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion .....	46
4.6.2.	Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion .....	46
<b>4.7.</b>	<b>Konventionelle Polymerase Kettenreaktion .....</b>	<b>47</b>
4.7.1.	Material .....	47
4.7.2.	Durchführung .....	48
<b>4.8.</b>	<b>Aufreinigung und Sequenzierung des PCR Produktes .....</b>	<b>49</b>
<b>4.9.</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese.....</b>	<b>49</b>
4.9.1.	Material .....	49
4.9.2.	Durchführung .....	50
<b>4.10.</b>	<b>Quantitative Polymerase Kettenreaktion .....</b>	<b>50</b>
4.10.1.	Material .....	52
4.10.2.	Durchführung .....	53
4.10.3.	Auswertung .....	54
<b>4.11.</b>	<b>Salmonellen .....</b>	<b>54</b>
4.11.1.	Stämme .....	55
4.11.2.	Einfrieren der Salmonellenstämme .....	55
4.11.3.	Invasionsassays .....	56
4.11.4.	Stimulation durch LPS und IFN- $\gamma$ .....	59
<b>4.12.</b>	<b>Microarrayanalysen .....</b>	<b>59</b>
4.12.1.	Agilent Microarray .....	59
4.12.2.	Custom (dt.: Kunde) array .....	60
4.12.3.	Annotation .....	60
4.12.4.	cDNA Synthese .....	61
4.12.5.	cRNA Synthese .....	62
4.12.6.	Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität .....	63
4.12.7.	Fragmentierung der cRNA .....	63
4.12.8.	Hybridisierung der Arrays .....	63
4.12.9.	Waschen und Einlesen (Scan) der Arrays .....	65
<b>4.13.</b>	<b>Software zur Auswertung der Microarrays.....</b>	<b>66</b>
4.13.1.	Auswertung durch die Agilent Feature Extraction Software .....	66
4.13.2.	Auswertung durch die Software Bioconductor „R“ v2.9.1 .....	66
4.13.3.	Auswertung durch die Software SAM .....	67
4.13.4.	Berechnung der Expressionsänderung ( <i>fold change</i> ).....	68
4.13.5.	Anwendung der Microsoft Office Access 2003 Datenbanksystem .....	69
4.13.6.	Auswertung durch die Software Pathway Express .....	69
4.13.7.	Auswertung durch die Software Expander .....	70
4.13.8.	Auswertung durch die Software MEV .....	70
<b>4.14.</b>	<b>Histologie .....</b>	<b>72</b>
4.14.1.	Material für die HE-Färbung .....	72

---

4.14.2.	Material für die Giemsa-Färbung .....	73
4.14.3.	Gewinnung von Organen und Vorbereitung für die Histologie .....	74
4.14.4.	Anfertigung der Schnitte .....	74
4.14.5.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	75
4.14.6.	Giemsa-Färbung .....	75
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>77</b>
<b>5.1.</b>	<b>Etablierung einer primären Hühnermakrophagenkultur .....</b>	<b>77</b>
5.1.1.	Zellzahl .....	77
5.1.2.	Subjektive Beurteilung der Zellmorphologie .....	78
5.1.3.	RNA-Qualität .....	79
<b>5.2.</b>	<b>Vervollständigung der Annotation des verwendeten Microarrays</b>	<b>80</b>
<b>5.3.</b>	<b><i>in vitro</i> Studien.....</b>	<b>80</b>
5.3.1.	Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$ .....	81
5.3.2.	Infektion der Kulturen mit GFP-markierten Salmonellen.....	82
5.3.3.	Weiterführende Untersuchungen zur Makrophagen-Bakterien- Interaktion.....	83
5.3.4.	Infektion einer Makrophagenkultur mit einer MOI 1 .....	85
<b>5.4.</b>	<b><i>in vitro</i> Infektionsstudie .....</b>	<b>88</b>
5.4.1.	Versuchsaufbau.....	88
5.4.2.	RNA-Isolation und -Qualität .....	89
5.4.3.	cDNA-Synthese .....	90
5.4.4.	Microarrays.....	90
5.4.5.	qRT-PCR .....	99
<b>5.5.</b>	<b><i>in vivo</i> Infektionsstudie.....</b>	<b>100</b>
5.5.1.	Versuchsaufbau.....	100
5.5.2.	Ergebnisse der bakteriologische Untersuchung .....	102
5.5.3.	RNA-Isolation und -Qualität .....	103
5.5.4.	cDNA-Synthese .....	103
5.5.5.	Microarrays.....	103
5.5.6.	qRT-PCR .....	113
5.5.7.	Analysenvergleich zwischen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Studien .....	115
5.5.8.	Histologie.....	118
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>121</b>
<b>6.1.</b>	<b>Agilent Microarray Technologie .....</b>	<b>122</b>
6.1.1.	Statistische Auswertungsmethoden.....	123
<b>6.2.</b>	<b><i>in vitro</i> Infektionsexperimente mit primären Makrophagen ...</b>	<b>124</b>
<b>6.3.</b>	<b><i>in vivo</i> Infektionsexperiment .....</b>	<b>127</b>
6.3.1.	Wahl der Probenentnahmezeitpunkte.....	127
6.3.2.	Vergleich der Kolonisation und Immunreaktion in Caecum und	

---

	Caecaltonsille .....	128
<b>6.4.</b>	<b>Identifizierung von Kandidatengen</b> .....	<b>129</b>
6.4.1.	Regulation von Interleukinen während einer Salmonelleninfektion.....	130
6.4.2.	Regulation von Chemokinen während einer Salmonelleninfektion.....	131
6.4.3.	Regulation von TNF-Superfamilien Mitglieder während einer Salmonelleninfektion.....	132
6.4.4.	Regulation von Toll-like-Rezeptoren während einer Salmonelleninfektion.....	133
<b>6.5.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>133</b>
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>137</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>139</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>153</b>
10.1.	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	153
10.2.	Geräte in alphabetischer Reihenfolge .....	154
10.3.	Expressionsdaten.....	155
10.4.	Ergebnisse der Software „Pathway Express“ .....	155
10.5.	Annotationsliste.....	155
10.6.	Genlisten der in der Software generierten Cluster .....	155
10.7.	RNA-Qualität der Infektionsversuche .....	155
10.8.	Spezifische Aktivität der cRNA.....	155
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>156</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Schema einer RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform Extraktion .....	43
Abb. 2: Wirkung des interkalierenden Farbstoffes SYBR-Green .....	51
Abb. 3: Stilisierte qRT-PCR-Schmelzkurve.....	52
Abb. 4: Versuchsaufbau eines Invasionsassays.....	58
Abb. 5: Schematische Darstellung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden in die cRNA .....	62
Abb. 6: Aufbau eines Gasket-Array-Sandwich.....	65
Abb. 7: Reproduzierbarkeit der Zellzahl .....	78
Abb. 8: Morphologie von primären Makrophagen des Huhnes.....	79
Abb. 9: Expressionsmuster in der qRT-PCR ( <i>in vitro</i> ) .....	82
Abb. 10: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines <i>S. enteritidis</i> GFP infizierten Makrophagen .....	83
Abb. 11: Auswirkung unterschiedlicher Infektionsdosen (MOI).....	84
Abb. 12: Durch IFN- $\gamma$ verursachte Unterschiede der Invasivität bzw. Replikation ....	85
Abb. 13: Beurteilung der Morphologie (Phasenkontrastmikroskopie) im Verlaufe einer Infektion.....	86
Abb. 14: Beurteilung der Zellzahl (Trypanblaufärbung) im Verlaufe einer Kinetik.....	87
Abb. 15: Beurteilung der Invasion im Verlaufe einer Infektion .....	88
Abb. 16: Eines der acht Array-Scan-Bilder des <i>in vitro</i> Versuches .....	91
Abb. 17: <i>Heatmap</i> des Microarrays des <i>in vitro</i> Versuches .....	92
Abb. 18: Von der Software Expander identifiziertes signifikant reguliertes Cluster...	93
Abb. 19: Toll-like Rezeptor Signalweg des <i>in vitro</i> Experimentes.....	97
Abb. 20: bakterielle Last der Hühner zu den vier Entnahmezeitpunkten .....	103
Abb. 21: Vergleich der <i>heatmaps</i> zwischen Caecaltonsillen und Caecum .....	106
Abb. 22: <i>Heatmap</i> der Caeca (n = 5).....	107
Abb. 23: <i>Heatmap</i> der Caeca (n = 4).....	107

---

Abb. 24: <i>Heatmaps</i> der Caeca zu den einzelnen Zeitpunkte.....	108
Abb. 25: MEV-Analyse signifikant regulierter Gencluster der Caecumproben.....	110
Abb. 26: MEV-Analyse signifikant regulierter Gencluster der Caecaltonsillen.....	111
Abb. 27: in der qRT-PCR gemessene Expressionswerte des <i>in vivo</i> Experimentes in einer Graphik.....	114
Abb. 28: Vergleich der Expressionsdaten zwischen Array und qRT-PCR.....	115
Abb. 29: Verlauf einer <i>S. enteritidis</i> Infektion im Caecum des Huhnes (HE- Färbung).....	119
Abb. 30: Verlauf einer <i>S. enteritidis</i> Infektion im Caecum des Huhnes (Giemsa- Färbung).....	120

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Liste der verwendeten qRT-PCR-Primer .....	47
Tab. 2: Reaktionsbedingungen der konventionelle PCR .....	48
Tab. 3: Pipettierschema eines einzelnen Ansatzes der quantitativen PCR .....	53
Tab. 4: Reaktionsbedingungen der quantitativen PCR.....	54
Tab. 5: Probenqualität isolierter RNA des <i>in vitro</i> Versuches .....	90
Tab. 6: Vorbereitung des Microarrays: spezifische Aktivität der <i>in vitro</i> Proben .....	90
Tab. 7: Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen.....	94
Tab. 8: Gene aus den ersten drei Gruppen des signifikant regulierten Clusters.....	95
Tab. 9: Im Array gemessene Expressionswerte des <i>in vitro</i> Experimentes .....	99
Tab. 10: in der qRT-PCR bestätigte Expressionswerte des <i>in vitro</i> Experimentes .	100
Tab. 11: Anzahl der signifikant regulierten Gene des <i>in vivo</i> Versuches .....	109
Tab. 12: Anzahl der signifikant regulierten Signalwege des <i>in vivo</i> Versuches .....	112
Tab. 13: im Array gemessene Expressionsdaten des <i>in vivo</i> Experimentes.....	113
Tab. 14: Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Array Expressionsdaten.....	118

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BALT	engl.: <i>bronchus-associated lymphoid tissue</i> (Bronchus-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
BLAST	engl.: <i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CFU	engl.: <i>colony forming unit</i> (koloniebildende Einheit)
ch	engl.: <i>chicken</i> (Huhn)
ChS	engl.: <i>chicken serum</i> (Hühner Serum)
cRNA	engl.: <i>complementary RNA</i> (komplementäre RNA)
CT	Caecaltonsillen
CTP	Cytosintriphosphate
Cy3	Cyanine3
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
DC	engl.: <i>dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleid acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ECM	engl.: <i>extracellular matix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	engl.: <i>ethylendiamintetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EFSA	engl.: <i>European Food Safety Authority</i>
EST	engl.: <i>expressed sequence tag records</i>
EU	Europäische Union
FBI-Zoo	engl.: <i>food-borne zoonotic infections in humans</i>
FC	engl.: <i>fold change</i>
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FDR	engl.: <i>false discovery rate</i>
FRET	engl.: <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GC	engl.: <i>germinal center</i> (Germinales Zentrum)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HALT	engl.: <i>head-associated lymphoid tissue</i> (Kopf-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLC	engl.: <i>Hierarchical Clustering</i>
HühnSalmV	Hühner-Salmonellen-Verordnung
IF	engl.: <i>impact factor</i>
IFN	Interferon

IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
Intron	engl.: <i>intervening regions</i>
KCL	Kaliumchlorid
KEGG	engl.: <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LBP	engl.: <i>LPS binding protein</i>
LITAF	engl.: <i>lipopolysaccharide-induced TNF factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MALT	engl.: <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i> (Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
MEV	engl.: <i>multi experiment viewer</i>
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
M-Zelle	engl.: <i>microfold cell</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOAc	Natriumacetat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NPF	Neutral gepufferte Formalin Lösung
PBL	Periphere Blut Leukozyten
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Ketten Reaktion)
p.i.	lat.: <i>post infectionem</i>
PP	Peyersche Platten
ProbeID	Probe Identifikator
p-value	engl.: <i>probability-value</i> (Wahrscheinlichkeits-Wert)
QTL	engl.: <i>quantitative trait locus</i>
RNA	engl.: <i>ribonucleid acid</i> (Ribonucleinsäure)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAM	engl.: <i>significance analysis of microarrays</i>
SD	engl.: <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	engl.: <i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumduodecylsulfat)

SDS-PAGE	Natriumduodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNP	engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOTA	engl.: <i>self organizing tree algorithm</i>
SPI	Salmonellen Pathogenitätsinsel
TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TLR	engl.: <i>toll like receptor</i> (Toll-like Rezeptoren)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNFRSF	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Superfamilie
TNFSF	Tumor Nekrose Faktor Superfamilie
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
tRNA	Transfer RNA
TTSS	Typ-III-Sekretionssystem
VSN	engl.: <i>Variance Stabilization and Normalization</i>
WGA	engl.: <i>whole genome SNP arrays</i>

## 1. EINLEITUNG

Salmonellosen des Menschen gehören weltweit zu den wichtigsten Zoonosen. In Europa spielen dabei insbesondere die nicht wirtadaptierten Salmonellen eine bedeutende Rolle als Auslöser von gastro-intestinalen Erkrankungen des Menschen, die auch immer wieder zu Todesfällen führen. Geflügelfleisch und Eier sind dabei die Hauptansteckungsquellen [1].

Es existieren ca. 2500 Salmonellen Serovare, von denen beim Huhn als wirtsspezifische Serovare lediglich *S. gallinarum* und *S. pullorum* von Bedeutung sind, da sie schwere Erkrankungen in den Geflügelbeständen auslösen und zu erheblichen ökonomischen Einbußen führen können. In Deutschland wurden Erkrankungen durch diese Serovare allerdings schon seit vielen Jahren nicht mehr beobachtet. Hühner können sich jedoch auch mit nicht wirtsspezifischen Serovaren wie *S. enteritidis* und *S. typhimurium* infizieren. Das Huhn zeigt bei diesen Infektionen in der Regel keinerlei Symptome, fungiert aber über kontaminierte Lebensmittel als Infektionsquelle für den Menschen. Diese zwei genannten nicht wirtsspezifischen Serovare sind die häufigste Ursache für Salmonellosen in Deutschland [2].

Das seuchenhafte Auftreten von *S. enteritidis* nach dem Verzehr von Hühnereiern und Rohspeisen im Jahre 1992 führte 1994 zum Erlass der Hühner-Salmonellen-Verordnung (HühnSalmV). Darin sind neben Hygienemaßnahmen auch Schutzimpfungen gesetzlich festgehalten. Kommerzielle Geflügelbestände müssen seither regelmäßig geimpft werden. Diese Kontrollmaßnahmen werden heute in vielen Ländern der Europäischen Union angewandt, was zu einer signifikanten Reduktion von Salmonellosefällen geführt hat [3]. Interessanterweise ist der Wirkmechanismus der Impfstoffe bis heute völlig ungeklärt. Ebenso unverstanden ist die Reaktion des Hühnerimmunsystems auf natürliche Salmonelleninfektionen. Vielfach wird davon ausgegangen, dass die in Mausmodellen identifizierten Abwehrmechanismen auch für das Huhn gelten, wobei außer Acht gelassen wird, dass das Immunsystem der Vögel erhebliche strukturelle und funktionelle Unterschiede zu dem der Mäuse aufweist. Die Weiterentwicklung von präventiven Maßnahmen und die Entwicklung besserer Impfstoffe würden in erheblichem Maße von einem besseren Verständnis der immunologischen Reaktion auf eine Salmonelleninfektion beim Huhn profitieren.

Durch die Verfügbarkeit des Hühnergenoms [4] haben sich ganz neue Methoden zur

Analyse der Immunreaktionen ergeben. Insbesondere die Untersuchung von Genexpressionsveränderungen in infizierten Zellen und Geweben kann Aufschluss über die immunologischen Abwehrvorgänge geben. Durch die Verwendung von sogenannten Microarrays für die gleichzeitige Quantifizierung der Expressionsmuster tausender Gene, können heute in vergleichsweise kurzer Zeit umfassende Informationen zur Reaktion des Immunsystems gewonnen werden.

Ziel dieser Arbeit war es die neuen technischen Möglichkeiten im Zusammenhang mit der Salmonelleninfektion beim Huhn zu nutzen und in den gewonnenen Datensätzen Kandidatengene zu identifizieren, die zukünftig auf ihre funktionelle Bedeutung in der Kontrolle der Salmonellen untersucht werden können. Die Charakterisierung von Genen, denen eine kritische Rolle in der Abwehr von Salmonelleninfektionen zukommt, ist auch für die Tierzucht von großem Interesse. Klassische Tierzuchtexperimente haben gezeigt, dass die Selektion von *Salmonella* resistenten und empfänglichen Legehennen grundsätzlich möglich ist [5]. Marker-Gene der Resistenz könnten der modernen Tierzucht helfen, die Resistenz in den Legehennenpopulationen zu steigern und damit das Infektionsrisiko für den Menschen weiter zu reduzieren.

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1. Zoonose-Problematik durch Salmonellen**

Die Salmonellose beim Menschen ist weltweit eine der wichtigsten Zoonosen. Diese bakterielle Erkrankung ist in Deutschland meldepflichtig. Bei meldepflichtigen Krankheiten handelt es sich um übertragbare Infektionen, die nach deutschem Recht nach Erregernachweis, Infektionsverdacht, Erkrankung oder Tod eines Menschen an das Gesundheitsamt gemeldet werden müssen. Dies ist im Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen, dem sogenannten Infektionsschutzgesetz (IfSG), festgelegt. Salmonellosen stellen in den Ländern der Europäischen Union (EU) und in Deutschland nach Infektionen mit *Campylobacter* die zweithäufigste durch Lebensmittel übertragene bakterielle Erkrankung dar [1]. Allerdings sind die Zahlen der Salmonellosen beim Menschen deutlich rückläufig [3], was Präventionsmaßnahmen in Form von Impfungen von Hühnern und Hygienekontrollen zuzuschreiben ist. Darauf wird unter Punkt 2.2.2 noch ausführlicher eingegangen.

Die oral aufgenommenen Salmonellen verursachen beim Menschen eine lokale Infektion des Dünndarms und des oberen Dickdarms. Nach Eindringen in die Darmschleimhaut schädigen sie diese durch Freisetzung von Toxinen. Die durchschnittliche Inkubationszeit beträgt zwischen 12 und 72 Stunden. Daraufhin zeigt der Mensch Erbrechen und wässrigen Durchfall. Die Schwere der Symptomatik hängt dabei weniger vom Erreger ab, als vielmehr von der Dosis, der körperlichen Konstitution und dem Alter der betroffenen Person. Somit ist der Krankheitsverlauf bei alten Menschen, Säuglingen und immundefizienten Menschen sehr viel schwerwiegender. Bei diesem genannten Personenkreis kann die Infektion von schweren Komplikationen wie Sepsis, Meningitis oder einer Osteomyelitis begleitet sein und sogar zum Tode führen. In der Regel jedoch ist die Erkrankung selbstlimitierend und nach etwa ein bis vier Tagen wieder abgeklungen.

#### **2.1.1. Infektionsquellen**

Der Mensch infiziert sich mit Salmonellen vor allem durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln. Hierfür gibt es diverse Infektionsquellen, wozu unter anderem Schokolade [6], Rind- und Schweinefleisch [7], Gemüse wie Tomaten [8]

und Rukola [9], Basilikum [10], Abwasser [11], Fruchtsäfte [12], Rohmilchprodukte [13] sowie Milchpulver [14] zählen. Die häufigste Ursache für Salmonellosen beim Menschen sind allerdings vom Geflügel stammende Lebensmittel wie Eier, Eiprodukte und Hühnerfleisch [1]. Wenn nur Fleisch als mögliche Ursache miteinander verglichen wird, so werden bei Rind-, Schweine- und Rotfleisch deutlich weniger Salmonellen nachgewiesen als beim Geflügel und zudem wird bei Rind- und Schweinefleisch häufiger *S. typhimurium* und weniger *S. enteritidis* rückisoliert [15].

## 2.2. Salmonelleninfektion beim Geflügel

Bei Salmonellen sind die Wirtsspektren und die Serovare sehr breit gefächert. Wenn über Salmonelleninfektion gesprochen wird, spielt es eine bedeutende Rolle, um welche Spezies und welches Serovar es sich handelt. Außerdem ist die Tatsache, dass Hühner bei einer Infektion mit Salmonellen Serovaren, die für den Menschen von Bedeutung sind, meist klinisch inapparent bleiben, problematisch. Infizierte Tiere fallen in der Regel nicht auf, wodurch die Gefahr besteht, dass Salmonellen unbemerkt in die Lebensmittelkette gelangen.

### 2.2.1. Wirtsspektren und Serovare

Salmonellen gehören zu der Familie der Enterobakterien. Es handelt sich um gramnegative, peritrich begeißelte Stäbchen, von 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 µm Größe. Sie sind vorwiegend aktiv beweglich, fakultativ anaerob und besitzen die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben. Ihr Auftreten ist bei vielen Vogelarten, Kriechtieren und Säugetieren inklusive des Menschen beschrieben.

Laut gültiger Taxonomie werden Bakterien der Gattung *Salmonella* in zwei Spezies (*Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*) sowie sechs Subspezies (nur *Salmonella enterica*) untergliedert. Beide Spezies können für Mensch und Tier pathogen sein. Die für den Menschen bedeutsamen Salmonellen befinden sich im Subgenus I (*Salmonella enterica ssp. enterica*).

Es gibt ca. 2 500 Salmonellen Serovare, die im Kauffmann-White-Schema eingeteilt werden. Dieses Schema beruht auf unterschiedlichen Antigenmustern. Von besonderer Bedeutung sind dabei die O- und H-Antigene. Die O-Antigene sind Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) der Zellwand und die H-Antigene Bestandteil der Proteinbausteine der Flagellen, mit denen sich die Salmonellen

fortbewegen können. Daher stellt dieses Schema eine diagnostische Antigentabelle aller gegenwärtig bekannten Salmonellen Serovaren dar und ist die Grundlage der modernen Diagnostik. Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten Untersuchungen erfolgten mit einem Isolat von *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Enteritidis, welches im Folgenden nur noch mit der kurzen Version *S. enteritidis* bezeichnet.

Obwohl von den insgesamt ca. 2 500 Serovaren fast alle in der Lage sind auch den Menschen zu infizieren, besitzen nur einige wenige eine Bedeutung als Ursache von humanen Magen-Darm-Infektionen. Hierbei sind vor allem *S. enteritidis* und *S. typhimurium* zu nennen. Salmonellen-Serovaren können in wirtsadaptierte (z.B. *S. typhi* beim Menschen, *S. gallinarum* beim Geflügel, *S. dublin* beim Rind, *S. cholerasuis* beim Schwein) und nicht wirts-adaptierte (z.B. *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. hadar*) unterteilt werden.

### 2.2.2. Aktuelle Lage

Die Salmonellose beim Menschen ist nach §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) eine meldepflichtige Erkrankung. Im Jahre 2008 wurden in den Ländern der Europäischen Union (EU) 131 468 Fälle gemeldet. In Deutschland wurden im Jahre 2008 insgesamt 42 921 und im Jahre 2009 nur noch 31 397 Fälle gemeldet. Die Anzahl der gemeldeten Fälle war auch in den Jahren zuvor stetig rückläufig und ist gegenwärtig nach Infektionen mit *Campylobacter* die zweithäufigste bakterielle Erkrankung des Menschen [3]. *S. enteritidis* gehört mit 62,5 % zu den am häufigsten humane Erkrankungen verursachenden Serovaren, gefolgt von *S. typhimurium* mit 12,9 %. Andere Serovaren sind mit lediglich weniger als 2 % für Erkrankungen beim Menschen verantwortlich und spielen daher eine untergeordnete Rolle [2].

Zur Ermittlung der aktuellen Epidemiologie im Huhn wurde im Jahre 2008 von der EFSA (engl.: *European Food Safety Authority*) zum sechsten Mal eine EU-weite Grundlagenstudie durchgeführt und im Juni 2010 veröffentlicht. An dieser Studie nahmen alle Mitglieder der EU sowie Norwegen und die Schweiz teil. Sie bezog sich auf Masthähnchen, die Auswahl der untersuchten Schlachthäuser in jedem Mitgliedstaat unterlag dem Zufallsprinzip. Hiermit wurden zum ersten Mal die Lebensmittel bei einer solchen Studie direkt untersucht. Es wurden insgesamt 10 132 Masthähnchen-Schlachtchargen aus 561 Schlachthäusern in die Erhebung einbezogen. Bei jeder positiven Salmonellen-Probe wurde mindestens ein Isolat serotypisiert. Die vier am häufigsten isolierten Salmonellen-Serovaren auf

Hähnchenschlachtkörpern in der Reihenfolge der abnehmenden Häufigkeit waren *S. infantis* (29,2 % der *Salmonella*-positiven Hähnchenschlachtkörper-Proben), *S. enteritidis* (13,6 %), *S. kentucky* (6,2 %) und *S. typhimurium* (4,4 %). Während die Serovare *S. enteritidis* und *S. typhimurium* häufig für menschliche Salmonellose-Fälle verantwortlich sind, machen *S. infantis* und *S. kentucky* allgemein einen deutlich geringeren Teil der Infektionen des Menschen aus [3].

### **2.2.3. Impfung als Präventionsmaßnahme**

In der Bundesrepublik Deutschland werden prophylaktische Verfahren zur Kontrolle der Infektionen unter anderem in Form von Impfungen der Geflügelbestände durchgeführt. Die Handhabung und Pflichten in diesem Kontext sind in der Hühner-Salmonellen-Verordnung (HühnSalmV) definiert. Somit sind Zuchtbetriebe mit mehr als 250 Hühnern, Aufzuchtbetriebe mit mehr als 350 Junghennen, Legehennenbetriebe mit mehr als 350 Tieren, Masthähnchenbetriebe mit mehr als 5 000 Hühnern und Brütereien, in denen erwerbsmäßig Eintagsküken schlüpfen (§1 der HühnSalmV) zur Impfung gegen *S. enteritidis* verpflichtet. Wenn die Betriebe kleiner sind als besagte, kann die Impfung gegen *S. enteritidis* dennoch angeordnet werden (§3 der HühnSalmV). Die Impfung gegen *S. typhimurium* ist generell nicht verpflichtend, sondern erfolgt nach amtlicher Anordnung (§13 der HühnSalmV). Diese Angaben beziehen sich auf die Version der Verordnung, die am 06. April 2009 vom Bundesrat verabschiedet worden ist.

Kommerziell stehen unterschiedlich hergestellte Lebend- und Totimpfstoffe zur Verfügung [16]. Die Effektivität dieser Vakzinierungsprogramme ist jedoch unterschiedlich und noch nicht zufriedenstellend. Für eine Weiterentwicklung und Verbesserung von Impfstoffen ist das Verstehen der angeborenen Immunantwort der Hühner unabdingbar. Salmonellen sind fakultativ intrazellulär überlebensfähig [17]; daher scheint der zellvermittelten Immunantwort bei der Abwehr im Wirt eine größere Bedeutung als der humoralen Immunantwort zuzukommen.

### **2.2.4. Klinik**

Beim Geflügel reagieren Küken am empfindlichsten auf eine Salmonelleninfektion, Eintagsküken sterben oft daran. Je nach Infektionsdosis treten nach drei bis fünf Tagen Inkubationszeit Mattigkeit, Fieber, gesträubtes Gefieder, Hängenlassen der Flügel, verminderter Appetit, Durstgefühl und Durchfall auf. Vereinzelt kommen

Konjunktivitis, Keratitis mit Blindheit, nervöse Symptome, erschwerte Atmung und Arthritis hinzu. Die Infektion kann chronisch verlaufen und zur dauerhaften Ausscheidung von Keimen führen. Ältere Tiere erkranken selten und sind klinisch inapparent. Das heißt, die Infektion bleibt meist latent, ist aber in der Regel mit einer länger anhaltenden Keimausscheidung verbunden.

### **2.2.5. Infektionswege**

Hühner können sich sowohl horizontal als auch vertikal infizieren. Bei einer horizontalen Ansteckung wird der Erreger von Wirt zu Wirt der gleichen Generation und bei einer vertikalen Ansteckung wird der Erreger von einem Wirt auf seine Nachkommen übertragen.

#### **Horizontale Ansteckung**

Mehrere Wege der horizontalen Infektion wurden beim Wirtschaftsgeflügel beschrieben.

Brüter: Eine Möglichkeit der Infektion ist die Ansteckung bereits während des Brutvorgangs. Diese Erkenntnis wurde durch Versuche, bei denen infizierte und nicht infizierte Eier zusammen bebrütet worden sind, gewonnen. Bei 8 % der Embryonen und 55 % der Eintagsküken, die von den ursprünglich nicht infizierten Eiern stammten, konnten Salmonellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in diesen Experimenten auch gezeigt, dass die Schlupfrate durch eine Salmonellenkontamination nur geringgradig beeinflusst wird [18].

Einstreu / Umwelt: Ebenso stellt die Einstreu eine Infektionsgefahr dar. Eine Persistenz von *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. infantis* und *S. typhimurium* wurde bereits gezeigt [19]. Die Persistenz von Salmonellen in der Umwelt hängt sehr stark von den Umgebungsbedingungen und dem Serovar ab. So konnte beispielsweise *S. enteritidis* noch nach 26 Wochen in Einstreu und getrocknetem Kot nachgewiesen werden [20].

Trinkwasser: Kontaminiertes Trinkwasser ist ein Risiko für Hühner, um sich mit Salmonellen zu infizieren [21]. Verunreinigungen des Wassers können durch Kotabsatz oder das Hineintreten in das Trinkwasser verursacht werden. Demnach treten bei Verwendung von Nippeltränken deutlich seltener Infektionen auf als bei offenen Wasserbehälter [22].

Futter: Es wurde gezeigt, dass das Futter ein geringeres Infektionsrisiko als Wasser, Staub, Einstreu bzw. Umweltfaktoren ist. So waren in Broilerbeständen 13,4 % der Futterproben, jedoch 47,4 % der Einstreuproben Salmonellen positiv [21].

Vektortiere: Auf dem Gelände von Hühnerbetrieben wurde Mäuse-, Ratten-, Katzen-, Hunde-, Dachs- und Fuchskot untersucht. Es zeigte sich, dass diese Tiere durchaus Vektortiere sein können. Das heißt, dass sie die Bakterien in der Regel über die Ausscheidung von salmonellenhaltigem Kot übertragen und sie somit in Hühnerbetriebe einbringen können [20].

Stress: Ein gängiges Verfahren Legehennen in eine zweite Legeperiode zu leiten, ist das Induzieren einer Mauser. Dies wird durch temporären Futter- und Wasserentzug sowie durch Änderung des Lichtprogramms erreicht. In einer Studie wurde bei einer Gruppe von Tieren auf diese Weise die Mauser eingeleitet und eine Kontrollgruppe wurde weiterhin unter gewohnten Bedingungen gehalten. Beide Gruppen wurden oral mit Salmonellen infiziert und der Kot der Tiere wurde auf Salmonellenausscheidung untersucht. Es zeigte sich, dass die Hühner in Mauser eine deutlich höhere Salmonellenausscheidung aufwiesen als die Hühner, die nicht dem Stress des Mauser-Management unterlagen [23]. Auch andere Stressfaktoren wie das gemeinsame Einstellen mit neuen Jungtieren führte zu einer erhöhten Salmonellenausscheidung [24].

Haltung: Es gibt Korrelationen zwischen der Haltungsform und der Häufigkeit von Salmonelleninfektionen bei Hühnern. Legehennen in Käfighaltung sind mit Abstand weniger oft infiziert als Tiere in einer anderen Haltungsform (1,7 %). Hühner, die in Bodenhaltung (14 bis 42 %) in geschlossenen Ställen gehalten werden, variieren in der Anzahl der Infektionen sehr. Tiere in Freilandhaltung (50 %) zeigen allerdings das häufigste Auftreten von Salmonellen positiven Tieren im Vergleich zu den anderen aufgeführten Haltungsformen [25, 26].

Kontamination durch die Eischale: Salmonellen haben die Fähigkeit die Schale von Eiern zu penetrieren. Da diese Bakterien eine sehr gute Persistenz in der Umwelt besitzen und somit die Gefahr einer Infektion über die Eischale besteht, kommt diesem Lebensmittel eine wichtige Rolle für die Ansteckung des Menschen zu [27, 28]. Diese Tatsache unterstreicht die Unterschiede der Infektionshäufigkeiten innerhalb der verschiedenen Haltungsformen. Während die Eier, die in Boden- oder Freilandhaltung gelegt werden, durchaus mit Kot in Kontakt kommen, unterbleibt dies

bei Käfighaltung.

Im Ei wurden bereits verschiedene Moleküle identifiziert, die bakteriostatisch wirken und damit zum Schutz gegen Bakterieninfektionen, dienen. An dieser Stelle sind z.B. Lysozym C [29], Ovotransferrin [30] oder auch Ovocalyxin-36 [31] zu nennen. Trotz der physikalischen und der genannten chemischen Barrieren im Ei scheinen diese keine große Hürde für Salmonellen darzustellen [32, 33]. Diese Eigenschaft bezieht sich allerdings nicht nur auf Salmonellen, sondern weitergefasst auf gramnegative, motile und nicht clusternde Bakterien. So wurde gezeigt, dass beispielsweise Pseudomonaden oder Alcaligenes-Bakterien ebenfalls die Fähigkeit besitzen die Schutzmechanismen im Ei zu überwinden. Des Weiteren ist diese Fähigkeit innerhalb der einzelnen Salmonellen Serovare auch unterschiedlich. Es wurde demonstriert, dass *S. enteritidis* besser mit den bakteriostatischen Molekülen im Ei zurecht kommt, als *S. typhimurium* und *S. hadar* [2].

### **Vertikale Ansteckung**

Ein Ei kann während seiner gesamten Entwicklung und daher in jedem Abschnitt des weiblichen Geschlechtstraktes der Henne (Ovarien, Infundibulum, Magnum, Isthmus, Uterus und Vagina) infiziert werden. Es wird postuliert, dass die Ansteckung vor dem Legen häufiger stattfindet als durch Penetration durch die Eischale nach der Eiablage. Ferner wurde gezeigt, dass *S. enteritidis* die Fähigkeit besitzt, im Geschlechtstrakt der Henne zu persistieren und sich der angeborenen und adaptierten Immunantwort des Wirtes zu entziehen [34, 35]. Die Frage, in welchem Abschnitt des Geschlechtstraktes sich die Bakterien zurückziehen, ist bisher noch unbeantwortet. Das Infundibulum ist dafür zuständig die ovulierten Follikel aufzunehmen, im Magnum wird das Eiweiß produziert, im Isthmus werden die Eihäute und im Uterus die Eischale gebildet und die Vagina dient der Positionierung des Eies zur Eiablage. Mehrere Arbeiten zeigen, dass das Eiweiß am häufigsten von einer Salmonelleninfektion betroffen ist, was für ein Persistieren im Magnum sprechen würde [2].

#### **2.2.6. Wirts-Pathogen-Interaktion**

Wenn die Salmonellen die Magensäure [36], die Darmperistaltik [37] und die mikrobielle Flora des Intestinaltrakts [38] überleben, kolonisieren sie weite Teile des Intestinaltrakts. Hauptziel der Bakterien sind allerdings die Blinddärme, welche die wichtigste Eintrittspforte für sie darstellen. Der Verlauf des Krankheitsbildes hängt

sehr stark vom Serovar, der Dosis und der Spezies ab.

### **Infektion des Huhnes**

Hühner, die sich mit wirts-spezifischen Salmonellen wie *S. pullorum* oder *S. gallinarum* infizieren, zeigen einen sehr viel schwerwiegenderen Krankheitsverlauf als mit nicht wirts-spezifischen Salmonellen infizierte Tiere. *S. pullorum* und *S. gallinarum* Infektionen gehen mit einer hohen Mortalität einher. Die betroffenen Tiere zeigen nach ca. 24 Stunden starken Durchfall, sie werden apathisch, aber nicht somnolent. Sobald die Diarrhoe auftritt, führt die Infektion in der Regel innerhalb von wenigen Stunden zum Tode. Pathologisch sind Leber und Milz stark vergrößert, der Darm ist mit Blut überzogen und der Inhalt besteht aus gelblich flüssigem Kot.

Die hier vorgestellte Arbeit bezieht sich allerdings auf die Infektion mit nicht wirts-adaptierten Salmonellen Serovaren (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*), die eine Rolle für den Menschen im Sinne einer Zoonose spielt. Der Krankheitsverlauf bei diesen Serovaren ist sehr stark vom Alter der Hühner abhängig. Küken sind im Vergleich zu adulten Tieren sehr viel anfälliger gegenüber einer Infektion. Experimentell wurden Hühner im Alter von 2 Tagen und 1, 2, 4 und 8 Wochen oral mit unterschiedlichen Dosen ( $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$ ) *S. typhimurium* infiziert. In dieser Studie wurde eine Korrelation zwischen Alter und Bakterienausscheidung gezeigt. Die 2-Tages-Küken zeigten ab einer Infektionsdosis von  $10^4$  eine hundertprozentige Salmonellenausscheidung. Die 8 Wochen alte Tiere nur noch zu 25 %. Zu Todesfällen kam es nur in der Gruppe der 2-Tages-Küken [39]. Bei einer Infektion mit nicht wirts-spezifischen Serovaren zeigen adulte Hühner in der Regel keine klinischen Symptome. Es wurde jedoch demonstriert, dass eine Infektion mit *S. enteritidis* Einfluss auf die Eiproduktion hat. Hühner wurden jeweils im Alter von 62 und 37 Wochen oral mit  $10^9$  *S. enteritidis* infiziert. In der Gruppe mit den älteren Tiere zeigte sich deutlich mehr intestinale Bakterienkolonisation, einen Rückgang der Eiproduktion und vermehrte Kontamination der Eischale und des Eiweiß [40].

Pathologisch verursachen nicht wirts-adaptierte Salmonellen beim jungen Hühnerküken neben katarrhalischen und hämorrhagischen Darmentzündungen mit gelblichem, käsigem Inhalt in den Blinddärmen, vor allem Nekrosen in Myokard, Leber, Milz und Nieren, eventuell auch in der Muskulatur, im Magen und den Lungen. Der Dottersack wird in der Regel zeitlich verzögert absorbiert. Beim erwachsenen Huhn sind die pathologischen Symptome schwach bzw. in der Regel gar nicht

ausgeprägt, was mit dem klinischen Bild und der Latenz der Krankheit korreliert [41].

### **Invasion der Salmonellen**

Um eine Gastroenteritis auszulösen, müssen die Salmonellen das distale Ileum und die Caeca erreichen, um dort durch das mukosale Epithel zu invadieren. Um Erreger zu eliminieren, gibt es im Intestinaltrakt spezialisiertes lymphoides Gewebe, welches mit dem Begriff *gut-associated lymphoid tissue* (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe, GALT) zusammengefasst wird. Ein besonderes Charakteristikum von GALT in Säugetieren ist das Vorhandensein von M-Zellen (engl.: *microfold cells*). Dies sind spezialisierte Zellen, die morphologisch deutlich von den sie umgebenden Epithelzellen zu unterscheiden sind. Sie stellen die Haupteintrittspforte für Salmonellen beim Säugetier dar. Das Huhn besitzt keine M-Zellen und bis zum heutigen Tag ist die Eintrittspforte für einen Erreger im Darm unbekannt. Das GALT des Vogels unterscheidet sich von dem des Säugers. Es besteht aus spezialisierten subepithelial lokalisierten lymphoiden Geweben wie den Caecaltonsillen, Peyerschen Platten und dem Meckelschen Divertikulum [42, 43]. Ob diese Einfluss auf den Invasionsmechanismus der Bakterien haben, ist aber noch nicht erforscht. In der Maus wird neben der Invasion über die M-Zellen auch einen M-Zell-unabhängiger Weg beschrieben. Dabei nehmen dendritische Zellen über ihre lang ausgestreckten Ausläufer sowohl invasive als auch nicht invasive Salmonellen aus dem Darmlumen auf [44]. Dieser Weg der Bakterienaufnahme ist beim Huhn auch vorstellbar, ist noch nicht experimentell gezeigt worden. Des Weiteren vergrößern sich die Caecaltonsillen im Verlaufe einer Infektion [45], wobei der Grund dafür noch nicht hinreichend untersucht ist.

In einer anderen Studie wurde die Invasivität von Salmonellen in das Gewebe in zwei Modellen verglichen. Einerseits wurde sie in einem Hühner *in vivo intestinal loop* Model und andererseits ein *in vitro* Model mit einer Epithelzelllinie durchgeführt. Es wurden verschiedene Salmonellen-Serovaren verwendet und die Bakterien aus dem Darm bzw. der Zellkultur rückisoliert und quantifiziert. *S. enteritidis* besaß die höchste Invasivität [46].

Das heißt, wie die Salmonellen in den aviären Organismus gelangen, ist derzeit noch nicht geklärt. Tatsache ist, dass das mukosale Epithel durchquert wird. Hierbei stellt das Epithel nicht nur eine physikalische, sondern auch eine chemische Barriere dar. Es ist auch ein Initiator der angeborener Immunantwort. Epithelzellen können

bakterizid wirkende Enzyme, genauso wie Chemokine, die wiederum Zellen der angeborenen Immunantwort anlocken, produzieren [47]. Bei diesen Zellen der angeborenen Immunantwort handelt es sich um Granulozyten, Makrophagen und immature dendritische Zellen, die die sogenannte „*first line of defense*“ (erste Verteidigungslinie) darstellen. Sie sind in der Lage Pathogene zu eliminieren und weitere Immunreaktionen auszulösen. Eine frühe Infiltration des Epithels durch Granulozyten und Makrophagen wurde beim Huhn nach oraler Salmonellen Applikation bereits beschrieben [48]. Zudem zeigten *in vitro* Studien mit primären aviären Makrophagen, dass auch diese eine bakterizide Wirkung auf Salmonellen haben [49].

Makrophagen und in der *Lamina propria* sitzenden dendritische Zellen besitzen spezielle Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen und lösen über diese eine angeborene Immunreaktion aus. Diese Rezeptoren werden als *pattern-recognition receptor* (PRR) bezeichnet, die auf der Zelloberfläche oder im Zellplasma der Zellen des Wirtes lokalisiert sind. Sie erkennen sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) [50]. Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Molekül, das vor allem in der Zellwand gram negativer Bakterien vorkommt. So ist beispielsweise LPS ein PAMP und Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) der dazugehörige PRR [51]. TLR4 befindet sich unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen, die somit das LPS der Salmonellen und somit die Infektion erkennen [52]. Des Weiteren befindet sich auf der basalen Seite des Epithels der Toll-like Rezeptor 5 (TLR5), der Flagellin, ein spezifisches Protein motiler Bakterien bindet [53]. Erst nach Bindung von Flagellin an diesen Rezeptor werden die Epithelzellen zur Sekretion des Chemokins IL8, welches wiederum Entzündungszellen anlockt, angeregt [54, 55]. Diese Beispiele sind Daten aus der Maus-Literatur, sind jedoch im Huhn bestätigt [56].

### **Eindringen der Salmonellen in die Wirts-Zelle**

Nach dem Eindringen in den Organismus des Wirtes, werden Salmonellen von Makrophagen aufgenommen. Salmonellen sind in der Lage intrazellulär in Makrophagen zu überleben [57, 58]. Salmonellen besitzen die sogenannten Typ-III-Sekretionssysteme (TTSS), welche durch die Salmonellen Pathogenitätsinseln 1 und 2 kodiert (SPI-1 und SPI-2) sind. Die TTSS sind Injektionssysteme, die, ähnlich wie Injektionsnadeln, Virulenzfaktoren direkt in das Zytoplasma der Wirtszelle geben können. Es gibt mehrere Typen des TTSS. Während TTSS-1 die Zellinvasion

ermöglicht [59, 60], ist TTSS-2 für das intrazelluläre Überleben notwendig [61, 62]. Die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben ist eine wichtige Eigenschaft von Salmonellen im Wettlauf zwischen Erreger und Wirt. Diese Fähigkeit wird nicht nur durch TTSS-2 vermittelt, sondern auch durch die Möglichkeit, zum einen die Phagosom-Lysosom-Verschmelzung zu verhindern und zum anderen durch Detoxifikation gebildeter Sauerstoffradikale in Makrophagen zu überleben [63, 64]. Salmonellen besitzen allerdings neben SPI-1 und SPI-2 insgesamt fünf Pathogenitätsinseln. Über die funktionelle Bedeutung der dritten und fünften ist wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SPI-4 durchaus eine wichtige Rolle bei einer Salmonelleninfektion spielt. Das Protein SiiE, welches auf SPI-4 kodiert ist, verbessert die Adhärenz der Salmonellen an der Epithelschicht des Wirtes, was den Bakterien einen Vorteil bei der Invasion verschafft [65].

Wie bereits erwähnt gibt es wenige Studien über Invasionsmechanismen. Es gibt jedoch eine Arbeit aus dem Jahre 2006, die sich mit Invasionsmechanismen dieser Bakterien in den aviären Organismus beschäftigt. Ileum von 3 Monaten alten Broilern wurde mit aus dem Menschen isolierten Serovar (*S. weltevreden*) infiziert. In dieser Arbeit wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, dass Salmonellen (70 %) nach Kontakt mit Epithelzellen Bläschen auf ihrer Oberfläche bilden, die abgeschnürt werden. Die abgeschnürten Bläschen finden sich auf Epithelzellen des Wirtes wieder. Zudem unterstützen die Sekretionsnadeln des Typ-III-Sekretionsapparates die Invasion in die Epithelzelle. Im Anschluss daran scheinen sie die Epithelzellen zu verlassen, um mit den im Gewebe des Ileums befindlichen Makrophagen zu interagieren. Auch hier wurden genannte Bläschen abgeschnürt. Daraufhin schien die Invasion in die Makrophagen zu folgen [66].

Nachdem die Salmonellen invadiert sind und von Makrophagen aufgenommen worden sind, gelangen sie mit den Makrophagen zu Milz und Leber, wo eine weitere Bakterienproliferation stattfindet [67]. Im Anschluss daran kommt es zu einer systemischen Ausbreitung.

### **Die frühe angeborene Immunantwort des Säugers**

Das Immunsystem setzt sich aus der angeborenen und spezifischen Immunität zusammen. Die angeborene bzw. unspezifische Immunität beinhaltet Komponenten des Serums, wie das Komplementsystem oder unspezifische Zellen wie heterophile Granulozyten (neutrophile Granulozyten des Säugers), Makrophagen oder natürlichen

Killerzellen [68, 69] und stellen die „*first line of defense*“ gegen mikrobielle Invasion dar. Das spezifische Immunsystem selbst wird in die humorale und zelluläre Immunität eingeteilt. Die Antikörper, die von B-Lymphozyten produziert werden, bilden die humorale Immunantwort. Antikörper schützen den Wirt gegen Infektionen, indem sie mit der Oberfläche von Pathogenen interagieren und sie daran hindern, an Wirtszellen zu haften oder in sie einzudringen [70]. Zudem können die Erreger durch phagozytierende Zellen eliminiert und das Komplementsystem aktiviert werden [71]. Der Schutz durch Antikörper erfolgt nur während der extrazellulären Phase einer Infektion. Die zelluläre Immunität ist durch T-Lymphozyten mediiert. Sie können entweder direkte Effektor-Funktion (zytotoxische T-Zellen), regulatorische Funktion (T-Helferzellen) oder Suppressor-Funktion haben. Dieser Teil des Immunsystems spielt eine Rolle beim Schutz gegen intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder bestimmte Bakterien, wie zum Beispiel die intrazellulär überlebensfähigen Salmonellen [72, 73]. Daher werden phagozytierende Zellen aktiviert und infizierte Wirtszellen werden getötet. Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort scheinen eine Rolle beim Schutz gegen eine Salmonelleninfektion zu spielen [74], wobei die zelluläre wohl die wichtigere Immunität darstellt.

T-Zellen sind in T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und Suppressor-T-Zellen einzuteilen. Jeder dieser Art produzieren bestimmte Zelloberflächenmoleküle und – marker [75]. T-Helferzellen exprimieren CD4 [76], wohingegen zytotoxische T-Zellen und Supressorzellen CD8 exprimieren [77]. Des Weiteren werden T-Zellen aufgrund ihrer Rezeptoren in  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T-Zellen eingeteilt [78].

Derzeitiger Stand bezüglich der Entwicklung einer Immunantwort besagt, dass die Antwort von T-Helferzellen kontrolliert wird und dass diese wiederum in funktionelle Subpopulationen, die Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden können. Diese Einteilung erfolgt anhand der Zytokinsynthesemuster. Th1-Zellen exprimieren IFN- $\gamma$ , IL2, IL12 und IL18 und kontrollieren überwiegend die zell-mediierte Immunität. Th2-Zellen produzieren IL4, IL5, IL6 und IL10 und regulieren vor allem die humorale Immunität. Des Weiteren inhibiert IFN- $\gamma$  die Proliferation von Th2-Zellen [79] und IL10 inhibiert die Proliferation von Th1-Zellen [80]. Wenn die Mechanismen der angeborenen Immunantwort für die Elimination der Bakterien nicht ausreichen, wird die adaptierte Immunantwort aktiviert.

## Die frühe Immunantwort des Huhnes

Beim Huhn wird wie beim Säuger zwischen der zellulären und der humoralen Immunantwort sowie zwischen Th1- und Th2-Zellen unterschieden [81]. Die zelluläre Immunantwort auf eine Infektion mit Salmonellen scheint auch beim Huhn die wichtigere Rolle zu spielen [82].

In Untersuchungen der zellulären Immunreaktion auf eine Salmonelleninfektion in unterschiedlichen Organen wie Darm, Milz, Leber und Blut wurden Veränderungen in Anzahl, Verteilung und Proliferation von Entzündungszellen festgestellt. Unterschiedliche Stämme von *S. typhimurium* wurden einen Tag und vier Wochen alten Hühnern in die Luftsäcke und oral appliziert. Im Anschluss daran wurden sie mit *Bordetella avium* infiziert. Die Tiere, die mit dem Wildstamm infiziert wurden, zeigten eine Immunsuppression durch Rückgang von Lymphozyten und Atrophien von lymphatischen Organen. Es wurde jedoch demonstriert, dass ein Rückgang von spezifischen Antikörpern nicht vorlag [83]. Somit konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Immunreaktion die wichtigere Rolle spielt als die humorale Immunreaktion, was von anderen Autoren bestätigt wurde [84].

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es beim Huhn sehr wenige Studien, die sich mit dem zeitlichen Verlauf der Salmonelleninfektion und der durch sie ausgelösten Immunantwort beschäftigen. Eine Studie von Berndt et al aus dem Jahre 2007 gibt einen Überblick über die Kinetik einer Salmonelleninfektion. Dabei wurden Eintagsküken mit *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. hadar* bzw. *S. infantis* oral infiziert. Im Zeitraum zwischen vier Stunden und neun Tagen p.i. wurde die Lokalisation der Bakterien und die Anzahl der in die zäkale Mukosa eingewanderten Immunzellen mittels Immunhistochemie bestimmt. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine, Chemokine, Apoptose-relevanter Proteine und iNOS mittels quantitativer PCR analysiert und mit den immunhistochemischen Daten zur Immunzellverteilung verglichen. Diese Studie zeigt, dass die Invasionsfähigkeit und der Einfluss auf die lokale Immunantwort zwischen den einzelnen Serovaren sehr stark variieren. Es wurde demonstriert, dass im Vergleich dieser vier genannten Serovare *S. enteritidis* die stärkste Invasivität hat. Bei der Gruppe, die mit diesem Serovar infiziert worden ist, konnten die Bakterien bereits vier Stunden nach der oralen Applikation im Caecumgewebe, zu einem geringen Anteil sogar bereits in der Leber, immunhistochemisch nachgewiesen werden. *S. typhimurium* zeigte ein

ähnliches Verhalten. *S. hadar* und *S. infantis* hingegen waren nur schwach invasiv [1]. Da die hier vorgelegte Arbeit auf Infektionen mit *S. enteritidis* basiert, wird im Folgenden der Wissensstand über dieses Serovar beschrieben. Wie bereits erwähnt, kann *S. enteritidis* bereits vier Stunden nach der oralen Infektion im Caecumgewebe nachgewiesen werden. Die Anzahl der Bakterien nimmt im Anschluss daran noch stetig zu, zeigt nach zwei Tagen den Höhepunkt und nimmt anschließend wieder ab. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass sich die ersten Salmonellen bereits vier Stunden p.i. intrazellulär in den Makrophagen befanden. Ein Tag p.i. trugen ca. 40 % der Makrophagen, die sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Caecumgewebe befanden, Salmonellen in sich. Die Zahl der Granulozyten stieg einen Tag p.i. deutlich an. Wenn die Ergebnisse der CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  und CD4 positiven T Zellen betrachtet werden, beginnt die Anzahl derer einen Tag p.i. anzusteigen [1]. Die Anzahl der  $\gamma/\delta$ -T-Zellen war ab Tag 4 p.i. deutlich erhöht.

Es gibt Hühnerlinien, die unterschiedlich empfänglich gegenüber einer Salmonelleninfektion sind. Die Arbeiten von Kogut et al haben sich auf die Untersuchung der angeborenen Immunantwort von Hühnern fokussiert und beschäftigt sich mit der Suche nach Resistenzgenen. Sie verglichen die Reaktion von Makrophagen von unterschiedlicher ingezüchteten Hühnerlinien nach Infektion mit unterschiedlichen Serovaren von *S. enteritidis*. In diesen Arbeiten kamen sowohl *expression quantitative trait loci* (eQTLs) und holistische Genom SNP arrays (engl.: *whole genome SNP arrays*, WGA) zum Einsatz. Von den 5 000 humanen Genen, die der „angeborenen Immunantwort“ zugeordnet wurden, wurden 4 000 im Hühnergenom identifiziert. Der Fokus dieser Arbeit war es, Resistenzgene gegenüber Salmonellen zu identifizieren. Diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen und müssen sicher auf kommerzielle Hühnerlinien erweitert werden [85].

Holistische Genexpressionsanalysen nach Salmonelleninfektionen wurden bisher für das Huhn nicht publiziert. Allerdings gibt es Studien, die sich mit Genexpressionsanalysen im Huhn nach einer Infektion durch andere Erreger beschäftigten. So stellt beispielsweise Lee et al im Jahre 2006 seine Infektionsstudie mit *Eimeria maxima* vor [81]. Eimerien lösen genau wie Salmonellen eine überwiegend zelluläre Immunantwort aus. Es wurde gezeigt, dass die Th1-Zytokine IFN- $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-15, IL-17 und IL-18 nach der Infektion deutlich vermehrt exprimiert wurde. Ebenso waren die Th2-Zytokine IL-3, IL-10, IL-13, and GM-CSF und die Chemokine IL-8, Lymphotoxin, MIF und K203 hochreguliert. Im Gegensatz

dazu war IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 4 und K60 in ihrer Expression vermindert.

Bemerkenswert ist, dass es nur wenige Arbeiten gibt, die sich mit der Untersuchung der angeborenen Immunantwort beim Huhn nach einer Salmonelleninfektion beschäftigen. Berndt et al fanden in einer *in vivo* Studie nach einer Infektion mit *S. enteritidis* im Caecumgewebe folgende Ergebnisse. IL8, IL12, iNOS, IL7R $\alpha$ , LITAF zeigten 24 Stunden p.i. eine erhöhte Expression gegenüber der Kontrolle. IFN- $\gamma$  wies mit ca. 36 Stunden einen etwas späteren Expressionsanstieg vor. MIP-1 $\beta$  hat nach 48 Stunden einen Expressionsanstieg, der sehr schnell wieder abfiel, IL18 verhielt sich ähnlich. IL2 erfuhr nach 24 Stunden zunächst einen Abfall des Expressionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle, stieg allerdings 4 Tage p.i. an [1].

### 2.2.7. Zytokine – Mediatoren der Immunantwort

Der Begriff „Zytokin“ ist ein Überbegriff für alle von Zellen produzierten und mit regulatorischen oder effektorischen Eigenschaften ausgestatteten löslichen Peptid-Mediatoren. Sie regulieren vor allem die Proliferation, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Somit haben sie deutlichen Einfluss auf die Immunantwort und die Modulation entzündlicher Prozesse. Dieser Begriff wurde bereits im Jahre 1974 geprägt [86]. Aufgrund bestimmter struktureller Ähnlichkeiten werden verschiedene Zytokine zu Verwandtschaftsgruppen bzw. Zytokinfamilien zusammengefasst. So unterscheidet man Interferone, Interleukine, Chemokine, kolonie-stimulierende Faktoren oder Tumor Nekrose Faktor Familienmitglieder. Zytokine werden von fast allen Zellen produziert und wirken als extrazelluläre Signalmoleküle zwischen den Zellen.

Neben Zytokinen, die die Entzündungsreaktion fördern, wie beispielsweise die pro-inflammatorischen Interleukine IL1 $\beta$ , IL6, IL8 und IL17 sind eine Reihe von Interleukinen entscheidende Komponenten der angeborenen oder erworbenen Immunantwort. Dabei beeinflussen die während der angeborenen Antwort sezernierten Mediatoren das Muster der später einsetzenden erworbenen Immunität. Das Th1/Th2-Muster wurde ursprünglich in der Maus entdeckt und beschreibt die Polarisation der murinen CD4<sup>+</sup>-Zellen in Typ 1- (IFN- $\gamma$ - und IL2 produzierend) und Typ 2- (IL4- und IL5 produzierend) T-Helfer-Zellen, welche entsprechend entweder die zellvermittelte (durch T-Zellen geprägt) oder die humorale (durch B-Zellen geprägt) Immunantwort fördern [87-89]. Dieses Konzept wurde seitdem ergänzt und verfeinert und wird heute auch auf andere Zytokine (z.B. IL12 und IL18 für die Th1-;

IL9 und IL13 für die Th2-Immunantwort), aber auch andere Zellen (z.B. CD8+ zytotoxische Zellen,  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen) angewendet [90].

In Bezug auf die Erforschung aviärer Zytokine im Infektionsabwehrgeschehen wurden in den letzten Jahren einige Fortschritte erzielt und die Struktur und Funktion einer Reihe immunologisch bedeutsamer Interleukine im Huhn aufgeklärt. Trotz der geringen Homologien der Proteinsequenzen der aviären Interleukine sind die Funktionen zu denen der Säuger meist homolog [91].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Hühner nach einer Salmonelleninfektion ein ähnliches Zytokinmuster wie Säuger aufweisen. So wurden in einer Studie Eintagesküken mit *S. typhimurium* infiziert und nach 6, 12, 24 und 48 Stunden beprobt. Es wurde eine erhöhte Zahl an heterophilen Granulozyten im intestinalen Gewebe sowie in der Leber nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass IL1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ , IL8 sowie K60, ein weiteres aviäres IL8 Homolog, als Reaktion auf eine Salmonelleninfektion vermehrt exprimiert wurden [92] In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL10, CCL20, MIP-3 $\alpha$  sowie iNOS nach einer Salmonelleninfektion vermehrt exprimiert werden [93]

### **2.2.8. Unterschiede des Immunsystems von Huhn und Säuger**

Das Immunsystem der Vögel unterscheidet sich zum Teil erheblich von dem der anderen Tierarten. So zeigt das Abwehrsystem des Vogels einige Merkmale, die auf eine Zwischenstellung in der phylogenetischen Reihe zwischen jenem der Amphibien und Reptilien einerseits und dem hoch entwickelten Immunsystem der Säuger andererseits hinweisen. Im Folgenden wird lediglich auf die wichtigsten und zum Verständnis der aviären Immunität bedeutenden Unterschiede näher eingegangen.

Vögel haben ein als *Bursa Fabricii* bezeichnetes Organ. Dieses zählt neben dem Thymus zu den primären lymphatischen Organen und ist ein modifizierter Abschnitt der dorsalen Wand der Kloake, des gemeinsamen Ausgangs des intestinalen und urogenitalen Traktes beim Vogel. Die Bursa besteht aus Falten (lat.: *plicae*), die ähnlich den Villi im Darm organisiert sind und in einem zentralen Lumen enden. In ihnen befinden sich die lymphoiden Follikel. Die Bursa bildet sich mit dem Eintritt der sexuellen Reife der Tiere vollständig zurück. Die funktionelle Bedeutung der Bursa Fabricii liegt in der Entwicklung von B-Lymphozyten. Dabei besiedeln unreife, prä-bursale Stammzellen in einer Welle zwischen dem 7. und 15. embryonalen Lebenstag

den Bereich der Bursaanlage [94]. Die Reifung der B-Zellen in der Bursa ist für die Entwicklung des Antikörperrepertoires essentiell. Die Diversität wird dabei durch Genkonversion und Hypermutation in der Bursa gewährleistet. Nach Auswanderung in die Peripherie sind die reifen B-Lymphozyten durch ihre Fähigkeit Immunglobuline (Ig) zu sezernieren charakterisiert. Die B-Lymphozyten der Vögel setzen allerdings im Vergleich zu den Säugetieren lediglich drei Typen von Immunglobulinen frei, nämlich IgM, IgG (IgY) und IgA [95].

Im Gegensatz zu den Säugern besitzen Vögel keine Lymphknoten. Zu den sekundären bzw. peripheren lymphatischen Geweben oder Organen gehören beim Huhn die Milz, das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (engl.: *gut-associated lymphoid tissue*, GALT), das Bronchus-assoziierte lymphatische Gewebe (engl.: *bronchus-associated lymphoid tissue*, BALT), sowie das Kopf-assoziierten lymphatischen Gewebe (engl.: *head-associated lymphoid tissue*, HALT) und die sogenannten muralen Knötchen. Der größte Anteil dieses lymphatischen Gewebes ist allerdings in den Schleimhäuten lokalisiert und wird zusammengefasst als Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (engl.: *mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT) bezeichnet

Ein Merkmal des GALTs ist das Vorhandensein eines charakteristischen subepitheliales lymphatischen Gewebes wie den Peyerschen Platten, den Caecaltonsillen und dem Meckelschen Divertikulum. Wie bereits zuvor erläutert, wurden beim Huhn bis heute keine M-(*microfold*)-Zellen identifiziert, die bei Säuger auf typische Weise mit dem GALT assoziiert sind und für die Salmonellen wichtige Eintrittspforte darstellen.

Die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) des Säugers unterscheiden sich von denen des Huhnes. Beim Säuger gibt es drei MHC-Klassen. Über den MHC-Klasse-I-Weg werden infizierte und entartete Zellen, die körperfremde Proteine herstellen, gezielt von zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) identifiziert und anschließend eliminiert. Über den MHC-Klasse-II-Weg können T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) die Produktion von spezifischen Antikörpern und die Aktivität von Phagozyten stimulieren, welche Krankheitserreger inaktivieren und eliminieren (humorale Immunantwort). Das adaptive Immunsystem trennt also zwischen intra- und extrazellulären Pathogenen. Die MHC-Klasse-III-Komplexe sind Bestandteile des so genannten Komplementsystems, einem Teil des unspezifischen humoralen

Immunsystems, welches zur Elimination von zellulären Antigenen (z.B. Bakterien) beiträgt. Die schwere Kette der MHC-Klasse-I-Komplexe sowie die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der MHC-Klasse-II-Komplexe treten beim Säuger in sehr vielen Allelen auf. Somit sind die MHCs des Säugers sehr vielseitig und spezialisiert. Beim Vogel ist der B-Lokus als aviäres Äquivalent des MHC der Säuger beschrieben. Dieser ist ein vergleichsweise sehr kleiner kompakter Bereich mit wenigen Genen und nur sehr kurzen Introns (engl.: *intervening regions*). Es wurde postuliert, dass es sich hierbei um einen nur das Notwendigste enthaltenden (*minimal essential MHC*) MHC handelt, mit lediglich zwei Klasse-I $\alpha$ - und zwei Klasse-II $\beta$ -Genen, von denen jeweils nur ein Paar ausgeprägt wird [96]. Aus dieser Besonderheit resultiert die bei Hühnern auch gefundene spezifische Empfindlichkeit einzelner Linien für bestimmte Infektionen [96].

Vergleichbar mit den T-Lymphozyten der Säuger sind auch aviäre T-Lymphozyten durch die Expression des  $\alpha/\beta$ - oder  $\gamma/\delta$ -T-Zell Rezeptorkomplexes (TCR Komplex) charakterisiert. Beide Rezeptor-Moleküle ( $\alpha/\beta$ ,  $\gamma/\delta$ ) sind durch Disulfid-Brücken verbundene Heterodimere, bestehend aus einer 50 kDa und einer 40 kDa großen Glykoproteinkette, die nicht-kovalent mit dem CD3-Komplex als Signaltransduktionseinheit verbunden sind. Im Unterschied zu den Säugern besitzen Hühner zwei Subpopulationen von  $\alpha/\beta$ -T-Zellen, nämlich die TCR2<sup>+</sup> (V $_{\beta 1}$ )- und TCR3<sup>+</sup> (V $_{\beta 2}$ )-T-Lymphozyten. Außerdem finden sich im Vergleich zu Mensch und Maus besonders viele  $\gamma/\delta$ -TCR (TCR1<sup>+</sup>)-Zellen im peripheren Blut und in den Organen [97]. Die klassischen T Zell Marker CD4 und CD8 wurden beim Huhn bereits vor einiger Zeit kloniert und sind funktionell mit denen der Säuger identisch [98].

### **2.3. Methodik der Gentranskriptionsanalysen**

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von Genexpressionsanalysen die Reaktion des Hühnerimmunsystems auf eine Infektion mit Salmonellen umfassend analysiert werden. Daher soll kurz auf die Technik der Microarray basierten Genexpressionsanalyse eingegangen werden.

#### **2.3.1. Microarray**

Der Begriff „Microarray“ ist eine Sammelbezeichnung für moderne molekularbiologische Untersuchungssysteme, die die parallele Analyse von mehreren tausend Einzelnachweisen in einer geringen Menge biologischen Probenmaterials erlauben [99-101]. Es ist eine Methode, um Signalwege oder in ihrer Expression

auffällige Gene zu identifizieren. Bioinformatische Möglichkeiten wie physikalische Karten [4], die EST (engl.: *expressed sequence tag records*) Datenbanken [102] oder SNP (engl.: *single nucleotide polymorphism*)-Karten [103, 104] sind Voraussetzung zur Anwendung von Microarrays. Je vollständiger die bioinformatischen Informationen sind, desto genauer sind die Aussagen eines angewendeten Microarrays. Neben Microarrays sind die QTL Analysen (engl.: *quantitative trait locus*) und molekulare Marker häufig genutzte System [101, 105, 106]. Das Verfahren der Microarrayanalyse wird seit der vollständigen Sequenzierung des Hühnergenoms im Jahre 2004 zunehmend als experimentelle Methode genutzt.

Es gibt verschiedene Formen von Microarrays, zu denen SNP (engl.: *single nucleotide polymorphism*) Arrays, Protein Arrays, cDNA Arrays, CHIP Arrays und Oligonukleotid Arrays zählen.

In vorliegender Arbeit wurden Oligonukleotid Arrays benutzt. Sie quantifizieren eine große Zahl an mRNAs und haben gegenüber cDNA Arrays einige Vorteile in Bezug auf die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit [107]. Beide Genexpressions-Microarraytechnologien können umfangreiche und auch sichere Daten für eine umfassende Expressionsanalyse liefern. Jedoch sind Oligonukleotid Arrays konstanter in Konzentrationen und *Annealing* Temperaturen, sind genspezifischer und flexibler. Bei den Oligonukleotid Arrays kann zwischen Tests mit langen und kurzen Sequenzen unterschieden werden. In dieser Arbeit kamen Sequenz-Ketten von 60 Nukleotiden Länge zur Anwendung, was einem „langen Oligonukleotid Array“ entspricht. Wenn längere Sequenzen genutzt werden, dann ist die Signalstärke intensiver als bei kürzeren Sequenzen. Daher sind Arrays mit längeren Nukleotidsequenzen spezifischer und weisen oft einen größeren dynamischen Bereich auf [108, 109].

Inzwischen gibt es mehrere Anbieter mit jeweils eigenen Systemen. Für diese Untersuchung wurde der „*chicken (V2) Gene Expression Microarray, 4 x 44K*“ der Firma Agilent genutzt. Als vorteilhaft erwies sich in diesem System die Möglichkeit zusätzlich zu den vom Hersteller aufgetragenen Oligonukleotiden auf Wunsch weitere Oligonukleotide von bekannten Genen auf den Array aufbringen zu lassen [110].

### **2.3.2. qRT-PCR**

Die herkömmliche Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*,

PCR) ist eine Methode, um DNA mit Hilfe einer DNA-Polymerase *in vitro* zu vervielfältigen. Der Begriff „Kettenreaktion“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung ermöglichen. Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (engl.: *quantitativ polymerase chain reaction*, qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Das heißt, die DNA-Proben werden ebenfalls vervielfältigt. Sie ermöglicht aber zeitgleich dazu eine Quantifizierung.

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte kann dabei einerseits durch (i) interkalierende Farbstoffe wie beispielsweise SYBR Green oder Ethidiumbromid erfolgen. Andererseits gibt es sogenannte (ii) FRET (engl.: *fluorescence resonance energy transfer*) – Sonden, wobei es verschiedene FRET-Sonden mit zahlreichen Modifikationen wie Hybridisierungs-Sonden, TaqMan-Sonden, sogenannte *molecular beacons* (engl.: molekulares Lichtsignal), Scorpion-Primer-Sonden und Lux-Primern.

Beim Huhn fanden bisher nur die Methoden mit interkalierenden Farbstoffen [111-114] und TaqMan-Sonden [115-117] Anwendung. Diese erweisen sich als reproduzierbare und damit verlässliche Möglichkeiten, um Genexpressionsunterschiede zu messen bzw. wie im Falle vorliegender Arbeit die Expressionsunterschiede von Kandidatengenen, die im Microarray-Verfahren ermittelt worden sind, zu bestätigen. In vorliegender Arbeit wurde die SYBR Green Technologie verwendet.

### 3. ZIELSETZUNG

Um Aufschluss über die angeborene Immunantwort des Haushuhnes auf eine Infektion mit *Salmonella enteritidis* zu erhalten, sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen durchgeführt werden. Ziel war es dabei in den *in vitro* Experimenten primäre Makrophagen zu verwenden, da bisher für derartige Untersuchungen überwiegend aviäre Zelllinien genutzt wurden, die aber aufgrund der Transformation eine Reihe genetischer Defekte aufweisen. Die *in vivo* Untersuchungen hatten insbesondere zum Ziel, die frühe Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die Infektion zu analysieren.

Als methodischer Ansatz wurde die Genexpressionsanalyse unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Microarrays gewählt.

Mit dieser Arbeit sollte eine Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen solcher Gene geschaffen werden, die aufgrund ihres Expressionsmusters als funktionelle Kandidaten in der Abwehr der Salmonellen identifiziert werden konnten.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle im Folgenden genannten Medien und Zusätze bei 4°C gelagert. Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang 10.1 aufgeführten Bezugsquellen.

### 4.1. Tiere und Tierhaltung

#### 4.1.1. Hühner

Für *in vitro* Versuche wurden Blut und Organe von Hühnern der Linien M11 (*B<sub>2/2</sub>-Haplotyp*), LSL (*Lohmann selected Leghorn*) und VALO (*Lohmann VALO SPF*) gewonnen. Die Eier und die Tiere der Linie M11 stammten vom Institut für Tierzucht in Mariensee und der Linie LSL und VALO von der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven. Eier wurden im Institut für Tierphysiologie der LMU München ausgebrütet und die Tiere anschließend in Gruppen in Gitterrostkäfigen und Volieren gehalten. Es wurde handelsübliches Alleinfutter gefüttert. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Der *in vivo* Versuch mit Hühnern der Linien VALO wurden in Einvernehmen mit den Richtlinien der Regierung von Berlin (0261/08) unter der Genehmigungsnummer G 0261/08 vom 15.07.2009 durchgeführt.

### 4.2. Gewinnung primärer Makrophagen

Makrophagen wurden erhalten, indem entweder periphere Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut gewonnen oder die Leukozyten aus der Milz isoliert wurden. Nach 72 Stunden differenzierte sich eine reine Makrophagenkultur.

#### 4.2.1. Material

##### Vollblut oder Milz von Hühnern

##### Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,2<sup>2</sup>

8,0 g	Natriumchlorid (NaCl) <sup>2</sup>
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O) <sup>2</sup>
0,2 g	Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>

0,2 g	Kaliumchlorid (KCl) <sup>2</sup>
ad 1000 ml Aqua dest.	
für die Verwendung in der Zellkultur autoklaviert	

**Ficoll-Paque<sup>3</sup>****Heparinlösung (500 U/ml)**

1 ml	Heparin-Natrium 20 000 <sup>4</sup>
ad 40 ml RPMI 1640 mit 0,532 g/l stabilem Glutamin <sup>5</sup>	

**Trypanblau-Lösung<sup>3</sup>****1x Trypsin-EDTA**

1 ml	10x Trypsin-EDTA Lösung <sup>3</sup>
ad 100 ml Aqua bidest.	

**4.2.2. Gewinnung von peripheren Blutleukozyten**

Den Tieren wurde zur Gewinnung von mononukleären Blutleukozyten mit einer heparinisierten Spritze Blut aus der *Vena jugularis* entnommen. Das Vollblut wurde 1:2 mit PBS verdünnt. Im Anschluss daran wurde das Blutgemisch über das gleiche Volumen Ficoll-Paque-Lösung geschichtet. Ein Gesamtvolumen von 24 ml wurde allerdings nicht überschritten. Nach 12-minütiger Dichtegradienten-Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) mit 600xg wurden die in der Interphase befindlichen Leukozyten mit einer Pipette abgenommen und zweimal mit gekühltem PBS gewaschen. Die Anzahl lebender Zellen wurde mittels einer Trypanblau-Färbung mikroskopisch bestimmt.

**4.2.3. Gewinnung von Leukozyten aus Organen**

Die Hühner wurden betäubt und durch Blutentzug getötet. Die Milz wurde unmittelbar nach der Entnahme in 4°C kaltes steriles PBS überführt und auf Eis gestellt. Zur weiteren Präparation wurden die Organe mechanisch zerkleinert. Größere Milzen wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein in PBS stehendes Metallsieb (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm) gedrückt; kleine Milzen wurden mit Hilfe einer 1 ml Spritze durch mehrmaliges Aufziehen und Ausdrücken zerkleinert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in entsprechende Röhrchen überführt, mit kaltem PBS

aufgefüllt und zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für ca. 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand abgenommen, bei 4°C und 225xg für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet in 12 ml PBS resuspendiert und auf 12 ml einer Ficoll-Paque-Lösung geschichtet. Nach 12-minütiger Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die Leukozyten aus der Interphase abgenommen werden.

### 4.3. Zellkultur

#### 4.3.1. Medien und Zusätze

##### Standardmedium (10% FCS)

445 ml	RPMI 1640 <sup>5</sup>
50 ml	Fetales Rinderserum (FBS, <i>fetal bovine serum</i> ) <sup>3</sup>
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>3</sup> (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
FCS und Penicillin-Streptomycin wurden in Portionen bei -20°C gelagert.	

##### Trypsin-EDTA, pH 7,2<sup>17</sup>

45 ml	Aqua bidest., steril
5 ml	Trypsin-EDTA-Lösung, 10x
Lagerung des Trypsin-EDTA, 10x als Aliquot bei -20°C	
für 1x-Lösung: 5 ml 10x, ad 50 ml sterilem Aqua bidest.	

#### 4.3.2. primäre Zellen

Aus Blut oder Milz gewonnene primäre Zellen wurden auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und meist in Standardmedium aufgenommen. Da es sich um aviäre Zellen handelte, wurden sie in der Regel bei 40°C kultiviert. Das Medium wurde nach Bedarf, aber in der Regel täglich, gewechselt.

#### 4.3.3. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau

##### Material

##### Neubauer Zählkammer

**Trypanblau 0,5 %<sup>6</sup>**

Lagerung bei RT
-----------------

**Durchführung**

Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, im Gegensatz zu abgestorbenen Zellen. Dies wird zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen genutzt und mittels Neubauer Zählkammer quantifiziert.

**4.4. RNA-Präparation****4.4.1. Material**

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Lagerung der Reagenzien bei Raumtemperatur (RT).

**Zellen oder Gewebe**

Zellen in Kultur
------------------

Fixiertes Gewebe
------------------

**Homogenisator (Peqlab, Precellys 24) + Keramikkügelchen****peqGOLD Trifast<sup>17</sup>****Chloroform ad analysis<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT
-----------------

**Isopropanol<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT
-----------------

**70% Ethanol<sup>2</sup>**

70 ml	Ethanol absolut
-------	-----------------

ad 100 ml Aqua bidest.
------------------------

Lagerung bei RT
-----------------

**4.4.2. Lysieren von Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde Trizol, maximal 1 ml pro  $1 \times 10^7$  Zellen, in das Zellkulturgefäß gegeben. Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe

eines Zellschabers vom Kulturgefäß abgelöst. Das Zellysat wurde in ein neues nukleasefreies 2 ml Reaktionsgefäß, wobei jedes lediglich 1 ml Lysat enthielt, überführt.

#### 4.4.3. Homogenisieren von Gewebe

Um das Zerkleinern von Gewebe vorzubereiten, wurden im Vorfeld die zum Homogenisator gehörigen Reaktionsgefäße mit 0,6 g der Keramik-Kugeln befüllt. Die frisch gewonnenen Organe wurden entweder durch Kälte mit Hilfe von Flüssigstickstoff oder in *RNA/later*® (Qiagen) bis zur Weiterverarbeitung fixiert.

Nachdem die Organe fixiert waren, wurde in die vorbereiteten Reaktionsgefäße jeweils 1 ml kühles Trizol vorgelegt. 50 bis 100 mg der Gewebeproben wurden mit einer sterilen Pinzette in Reaktionsgefäße mit 1 ml kaltem Trizol überführt und unverzüglich homogenisiert. Das Gewebe wurde zweimal 10 sec mit einer Pause von 30 sec bei 6000 Umdrehungen zerkleinert. Anschließend wurde 1 ml des Homogenats abgenommen und jeweils in ein neues nukleasefreies 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.4.4. Isolation von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA von Zellen und Organen erfolgte mit Hilfe der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion.

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden vor Arbeitsbeginn mit 10%igem Natriumdodecylsulfat (SDS, engl.: *Sodium dodecyl sulphate*) behandelt.

Nachdem Zellen lysiert (4.4.2) oder Gewebe homogenisiert (4.4.3) waren, wurden 200 µl Chloroform zu dem Zellysat bzw. dem Homogenat gegeben. Ab diesem Schritt ist die Methode zur Gewinnung der RNA von beiden Probenarten dieselbe. Die Proben wurden nun 15 sec lang stark geschüttelt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (12 000xg, 6°C, 15 min) kam es zur 3-phasigen Auftrennung der Suspension. Am Grund des Gefäßes ist die überwiegend aus Proteinen bestehende milchig-rosa organische Phase, darüber folgt die weiße Interphase mit der DNA und wiederum darüber ist die wässrige Phase mit darin enthaltener RNA zu unterscheiden. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde

diese in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Innerhalb der folgenden 10-minütigen Inkubation bei RT kam es zur Ausfällung der RNA. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12 000xg, 6°C, 10 min) wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min bei 7 500xg und 6°C zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet getrocknet und in nukleasefreiem Aqua bidest. aufgenommen. Die Durchführung einer RNA-Isolation ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

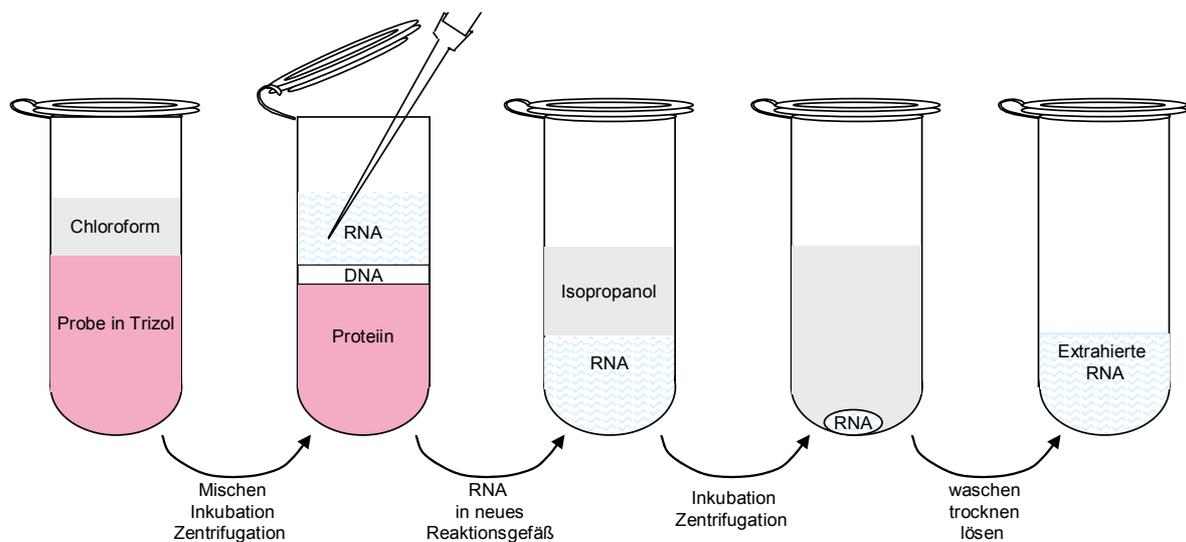


Abb. 1: Schema einer RNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform Extraktion

#### 4.4.5. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und –Reinheit wurde mit Hilfe des Spectrophotometers "NanoDrop" der Firma Peqlab photometrisch durchgeführt.

#### Material

**NanoDrop 1000 Spectrophotometer**

**nukleasefreies H<sub>2</sub>O**

#### Durchführung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch über die Lichtabsorption bei 260 nm. Die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm und 230 nm ermöglicht die Bestimmung der Quotienten 260/280 und 260/230, welche ein Maß der Reinheit darstellen. Der 260/280-Quotient muss den Wert 1,9 und der 260/230-Quotient muss

den Wert 2,0 überschreiten, damit die RNA als kontaminationsfrei beurteilt wurde und damit von einer korrekten RNA-Konzentration ausgegangen werden konnte. Wenn die Werte der Quotienten unterschritten wurden, sprach dies für Kontaminationen mit beispielsweise Phenol, Proteinen oder Salzen. Daraus resultiert eine Verfälschung der angegebenen RNA-Konzentration. In dieser Arbeit wurden nur Proben, die die genannten Kriterien erfüllten, verwendet.

#### 4.4.6. Natriumacetat Fällung

Kontaminierte Proben wurden durch eine Natrium-Acetat Fällung weiter aufgereinigt.

##### Material

**Natriumacetat, nukleasefrei<sup>2</sup>**

**Isopropanol<sup>2</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

**70% Ethanol<sup>2</sup>**

70 ml	Ethanol absolut
ad 100 ml Aqua bidest.	
Lagerung bei RT	

##### Durchführung

Die in Wasser gelöste RNA (bei geringem Volumen auf 100 µl mit nukleasefreiem Aqua bidest. aufgefüllt) wurde mit 1 Volumen Isopropanol und  $\frac{1}{10}$  Volumen Natriumacetat (NaOAc) versetzt. Durch vorsichtiges Mischen und eine 30 minütige Inkubation bei RT wurde die RNA ausgefällt. Nach Zentrifugation (12 000xg, 6°C, 10 Minuten) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 1ml 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend nochmals bei 7 500xg, 6°C, 5 Minuten zentrifugiert. Das nach Entfernen des Überstandes getrocknete Pellet wurde erneut in Aqua bidest. gelöst.

Abschließend erfolgte eine nochmalige Messung der Absorptionen im NanoDrop zur Evaluierung der 260/230 und 260/280 Werte.

#### 4.4.7. Kontrolle der RNA-Qualität mittels Agilent 2100 Bioanalyzer™

##### Material

**Agilent 2100 Bioanalyzer**

**RNA 6000 Nano Kit, RNA 6000 Nano Reagents, NA Nano Ladder<sup>1</sup>**

**RNA 6000 Pico Kit, RNA 6000 Pico Reagents, RNA Pico Ladder<sup>1</sup>**

**2100 Expert Software [118]**

##### Durchführung

Vorraussetzung für eine zuverlässige *messenger* RNA (mRNA) Quantifizierung ist die Verwendung von mRNA guter Qualität. Hierfür wurde die gewonnene RNA einer Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bioanalyzer Systems der Firma Agilent unterzogen. Dieses auf der *Lab-on-a-Chip* Technologie basierende System ermöglicht es, die Fragmentlänge der RNA-Moleküle digitalisiert zu erfassen und der RNA Qualität unter anderem auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 18S und 28S rRNA und deren Verhältnisse einen Zahlenwert zuzuordnen. Dieser Zahlenwert wird als RNA *Integrity Number* (RIN) bezeichnet und bewegt sich im Bereich zwischen 0 (stark degradiert) bis 10 (intakte RNA). Für die Versuche dieser Arbeit wurde als Ausschlusskriterium für die weitere Verwendung der RNA eine RIN von mindestens 7,0 festgelegt. Die zu analysierenden RNA-Proben wurden nach Angaben des Herstellers aufgetragen und mittels der *Agilent 2100 Expert Software* ausgewertet. Bis zu einer eingesetzten RNA-Konzentration von 10 ng/μl kam das *RNA 6000 Pico Kit* zum Einsatz. Wenn RNA höher konzentriert vorlag, wurde das *RNA 6000 Nano Kit* verwendet.

#### 4.5. cDNA-Synthese

##### Material

**QuantiTect Reverse Transcription Kit<sup>16</sup>**

**DNase I, RNase-free<sup>9</sup>**

**Super Script III Transcription Kit<sup>11</sup>**

**Aqua bidest., nukleasefrei**

## Durchführung

Mit Hilfe der rekombinanten reversen Transkriptase wurde die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben, welche daraufhin als Matrize sowohl in der konventionellen als auch in der quantitativen PCR eingesetzt wurde. Zur Gewinnung von Matrizen für die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurde das „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ oder nach erfolgtem DNase Verdau (DNase I, RNase-free) das „Superscript III Kit“ verwendet. Es wurden standardmäßig 400 ng/ $\mu$ l RNA in die Synthese eingesetzt und zur Amplifizierung wurden „*random primer*“ benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 4.6. Erstellen von Primern

### 4.6.1. Primer für die konventionelle Polymerase Kettenreaktion

Die verwendeten PCR-Primer wurden mit der „Primer Express 3.0“ Software der Firma Applied Biosystems erstellt [119]. Dabei wurde auf einen Anteil an G/C-Nukleotiden von ca. 60 %, die gleiche *Annealing* Temperatur zwischen Primer-Paaren, die Länge der entstehenden Amplikons und die Lage (möglichst ‚intron spanning‘) geachtet. Als ‚intron spanning‘ Primer bezeichnet man solche, die nur auf bereits gesplicter cDNA binden können, da sie zum Ende des einen und zu Beginn des anderen Exons liegen. Somit können sie keine genomische DNA amplifizieren.

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG in Ebersberg oder durch die Firma GATC in Konstanz.

### 4.6.2. Primer für die quantitative Polymerase Kettenreaktion

Auch für die qRT-PCR-Primer fand die „Primer Express 3.0.“ Software von Applied Biosystems Verwendung. Allerdings wurde hier besonders auf die Größe des Amplikons (maximal 150 bp) und eine einheitliche *Annealing* Temperatur (59°C) aller Primer-Paare geachtet. Die Etablierung der Primer erfolgte nach ihrer Erstellung am Computer standardmäßig in drei Schritten:

- 1) positives Signal in der konventionellen PCR
- 2) Bestätigung des aufgereinigten PCR Produktes durch Sequenzierung
- 3) Erstellen einer Standardgeraden in der quantitativen PCR

Gen	<i>accession</i>	<i>forward</i>	<i>reverse</i>
IFN- $\gamma$	NM_205149	TGGCGTGAAGAAGGTGAAAGA	TCTGAGACTGGCTCCTTTTCCT
chIL1 $\beta$	NM_204524	CTGAGTCATGCATCGTTTATGTTTC	AAATACCTCCACCCCGACAAG
chIL6	NM_204628	GCTTCGACGAGGAGAAATGC	GCCAGGTGCTTTGTGCTGTA
chIL12p40	NM_213571	AAAGACTGGGCCAAAAGACAAG	GCAAAGCGTGGACCACTCA
chIL18	NM_204608	TGGAATGCGATGCCTTTTG	AAAAGCTGCCACGTTTAAATCTG
chIL4	NM_001007079	TGAATGACATCCAGGGAGAGGTTT	ATTCAGGAGCTGACGCATGTT
chIL10	NM_001004414	CGGGAGCTGAGGGTGAAGT	CAGCCAAAGGTCCCTTAAAC
iNOS	NM_204961	AAGCAAACGGCCAAGATCCA	CCCACCTCAAGGAGCATGTTG
TLR5	NM_001024586	ACTGCTGGAGGATTTGTTCTTGTT	GGTCCAAGACACGAAGATTTGG
TL1a	NM_205018	AAAGATGATGGGCAAGGCTGTA	GTGCCTGAGCCATACCTTTTG
chIL8	NM_205498	CTGGCCCTCCTGGTTTC	TGGCGTCAGCTTCACATCTTG
K60	NM_205018	AAAGATGATGGGCAAGGCTGTA	GTGCCTGAGCCATACCTTTTG
K203	NM_204720	CCTGCTGCACCACTTACATAACA	GCGCTCCTTCTTTGTGATGAA
Lymphotactin	NM_205046	GCCACAGTTCTCCTGGTCATAGT	GCGCATTGACTGACTTGCAA

Tab. 1: Liste der verwendeten qRT-PCR-Primer

## 4.7. Konventionelle Polymerase Kettenreaktion

Die PCR ermöglicht durch Verwendung einer hitzestabilen Polymerase und spezifischen Primern die Amplifikation von DNA-Fragmenten anhand einer DNA-Matrize. Die Reaktion erfolgt in einem PCR Gerät nach einem definierten Temperatur-Programm. Pro Zyklus werden hierbei 3 Phasen durchlaufen. Zunächst erfolgt eine Erhitzung der doppelsträngigen DNA auf 95°C, um die Stränge zu trennen, daraufhin folgt die Anlagerung der Primer bei der Primer-spezifischen Temperatur (*Annealing*). In der Phase der Elongation synthetisiert die Polymerase bei 72°C den komplementären DNA-Strang.

Insgesamt wurden 35 solcher Zyklen wiederholt, denen initial eine Denaturierungsphase von 15 min bei 95°C vorgeschaltet und abschließend eine finale Elongationsphase von 5 min bei 72°C nachgeschaltet wurde.

### 4.7.1. Material

Alle Reagenzien wurden bei -20°C aufbewahrt.

**HotFirePol-DNA Polymerase<sup>12</sup>**

**10x Polymerase Puffer B<sup>9</sup>**

**Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)<sup>10</sup>**

**MgCl Lösung 25mM<sup>9</sup>****Aqua bidest., nukleasefrei****Primer Paar in einer Konzentration von 1 pmol/ $\mu$ l****PCR Gerät****4.7.2. Durchführung**

Ansatz für eine PCR-Reaktion:

Reagenz	Menge in $\mu$ l
nukleasefreies Wasser	6,8
Magnesiumchlorid (MgCl)	2,0
10x Puffer B	2,5
dNTP	2,5
<i>Primer sense (forward)</i> , Endkonzentration: 20 mM	5
<i>Primer sense (reverse)</i> , Endkonzentration: 20 mM	5
DNA Polymerase (Endkonzentration 1U)	0,2
Gesamt	25

Aus diesen Reagenzien wurde ein sogenannter Mastermix für alle Ansätze angesetzt, welcher auf die einzelnen Ansätze verteilt wurde. Anschließend wurde 1  $\mu$ l (entspricht 400 ng eingesetzter RNA) der gewünschten cDNA bzw. 1  $\mu$ l Wasser als Negativkontrolle hinzugefügt.

Die verschiedenen Ansätze wurden im PCR Gerät auf die oben beschriebenen Temperaturen automatisch aufgeheizt bzw. abgekühlt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert.

Für die PCR wurden die in Tab. 2 aufgeführten Bedingungen gewählt. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	35
Annealing	primerspezifisch	30 sec	
Elongation	72°C	2-4 min, je nach Länge des Amplikons	
Finale Elongation	72°C	5 min	1

Tab. 2: Reaktionsbedingungen der konventionelle PCR

## 4.8. Aufreinigung und Sequenzierung des PCR Produktes

### Material

#### Wizard SV Gel and PCR Clean Up System Kit<sup>16</sup>

### Durchführung

Zur Aufreinigung von PCR Produkten wurde das *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System Kit* gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Zur eindeutigen Bestätigung der Spezifität des Primerpaares wurde das Amplikon sequenziert. Dazu wurde das aufgereinigte PCR Produkt auf 10 – 50 ng/μl eingestellt und 30 μl dieser Lösung in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Als Sequenzier-Primer wurde von dem in der PCR eingesetzten Primerpaar ein Primer, in einer Konzentration von 10 pmol/μl verwendet.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC Biotech, Konstanz.

## 4.9. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge. Aufgrund einer konstant angelegten Spannung wandern die geladenen Stücke durch das Gel und können danach mit Ethidiumbromid (EtBr) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 4.9.1. Material

#### 5x TBE-Puffer

54 g	Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS) <sup>2</sup>
27,5 g	Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) <sup>11</sup>
20 ml	0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH8 <sup>6</sup>
ad 1000 ml Aqua bidest.	

#### 0,5x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)<sup>2</sup>

1:10 Verdünnung des 5x Stocks mit Aqua dest.

#### 1%ige Agarose

0,5 g	Agarose (Roti@garose Standard) <sup>18</sup>
50 ml	0,5x TBE Puffer
vor Gebrauch ansetzen	
Lagerung bei RT	

### **6x Loading Dye Solution (Ladepuffer)<sup>10</sup>**

### **DNA-Ladder-Mix (Marker)<sup>10</sup>**

### **Ethidiumbromid-Stammlösung**

10 mg	Ethidiumbromid (EtBr) <sup>6</sup>
ad 1 ml Aqua dest.	
vor Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua dest. verdünnt	

#### **4.9.2. Durchführung**

Die in 0,5x TBE-Puffer angesetzte Agarose wurde im Mikrowellenherd erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Die Konzentration des benutzten Agarose-Gels betrug zwischen 0,5 % und 2 %. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in die Gießvorrichtung mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Sobald das Gel fest war, was nach ungefähr 30 min der Fall war, konnte das Gel in die Gelkammer überführt und dort mit dem Laufpuffer (0,5x TBE) überschichtet werden.

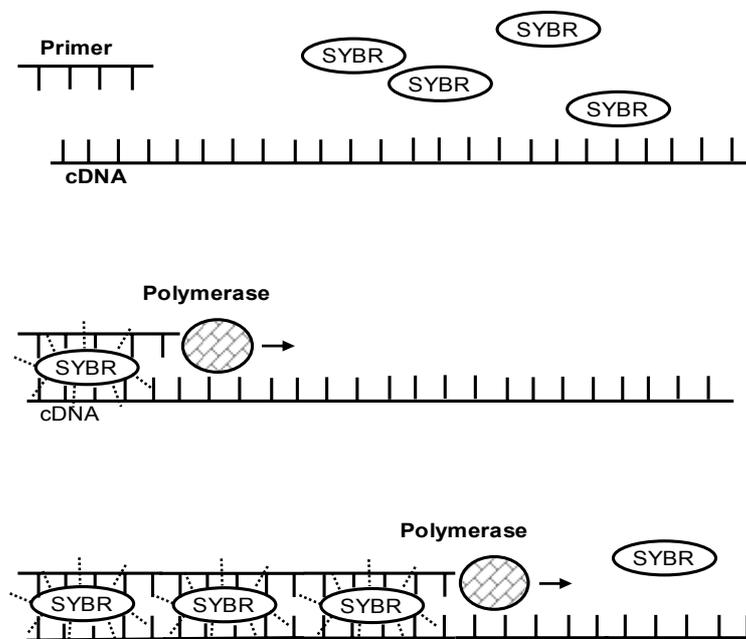
Die Proben wurden mit dem Ladepuffer vermischt (5 Teile Probe + 1 Teil Puffer) und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Referenz wurde in eine Tasche Marker (*DNA-Ladder-Mix*), der verschiedene DNA-Fragmente definierter Länge enthält, gegeben. Nach Anlegen einer konstanten Spannung von 100 bis 120 V wanderten die negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel in Richtung der Kathode. Die Fragmente müssen so lange laufen, bis man davon ausgehen kann, dass sie klar von einander abgegrenzt sein werden. Je kleiner die Fragmente sind und je niedriger die Agarose-Konzentration ist, desto schneller wandern sie. Anschließend wurde das Gel in eine EtBr-Lösung überführt. Die aufgetrennten Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

#### **4.10. Quantitative Polymerase Kettenreaktion**

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR, Real Time RT-PCR, engl.:

*quantitative polymerase chain reaction*) ist eine Methode, die die Möglichkeit der Quantifizierung von Nukleinsäuren bietet und auf dem Prinzip der konventionellen PCR basiert. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus bestimmt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht.

Als Fluoreszenzfarbstoff fand der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR Green Verwendung, dessen Fluoreszenzintensität sich durch Einlagerung in doppelsträngige Nukleinsäuren verändert (siehe Abb. 2). Allerdings muss bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen, um unspezifische Signale auszuschließen, eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität abgeschätzt werden kann.

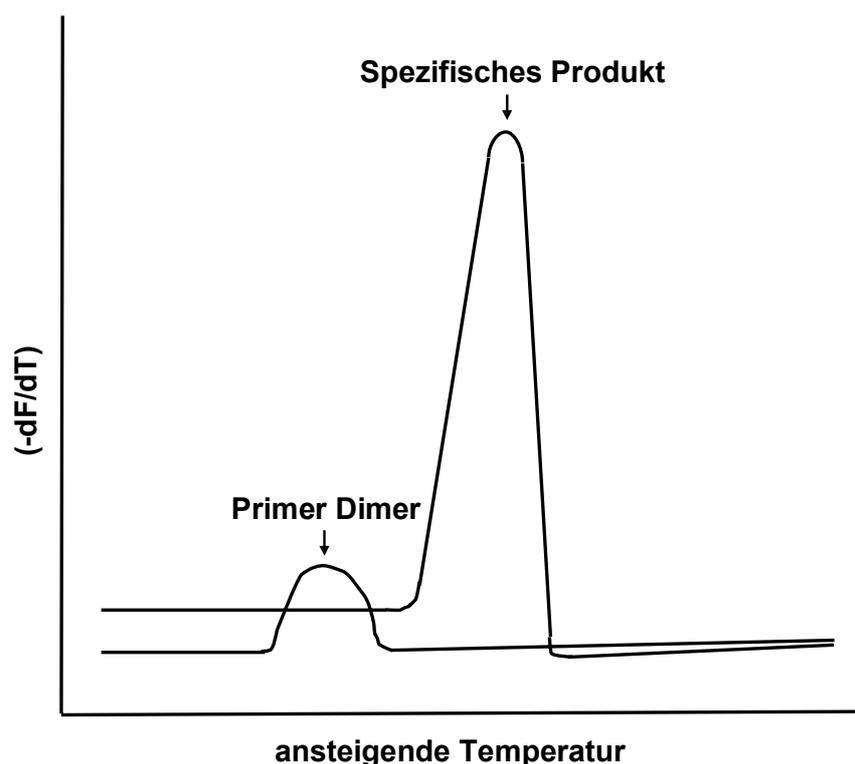


**Abb. 2: Wirkung des interkalierenden Farbstoffes SYBR-Green**

Im oberen Teil der Abbildung sind cDNA, Primer und der Farbstoff SYBR Green zu erkennen. Im mittleren Teil amplifiziert die Polymerase die cDNA und der Farbstoff wird eingebaut. Der letzte Teil zeigt das fortlaufende Geschehen während der Amplifizierung. Das heißt je mehr cDNA vervielfältigt wird und je mehr Farbstoff dadurch eingebaut wird, desto stärker ist die messbare Fluoreszenzintensität.

Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird ( $57^{\circ}\text{C} \rightarrow 95^{\circ}\text{C}$ ). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder in einzelsträngige Moleküle aufgetrennt, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert wird. Die Schmelztemperatur eines Fragmentes

kann einfach visualisiert werden, indem die erste negative Ableitung dieser Schmelzkurve ( $-dF/dT$ ) berechnet wird. In einer von der Software (*7300 System SDS software core application*, Version 1.3.1.) generierten Graphik dargestellt, resultiert der Wendepunkt der Schmelzkurve in einem Peak, dessen Maximum dem der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) entspricht. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Stilisierte qRT-PCR-Schmelzkurve**

In dieser Darstellung ist die Unterscheidbarkeit von spezifischen Produkten und Primer Dimeren dargestellt.

#### 4.10.1. Material

Alle Reagenzien wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

##### **QuantiTect SYBR Green PCR Kit<sup>16</sup>**

*HotStarTaq DNA Polymerase*

*QuantiTect SYBR Green PCR Puffer*

dNTPs

<i>SYBR Green I dye</i>
-------------------------

<i>ROX dye</i>
----------------

Lagerung bei -80°C (nur einmaliges Auftauen. Danach Lagerung bei -20°C)
---

### Wasser für die Molekularbiologie

**qRT-PCR Primer (5 pmol/μl)**

**cDNA (ursprünglich eingesetzte RNA-Menge 400 ng)**

**qRT-PCR-Gerät, 7300 *Real Time PCR System*<sup>2</sup>**

#### 4.10.2. Durchführung

Während der ganzen Durchführung wurde unter einer Sicherheitswerkbank mit Handschuhen und Filterspitzen gearbeitet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 5 pmol/μl eingesetzt. Eine Portion des *SYBR-Green Kits* wurde aufgetaut und dunkel gelagert und anschließend nicht wiederverwendet.

Folgendes Pipettierschema wurde durchgeführt.

Reagenz	Menge in μl
<i>Primer sense</i>	1,5
<i>Primer antisense</i>	1,5
nukleasefreies Wasser	8,5
SYBR-Green Mastermix	12,5
cDNA	1
Gesamt	25

Tab. 3: Pipettierschema eines einzelnen Ansatzes der quantitativen PCR

Von jeder Probe wurden Duplikate und je Gen eine Negativkontrolle gemessen.

In eine speziell für die qRT-PCR angefertigte 96-well-Platte wurden die Proben (25 μl pro Delle) gegeben. Die Platte wurde mit einer speziellen Folie luftdicht geschlossen und konnte im Anschluss in das qRT-PCR-Gerät gestellt werden.

Mit der dazu gehörigen Software (*7300 System SDS software core application*, Version 1.3.1.) und dem folgenden Protokoll wurde der Lauf gestartet.

Phase	Temp.	Zeit	Wdh der Phasen	Funktion
Phase 1	95°C	15 min	1 mal	Initialer Aktivierungsschritt
Phase 2	94°C	15 sec	40 mal	Denaturation
	59°C	30 sec		<i>Annealing</i>

	72°C	30 sec		Elongation
Phase 3	95°C	15 sec	1 mal	Dissoziationskurve
	57°C	30 sec		
	95°C	15 sec		

Tab. 4: Reaktionsbedingungen der quantitativen PCR

#### 4.10.3. Auswertung

Für jedes, mittels Primer Express Software generierte Primer-Paar wurde zunächst die Effizienz in der qRT-PCR geprüft. Hierzu wurde für jedes Primer-Paar eine Standardkurve auf der über 7 Verdünnungsstufen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-9}$ ) titrierten cDNA einer Hühnermilz erstellt und anschließend die Effizienz E über lineare Regression aus der Steigung m der Standardgerade im linearen Bereich nach der Formel  $E=10^{(-1/m)}$  berechnet.

Die Auswertung der qRT-PCR-Läufe mit den zu untersuchenden Proben als Matrize (*Templates*) erfolgte durch Schmelzkurven-Analyse und Berechnung der mRNA-Expressionsniveau der untersuchten Gene. Für jede Probe erhielt man einen CT-Wert, also den „*Cycle Threshold*“, der die Amplifikation beschreibt. Der Schnittpunkt der sigmoiden Kurve mit dem *Threshold Cycle* wurde dann zum Vergleich der Expressionsstärken herangezogen. Folglich entsprachen hohe CT-Werte einer geringen Menge an *Template*, da hier der Schwellenwert erst spät erreicht wurde.

Nach Mittelung der CT-Werte der Duplikate der untersuchten Proben folgte die Berechnung des  $\Delta$ CT-Wertes durch Abzug des gemittelten CTs des *Housekeeping*-Gens 18S rRNA von dem Proben-CT (Normalisierung). Der 0-Stunden-Wert wurde willkürlich als Referenzzeitpunkt gesetzt und hierauf wurden alle anderen Werte kalibriert (Kalibrierung). Dabei resultierte unter Abzug des  $\Delta$ CT-Wertes der 0-Stunden-Probe von dem erhaltenen  $\Delta$ CT-Wert der Probe der  $\Delta\Delta$ CT-Wert, der nachfolgend zur Berechnung der n-fachen Expression in die Gleichung  $2^{-\Delta\Delta CT}$  eingesetzt wurde.

#### 4.11. Salmonellen

Im Mai 2007 kam es in Fulda (Deutschland) zu einem Salmonelloseausbruch, bei dem insgesamt 263 Menschen erkrankten. Der Salmonellen-Serotyp wurde aus den betroffenen Patienten isoliert und als *S. enteritidis* indentifiziert. Zeitgleich wurden auch nahe gelegene Hühnerbestände beprobt. Bei dem hier benutzten Salmonellen-

Stamm handelt es sich um solch ein Isolat, welches aus einem Hühnerbestand nahe Fulda im Jahre 2007 isoliert wurde. Die Isolate wurden vom Robert-Koch-Institut (RKI, Postfach 650261 D -13302 Berlin) zur Verfügung gestellt. Dementsprechend ist die Stamm-Nummer auf die Nomenklatur des RKIs zurückzuführen.

#### 4.11.1. Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende zwei Salmonellenstämme verwendet:

- 1) Genotyp: *Salmonella enterica ssp. enterica*

Lysotyp 4/6

Ribotyp IC

KTSC-Nr.: 4966, Stamm 07-05689

Isolat: Haushuhn

- 2) identisch mit 1), allerdings mit grün fluoreszierendem Protein (GFP, engl.: *green fluorescent protein*) transformiert.

#### 4.11.2. Einfrieren der Salmonellenstämme

##### Material

##### LB-Broth-Medium<sup>2</sup>

25 g	Lysogeny Broth (LB) Medium
ad 1 000 ml Aqua dest.	

##### Glycerol<sup>11</sup>

Lagerung bei RT
-----------------

##### Durchführung

Zum Einfrieren der Salmonellen werden 800 µl der in LB-Broth-Medium aufgenommenen Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren.

### 4.11.3. Invasionsassays

#### Material

##### Salmonellen Serovar

Gelagert bei -80°C

##### Makrophagenkultur

##### LB-Agar-Platten nach Lennox<sup>18</sup>

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl
15 g/l	Agar-Agar
pH-Wert bei 7,0	

##### Gentamicin<sup>11</sup>

Zwei verschiedene Konzentrationen: 10 und 50 µg/ml

Lagerung bei -20°C

##### LB-Broth-Medium nach Lennox<sup>18</sup>

##### Triton-X-100<sup>11</sup>

0,1%ig

##### RPMI-Medium<sup>5</sup>

8 %	Fetales Rinderserum (FBS, engl.: <i>fetal bovine serum</i> ) <sup>5</sup>
2 %	Hühner Serum (chS, engl.: <i>chicken serum</i> ) <sup>5</sup>
1 %	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>3</sup> (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
Lagerung bei -20°C	

##### Drigalski-Spatel

##### Impfösen

## Durchführung

Die primären Hühnermakrophagen wurden wie unter Punkt 4.2 gewonnen. 72 Stunden nach der Präparation fand der Assay statt.

Am Vorabend eines Invasionsassays mussten die Bakterien zunächst auf einer Agarplatte wachsen. Sie wurden mit Hilfe einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium überführt und bei 37°C mit 500 Umdrehungen bei aeroben Bedingungen inkubiert. Nach ca. 4 Stunden wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen ( $OD_{600}$ ). Aus vorherigen Versuchen war bekannt, dass eine  $OD_{600}$  von 2 einer Salmonellenzahl von etwa  $1 \times 10^9$ /ml entspricht.

Es wurden MOIs von 0,5 bis 10 ausgetestet. Die tatsächlich benutzte MOI konnte in den Invasionsassay erst am Ende des Experimentes errechnet werden, indem parallel zum Invasionsassay Salmonellensuspensionen in einer Verdünnungsreihe ausgestrichen wurden und am nächsten Tag auf die ursprüngliche Bakterienzahl rückgerechnet werden konnte.

Nachdem die Makrophagenkultur infiziert worden war, wurden die Zellen für 10 min bei 250xg in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert, damit die Salmonellen zeitgleich die adhärennten Makrophagen erreichten, um möglichst konstante und somit repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Im Anschluss daran wurden sie für 30 min bei 40°C inkubiert, worauf eine Gentamicin-Behandlung folgte, die alle sich noch extrazellulär befindlichen Salmonellen tötete. Zuerst wurde das bakterizide Antibiotikum für eine Stunde in einer Konzentration von 50 µg/ml und anschließend in einer Erhaltungsdosis von 10 µg/ml eingesetzt.

Die Rückgewinnung der intrazellulären Salmonellen erfolgte je nach Versuchsaufbau zu unterschiedlichen Zeiten, nach 1,5 Stunden fand jedoch der erste Mediumswechsel statt, da die Gentamicin-Konzentration nach genannter Zeit erniedrigt wurde. Geerntet wurden die Makrophagen, indem sie nach dreimaligem Waschen mit PBS mit Triton-X-100 mit einem Zellschaber abgekratzt wurden. Die Suspension wurde in einem Reaktionsgefäß aufgenommen und auf Agarplatten mit Hilfe eines abgeflamnten Drigalski-Spatels ausgestrichen. Die Bakterien wurden in einem 5fachen Ansatz ausgestrichen, um einen repräsentativen Mittelwert zu erhalten.

Alle Agarplatten wurden nach dem Ausplattieren über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten die rückisolierten Salmonellen, die sich mittlerweile zu mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien vermehrt haben, gezählt werden. Daraufhin folgte die Auswertung des Invasionsassays.

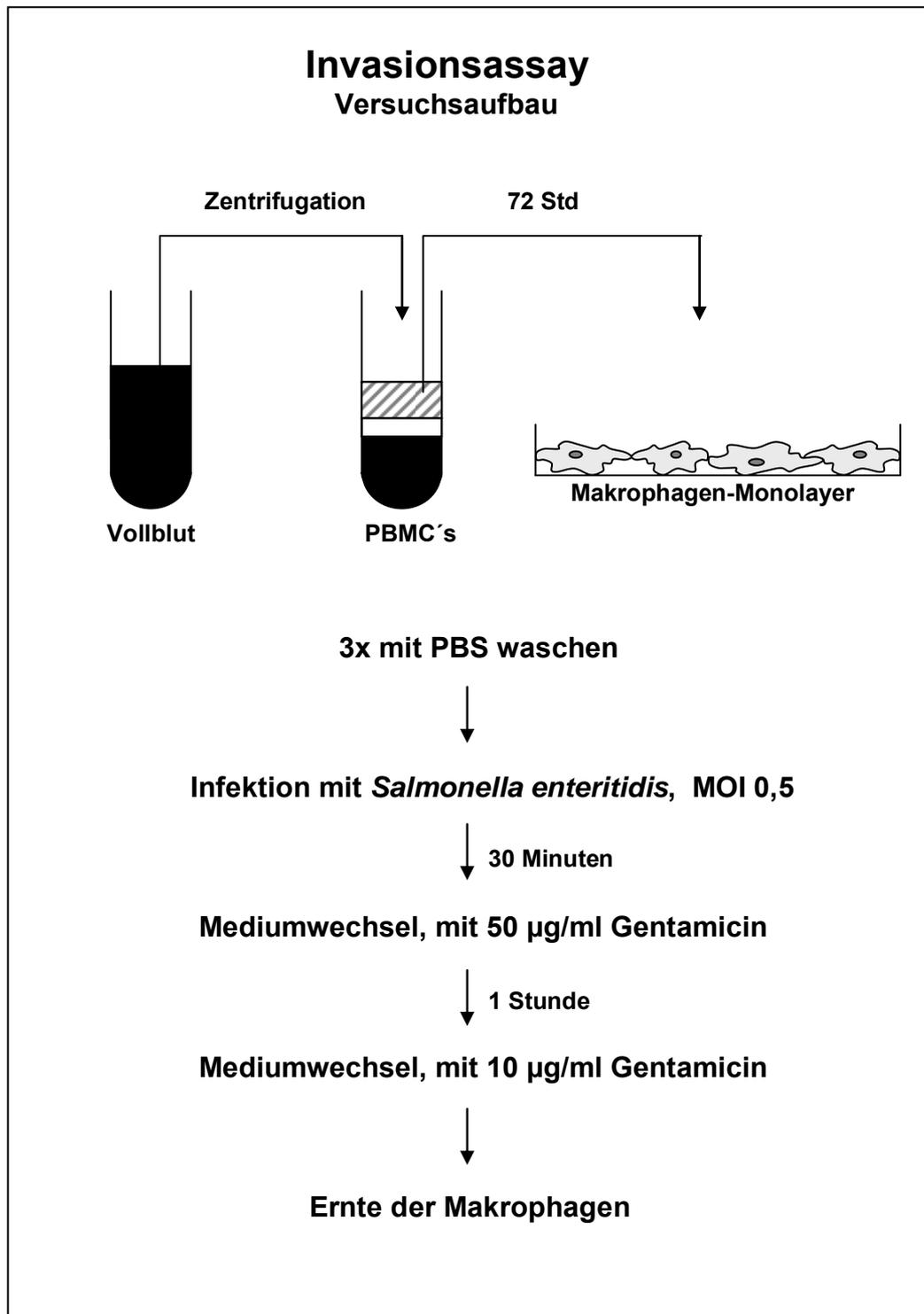


Abb. 4: Versuchsaufbau eines Invasionsassays

## Auswertung

Zum einen konnte nun mit Hilfe der durch einen Dreisatz errechneten tatsächlich benutzten MOI und zum anderen durch die ausgezählten Kolonien die Invasion bzw. das Wachstum errechnet werden.

### 4.11.4. Stimulation durch LPS und IFN- $\gamma$

#### Material

##### Lipopolysaccharid (LPS)<sup>19</sup>

Konzentration: 10  $\mu\text{g/ml}$ , Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

##### Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (1:100)

In COS-Zellen exprimiertes Hühner IFN- $\gamma$ . Hierbei handelt es sich um zytokinhaltigen Zellkulturüberstand. Nach Titration hat sich eine 1:100 Verdünnung als optimal für die Makrophagenaktivierung erwiesen.

Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

#### Durchführung

Makrophagen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben isoliert und kultiviert. Die Kulturen wurden zeitgleich mit der Isolation mit LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) und IFN- $\gamma$  (Zellkulturüberstand 1:100, nähere Beschreibung der Konzentration siehe 4.11.4) stimuliert. Diese Konzentration wurde konstant so auch nach Waschvorgängen aufrecht erhalten.

## 4.12. Microarrayanalysen

Zur Analyse der Proben der vorliegenden Arbeit wurden die Agilent Oligonukleotid Microarrays, die näher ab Punkt 4.12.1 erläutert werden, verwendet.

### 4.12.1. Agilent Microarray

Die von Agilent hergestellten Arrays können in unterschiedlichen Formaten produziert werden. Für die vorliegende transkriptomische Untersuchung wurde der „Agilent 4x44 K chicken-Genom“ Katalog-Array verwendet. Dieser erlaubt die gleichzeitige Analyse von 4 Proben mit je 44 000 Spots auf einem Slide. Jeder Spot repräsentiert eine aus 60 Nukleotiden (auch Oligonukleotid oder 60mer genannte) bestehende Sequenz, die

mit einem speziellen Druckverfahren auf einen Glasträger synthetisiert wurde.

#### 4.12.2. Custom (dt.: Kunde) array

Einerseits kann ein Agilent-Array vorgefertigt mit allen bekannten Hühnergenomsequenzen bestellt werden, andererseits kann es mit Sequenzen, individuell an eigene Fragestellungen angepasst, erweitert werden.

In dem online verfügbarem Programm „eArray“ wurden *GenIDs* oder Nukleotidsequenzen der Gene geladen und durch spezielle Algorithmen für das Gen spezifische Oligonukleotide berechnet. Für die Gestaltung der hier genutzten *chicken*-Immun-Arrays wurden 1 699 zusätzliche Gene, die speziell Funktionen des Immunsystems zuzuordnen sind, auf das Array synthetisiert.

#### 4.12.3. Annotation

Das hier verwendete „*Agilent 4x44K chicken-Genom*“ Katalog-Array besteht aus 44 000 spots, das heißt aus 44 000 aus 60 Nukleotiden bestehenden Sequenzketten. Von dem Hersteller Agilent war jeder Sequenz eine Nummer, die sogenannte *ProbeID*, zugeordnet. Doch von den 44 000 Sequenzen bzw. *ProbeIDs* waren lediglich ca. 6 000 einer Gen- oder Protein-IDs zugeordnet. Um funktionelle Aussagen über die Genregulation treffen zu können, muss diese Information allerdings vorliegen. Deshalb wurde mit folgenden Datenbanken und dem Programm *ID Converter* die Liste der annotierten Gene des Huhnes erweitert.

### Material

**ENSEMBL cDNA Datenbank [120]**

**mRNA Datenbank von NCBI, *genome* [121]**

**cDNA Datenbank von GenScan [122]**

**EST Datenbank von NCBI [123]**

**DAVID (ID Converter) [124]**

**Babelomics (ID Converter) [125]**

**G:Profiler (ID Converter) [126]**

## Durchführung

Für die Annotation der Arrays ermöglichte eine eigens für das Projekt FBI-Zoo entwickelte Blast-Software den Abgleich der Oligosequenzen mit der NCBI Hühnergenom-Datenbank. Zudem wurde ein Abgleich mit oben genannten Datenbanken durchgeführt, die freundlicherweise vom Genzentrum der LMU München mittels automatisierter BLAST-Suche unterstützt wurde. Ergänzend wurden die Daten auch gegen das im Verlaufe der Arbeit verfügbar gemachte Zebrafink-Genom geblastet.

Genom- und Protein-IDs wurden mit Hilfe der genannten online *ID-Converter* (dt.: Umwandler) in offizielle Gensymbole umgewandelt.

### 4.12.4. cDNA Synthese

#### Material

**One-Color Spike-In-Kit<sup>1</sup>**

**Quick Amp Labeling Kit, one color<sup>1</sup>**

#### Durchführung

Als positive Kontrolle des gesamten Arbeitsablaufs bis zur Hybridisierung der Arrays wurden der RNA *sogenannte Spike-In-RNAs* zugesetzt. Diese bestehen aus 10 definierten Transkripten mit minimaler Selbst- und Kreuz-Hybridisierung (*in vitro* synthetisierte Adenovirus E1A Gen Derivate). Diese RNA Fragmente wurden mit der zu untersuchenden RNA weiter prozessiert (cDNA und cRNA Synthese) und binden bei der Hybridisierung an spezifischen *Spike-In-Probes*, welche speziell entwickelt wurden, so dass sie keine komplementären Sequenzen zu biologischen Replikaten aufwiesen.

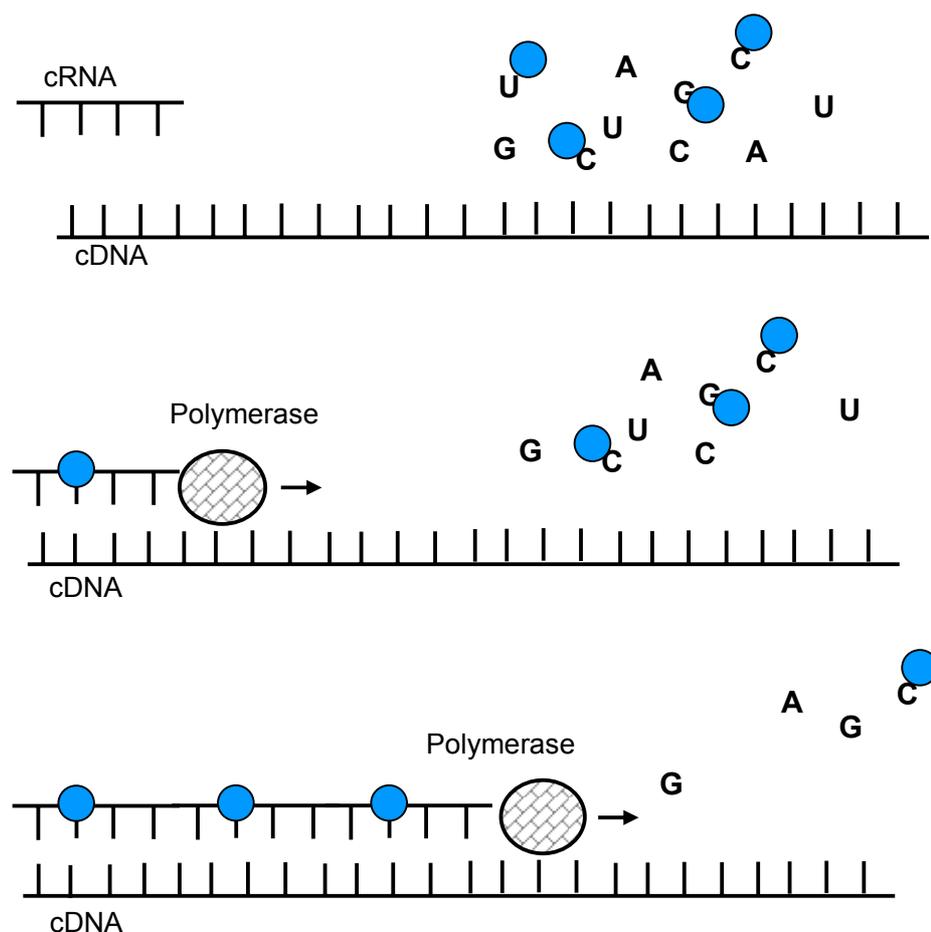
Die benötigte Gesamt-RNA-Menge von 500 ng wurde nach Angaben des Herstellers mittels einer rekombinanten reversen Transkriptase 1:1 in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase wurden T7-Promotor-Primer eingesetzt. Sie binden an poly-Adenosin RNA Abschnitte (poly-A-Schwanz der mRNA).

#### 4.12.5. cRNA Synthese

##### Material

##### Quick Amp Labeling Kit, one color<sup>1</sup>

Während der cRNA Synthese kam es neben der Umschreibung von cDNA in cRNA auch zu einer Amplifikation durch die T7-RNA Polymerase. Dabei wurden in die neu synthetisierte cRNA spezielle Nukleotide eingebaut, die zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. In vorliegender Arbeit wurden Cytosintriphosphate (CTP) verwendet, die mit einem Polymethin-Farbstoff, dem Cyanine3 (Cy3), gekoppelt wurden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, lediglich die Inkubations-Zeit bei 40°C wurde von 2 Stunden auf 2 ½ Stunden erhöht.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Einbaus von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden in die cRNA**

Mit Cyanine 3 (Cy3), welches ein fluoreszierender Farbstoff ist, markierte cRNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Polymerase in den neusynthetisierten kompletären cDNA-Strang eingebaut.

#### 4.12.6. Aufreinigung und Bestimmung der spezifischen Cy3 Aktivität

##### Material

###### RNeasy Mini Kit<sup>1</sup>

Um Rückstände aus den vorausgegangenen Reaktionen (Pyrophosphate, Enzyme, nicht gebundene Cy3-CTP) aus den Proben zu entfernen, wurde nach den Angaben des Herstellers eine Silikatmembran basierte Aufreinigung der cRNA durchgeführt.

Zur Bestimmung der Gesamt-cRNA Ausbeute und der spezifischen Cy3-Aktivität wurden die jeweiligen Absorptionen der Proben im NanoDrop gemessen. Die gemessene Cy3 Konzentration wird in pmol/µl angegeben und wurde zur Gesamt-cRNA Menge, die in µg vorlag, ins Verhältnis gesetzt. Hieraus ergab sich die spezifische Cy3 Aktivität. Als Ausschlusskriterium für die weitere Verwendung der cRNA wurde eine cRNA-Gesamtmenge von mindestens 1,65µg und eine spezifische Cy3 Aktivität von über 9,0 pmol Cy3 pro µg cRNA festgelegt.

#### 4.12.7. Fragmentierung der cRNA

##### Material

###### Gene Expression Hybridisation Kit<sup>1</sup>

##### Durchführung

Zur Optimierung der Hybridisierungskinetik müssen die cRNA Stränge nach Angaben des Herstellers fragmentiert werden. Um dies standardisiert zu erreichen, wurde jeder Probe (1,65 µg cRNA) einzeln ein Fragmentationspuffer zugegeben und exakt 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Durch Hinzufügen des Hybridisierungspuffers wurde die Fragmentation gestoppt und die Probe in ein geeignetes Medium für die Hybridisierung überführt.

#### 4.12.8. Hybridisierung der Arrays

##### Material

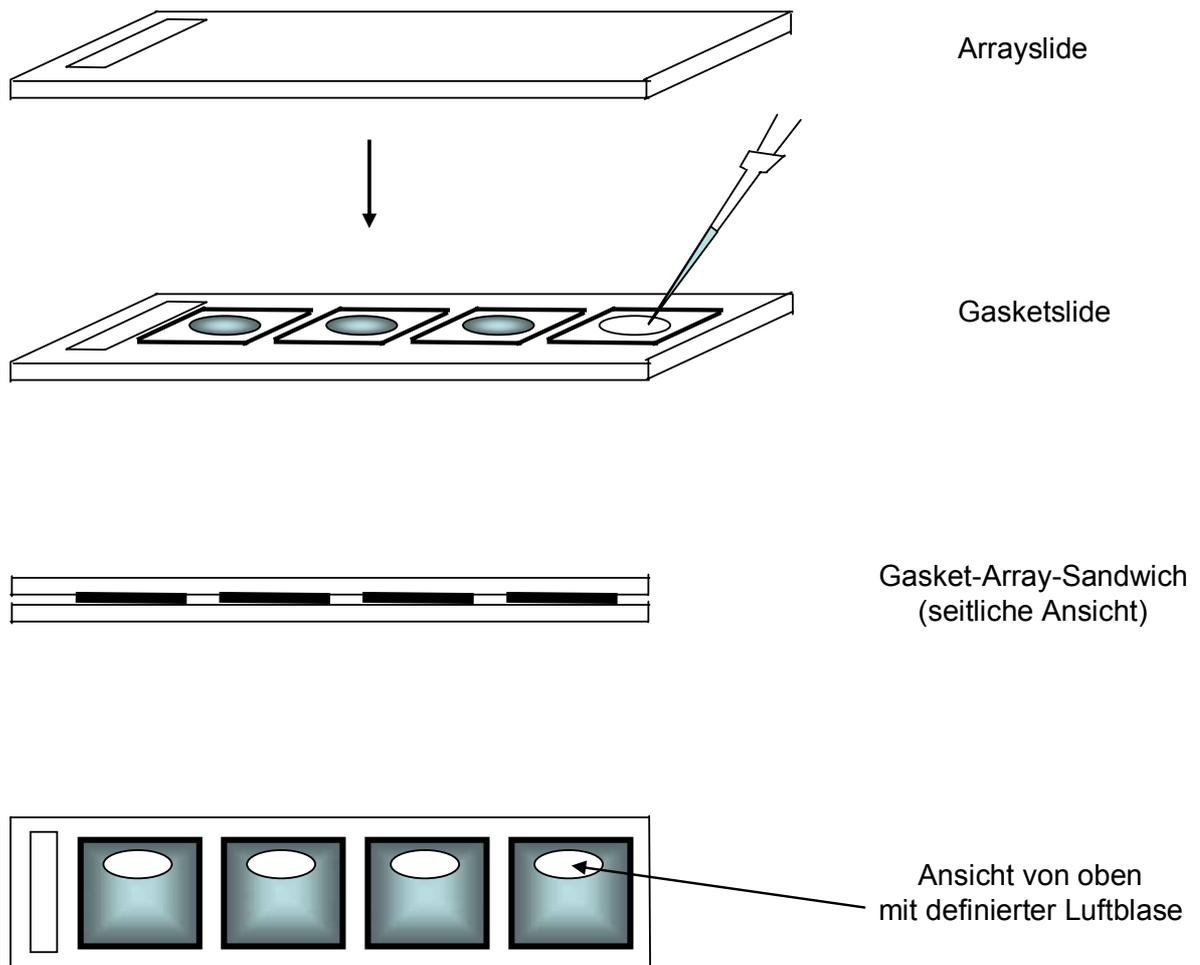
###### Gasketslides<sup>1</sup>

## Durchführung

Zur Hybridisierung wurden 100 µl der Hybridisierungsflüssigkeit mit dem Array inkubiert.

Alle Arbeitsschritte wurden mit puderfreien Handschuhen durchgeführt, *Slides* durften nur seitlich berührt werden und die Luftexposition der Arrays wurde durch rasches Arbeiten minimiert.

Zunächst wurde in eine Hybridisierungskammer ein *Gasketslide* eingelegt. Dabei handelt es sich um einen Glasträger auf dem entsprechend dem Arrayformat 4x44K angepasst ringförmige Gummidichtungen aufgebracht sind. Die Hybridisierungsflüssigkeit wurde mittig in diesen Gummiring pipettiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass der Dichtungsring keinen Kontakt zur Flüssigkeit hatte. Durch Auflegen eines Arrayslide entstand zwischen den beiden Glasträgern ein durch den Gummiring abgedichteter Raum (*Gasket-Array-Sandwich*). Nach dem Schließen der Hybridisierungskammer wurde kontrolliert, ob die gesamte Arrayfläche vollständig benetzt wurde, damit keine immobilen Luftblasen die gleichmäßige Hybridisierung behindern konnten. Die Arrays wurden 17 Stunden in einem Hybridisierungssofen bei 65°C und 10 rpm inkubiert, wobei durch eine einzelne mobile Luftblase und die gleichmäßige Drehung der Arrays während der Hybridisierung eine kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungsflüssigkeit gewährleistet wurde.



**Abb. 6: Aufbau eines Gasket-Array-Sandwich**

In dieser Darstellung ist ein Gasket-Array-Sandwich graphisch erläutert, worauf unter 4.12.8 näher eingegangen wurde.

#### 4.12.9. Waschen und Einlesen (Scan) der Arrays

##### Material

**Gene Expression Wash Buffer1<sup>1</sup>**

**Gene Expression Wash Buffer2<sup>1</sup>**

**Triton X-102<sup>1</sup>**

Die Waschschritte dienen der Entfernung von nicht gebundenen cRNA Fragmenten. Aufgrund der besonderen Oberflächeneigenschaften der Glasträger ist keine weitere Behandlung wie Trocknen oder Fixieren notwendig.

Nach Entnahme der hybridisierten Arrays aus dem Hybridisierungssofen wurde das

*Gasket-Array-Sandwich* aus der Hybridisierungskammer gehoben und in ein Bad mit 500 ml Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur (RT) verbracht. Mit einer Pinzette wurden Array und *Gasketsilde* voneinander getrennt. Danach wurden die Arrays in einen Glasträgerhalter gestellt, der sich bereits in einem Bad mit 500 ml Waschpuffer1 bei RT befand. Diese Schritte wurden für drei weitere Arrayglasträger wiederholt. Der Glasträgerhalter mit den Arrays wurde daraufhin für 1 min in ein Bad mit 500 ml Waschpuffer2 bei einer Temperatur von 31°C gegeben. Anschließend wurde der Glasträgerhalter langsam aus der Flüssigkeit herausgezogen, damit durch gleichmäßiges Abfließen Waschpufferrückstände vermieden werden konnten.

Nach Einlegen der Arrays in spezielle Halterungen wurden diese im Agilent G2505C Scanner bei einer Auflösung von 3 µm gescannt.

## **4.13. Software zur Auswertung der Microarrays**

### **4.13.1. Auswertung durch die Agilent Feature Extraction Software**

Die *Feature Extraction Software*, Version 10.5.1.1, wurde zum Einlesen und Prozessieren der Bilddatei des Scans genutzt, so dass die Daten den weiteren Analysen zugänglich wurden. Durch ein Raster, welches auf jedes Array gelegt wurde, konnte jedem „*Feature*“ der Agilent Probe ein Identifikator (*ProbeID*) zugeordnet werden. Zudem ermittelte die Software die *Feature*-Signalintensität und rechnet diese in einen Zahlenwert um. *Features*, die ein abnormes Muster zeigten, wurden erkannt und somit von weiteren Analysen ausgeschlossen. Durch die mitgeführten RNA *Spike-Ins* berechnete das Programm für jedes Array einen Qualitätsreport. Dieser Report ermöglichte den gesamten Arbeitsablauf, von der Probenpräparation über die Fluoreszenzmarkierung bis hin zur Hybridisierung, bezüglich der Qualität und Reproduzierbarkeit zu evaluieren (Probendegradation, Waschartefakte oder Ozonexposition). Ebenfalls über die *Spike-In-Probes* wurden der lineare Bereich der Quantifikation sowie die Nachweisgrenze und der Punkt der Sättigung errechnet.

### **4.13.2. Auswertung durch die Software Bioconductor „R“ v2.9.1**

Das Programm „R“ bietet eine Programmiersprache und eine umfangreiche statistische Ausstattung zur Datenanalyse und graphischen Auswertung. Durch ergänzende Erweiterungspakete wurde das Programm speziell an die

Analysevoraussetzungen von Microarraydaten angepasst.

Mittels „R“ wurden die Daten einer VSN (*Variance Stabilization and Normalization*) Normalisierung unterzogen. Anschließend erfolgte durch das Genplotter-Paket eine graphische Darstellung der Arrays in einer *heatmap*. Die VSN Normalisierung basiert auf der Annahme, dass Microarraydaten aufgrund der Signalintensität variieren, und eine Transformation gefunden werden kann, nach der die Varianz annähernd konstant ist. Durch die VSN Normalisierung werden die Expressionsdaten logarithmiert (natürlicher Logarithmus).

Als Eingabedatei wurde eine *tabstop* getrennte Textdatei mit den *gProcessedSignal* Werten von allen Arrays verwendet.

#### **4.13.3. Auswertung durch die Software SAM**

*Significance Analysis of Microarrays* (SAM), Version 3.08, ist eine statistische Methode, um in Microarrayexperimenten signifikant regulierte Gene zu identifizieren. Durch wiederholte Permutationen der Daten wurde bestimmt, ob die Expression eines Gens gegenüber einer Kontrolle im Vergleich zu einem anderen Infektionszeitpunkt signifikant verändert ist. Das Limit der Signifikanz wurde auf Basis der „*False Discovery Rate*“ (FDR) festgelegt. Anhand der „*Response variable*“ wurden die Arrays entsprechend dem experimentellen Ansatz in Gruppen eingeteilt. In vorliegendem Experiment wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Analyse ausgewählt.

Mittels der „*Two class, unpaired*“ Auswertung konnten zwei Gruppen mit unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. Zum Beispiel ein Infektionszeitpunkt mit einem anderen (*two class*), wobei jeder dieser Zeitpunkte mehrere biologische Replikate umfasste (*unpaired*). Eine „*Two class, unpaired*“ Auswertung wurde für nicht infiziert gegen 5 Std p.i., 5 Std p.i. gegen 12 Std p.i., 12 Std p.i. gegen 24 Std p.i. und schließlich 24 Std p.i. gegen 48 Std p.i. durchgeführt.

Eine „*Multiclass*“ Analyse bietet die Möglichkeit, signifikante *Probes* in mehreren Gruppen zu finden, wobei auch hier ungepaarte Proben eingesetzt wurden. Für diese Experimente wurde eine „*Multiclass*“ Analyse über alle fünf Zeitpunkte (nicht infiziert, 5 Std p.i., 12 Std p.i., 24 Std p.i., 48 Std p.i.) durchgeführt.

Als Eingabedatei diente ein Exceltabellenblatt mit der *ProbeID* und den normalisierten *gProcessedSignal* Werten. Zudem wurde in der zweiten Zeile eine Kennzeichnung

der „*Response variable*“ eingefügt. Für „*Two class, unpaired*“ wurden die zu vergleichenden Gruppen als 1 und 2 beziffert, in der `Multiclass` Analyse mit 1, 2, 3, 4 und 5.

#### 4.13.4. Berechnung der Expressionsänderung (*fold change*)

Der *fold change* (FC) ist eine mathematische Operation, die wiedergibt wie stark zwei Variablen voneinander differieren. Dabei wurden die Expressionsdaten einer Gruppe 2 ins Verhältnis zu einer Gruppe 1 gesetzt, womit die Expressionsänderung von Gruppe 2 relativ zur Gruppe 1 dargestellt werden konnte.

Die Berechnung des FC erfolgte in einem Microsoft Excel Tabellenblatt. Als Ausgangswerte wurden die normalisierten und damit logarithmierten gProcessedSignale in eine Tabelle eingefügt. Zum Errechnen des FC wurde folgende Formel verwendet:

$$FC=EXP(MITTELWERT(Gruppe2)-MITTELWERT(Gruppe1))$$

Ein Wert von 1 bedeutet, dass keine Unterschied zwischen den Infektionszeitpunkten besteht. Werte über 1 stehen für eine höhere Expression in der Gruppe 2, während ein Wert unter 1 eine Herunterregulation gegenüber der Gruppe 1 indiziert.

Zur besseren Interpretation der herunter regulierten FC-Werte wurde folgende Excel Funktion durchgeführt:

$$=WENN(FC<1;-1/FC;FC)$$

Eine WENN-Funktion gliedert sich in drei sogenannte Argumente.

Prüfung: steht für die Bedingung → WENN der FC kleiner 1 ist.

Dann-Wert: Was tun, wenn die Prüfung stimmt? → Nehme -1 geteilt durch den FC-Wert.

Sonst-Wert: Was tun, wenn die Prüfung nicht stimmt? → Belasse den FC-Wert unverändert.

Als Ergebnis bleiben FC-Werte größer oder gleich 1 unverändert, während bei Werten kleiner 1 der negative Kehrwert des FC gebildet wurde. Damit entsprach ein FC von 0,5 nach folgender Umrechnung:

$$X= -1/0.5 = \underline{-2}$$

und damit einer 2fachen verminderten Expression des Gens.

#### **4.13.5. Anwendung der Microsoft Office Access 2003 Datenbanksystem**

Microsoft Access wurde verwendet, um Daten aus verschiedenen Analysen in direktem Vergleich gegenüber zu stellen und Eingabedateien für weitere Analysen zu erstellen.

Als Beispiel wurden die Ergebnisse der Signifikanzanalyse (SAM), der berechneten Expressionsänderung (*fold change*) und den normalisierten Expressionsdaten (R) in einer Abfrage kombiniert. Durch Anlegen von Filterfunktionen konnten aus dieser Abfrage neue Tabellen generiert werden, in welcher nur Gene mit einem mindest *fold change* von x und einer *false discovery rate* von y % aufwiesen. Durch Kombination dieser Daten mit den normalisierten Expressionswerten wurden Eingabedateien für weitere Analysen anfertigt.

#### **4.13.6. Auswertung durch die Software Pathway Express**

Das online Programm Pathway Express (Intelligent Systems and Bioinformatics Laboratory, Department of Computer Science, Wayne State University, Detroit) kann Gene darauf prüfen, ob sie in einem bekannten Signalweg vorkommen. Dazu greift das Programm auf die KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Datenbank zu.

Als Eingabedatei („*input file*“) wurde eine Textdatei mit dem homologen humanen Gensymbol und dem FC von allen signifikant regulierten Genen erstellt. Die Referenzdatei („*reference file*“) enthielt alle ortologen humanen Gensymbole die auf dem Array vorhanden sind.

Über ein Internet Portal wurden die Daten in das Programm geladen. Die Ergebnisse wurden als textformatierte Dateien gespeichert.

Der *Impact* Faktor der zu jedem Signalweg angegeben wurde, spiegelt die Eindeutigkeit der enthaltenen Gene und deren Lage im Signalweg wieder. Aus der errechneten Signifikanz der Signalwege (engl.: *probability-value*, p-Wert), dem FC und dem *Impact* Faktor berechnete das Programm einen korrigierten gamma p-Wert (engl.: *corrected gamma p-value*). Als Grenzwert für die biologische Relevanz des Signalwegs wurde ein *corrected gamma p-value* von kleiner 0,25 festgelegt.

Die Graphiken zu den Signalwegen wurden über die Webseite der KEGG Datenbank abgerufen.

#### **4.13.7. Auswertung durch die Software Expander**

Die Expander Software ist eine auf Java basierende Anwendung zur Analyse von Genexpressionsdaten. Im Besonderen wurden Clusteranalysen und weiter folgende Anreicherungs-Analysen, wie *gene-ontology* und Transkriptionsfaktorenanalyse in diesem Programm durchgeführt.

Folgende Analysen wurden immer vergleichend zwischen zwei Infektionszeitpunkten durchgeführt.

Als Eingabedatei wurde eine *tabstop* getrennte Textdatei erstellt. Dafür wurden die *ProbeIDs* von allen auf dem Array vorhandenen *features* mit den jeweils dazu gehörenden normalisierten *gProcessedSignal* und dem entsprechenden Gensymbol aufgelistet. Die Konversionsdatei wurde aus allen *ProbeIDs* und den zu diesen zugeordneten *Ensembl Gene IDs* erstellt.

Zunächst wurden die Daten einer Medianisierung unterzogen (*Mean 0 and Variance 1*) und ein t-Test auf Basis der FDR (engl.: *false discovery rate*) durchgeführt (*p-value* kleiner 0,01).

Durch eine Clusteranalyse wurden Gene, die ein ähnliches Expressionsverhalten zeigten, in Gruppen (engl.: *cluster*) unterteilt. Ein gutes Cluster sollte zwei Kriterien erfüllen: eine hohe Homogenität der Gene innerhalb des Clusters und eine klare Abgrenzung zu anderen Clustern.

Zur funktionellen Analyse wurden die Gene der Cluster anhand der *Esemble GeneID* in funktionelle Gruppen unterteilt (*Gene Ontology*, GO). Für diese Analyse wurde die TANGO Software von Expander eingesetzt, die für jede funktionelle Gruppe einen empirischen p-Wert berechnet.

#### **4.13.8. Auswertung durch die Software MEV**

Die Software *Multi Experiment Viewer* (MEV), Version 4.5.1, bietet die Möglichkeit mehrere in einem Experiment erstellte Gruppen gemeinsam auszuwerten. Mittels MEV wurden Clusteranalysen über die Gruppe mit nicht infizierten Tieren (entspricht Infektionszeitpunkt 0) und alle 4 Infektionszeitpunkte erstellt und graphisch

ausgewertet.

In die Analyse wurden die in SAM *Multiclass* signifikant regulierten Gene eingesetzt, die einen FC von mindestens +/-2 zeigten. Für eine korrekte Darstellung der Expressionswerte wurden diese über alle Infektionszeitpunkte gemittelt. Die normalisierten und logarithmierten *gProcessedSignal* Werte wurden mit dem zugehörigen *ProbeID* in einem Excel Tabellenblatt (Tabelle1) zusammengestellt. Ein zweites Tabellenblatt wurde nur mit den Überschriften und den *ProbeIDs* erstellt. Im ersten Datenfeld des zweiten Tabellenblatts wurde folgende Formel eingegeben:

$$=Tabelle1!B2-MITTELWERT(Tabelle1\$B2:\$x2)$$

(wobei x der letzten Datenspalte in der ersten Tabelle entspricht)

Dadurch wird der Mittelwert aller *gProcessedSignals* eines *features* von jedem Einzelwert dieses *features* subtrahiert. Ein negativer Wert bedeutet, dass die Signalintensität unter dem Durchschnitt aller Signalintensitäten dieses *features* liegt. Diese Formel wurde auf den gesamten Datenbereich kopiert.

Als Eingabedatei wurde eine *tabstop* getrennte Textdatei erstellt, die die *ProbeID* mit Gensymbol und die nun auch gemittelten *gProcessedSignals* enthielt.

Zunächst wurde eine hierarchische Cluster-Analyse (*Hierarchical Clustering HLC, sample tree*) der Probenarrays durchgeführt (Metrik: *Pearson correlation*, Iterationen: 100). Anhand der resultierenden Graphik lies sich abschätzen wie ähnlich sich die Proben innerhalb eines Zeitpunktes beziehungsweise die Zeitpunkte zu einander sind. Die baumartige Darstellung zeigt je nach Entfernung der Knotenpunkte zueinander, wie eng sich die Beziehung zwischen den verglichenen Proben darstellt.

Um Gene mit ähnlichen Expressionsmuster zu clustern, wurde eine *Self Organizing Tree Algorithm* (SOTA) Analyse durchgeführt (Metrik: *Pearson correlation*). SOTA erstellt ein Dendrogramm (binärer Baum) in welchem jeder Endpunkt einem Cluster gleichsteht. Die Einstellungen des Programms müssen dabei abhängig von Anzahl der Gene und deren Diversität angepasst werden. Die Option „*max. Cycles*“ repräsentiert die maximale Anzahl an Iterationen, die erlaubt sind. Die Anzahl der erhaltenen Cluster entspricht der „*max. Cycle*“ +1. Die „*max. Cell Diversity*“ gibt die maximal erlaubte Diversität in einem Cluster an. Ergänzend gibt „*min. Epoch Error Improvement*“ einen Grenzwert für den Beginn eines neuen Zyklus und damit der Aufspaltung in ein neues Cluster an.

## 4.14. Histologie

In vorliegender Arbeit wurden zwei histologische Methoden angewandt: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und Giemsa-Färbung.

### 4.14.1. Material für die HE-Färbung

#### In Paraffin fixierte Proben

#### Macrosetten

#### Einbettenschälchen

#### Neutral gepufferte Formalin Lösung (NPF)

100 ml	Formalin (37%ig) <sup>2</sup>
4 g	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) <sup>2</sup>
6,5 g	Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) <sup>2</sup>
ad 1 Liter Aqua dest.	
Lagerung bei RT	

#### Ethanol-Lösung (40%, 50%, 60%, 70%, 96%)

entsprechend 99 % Ethanol ad 1 Liter Aqua dest. <sup>2</sup>
Lagerung bei RT

#### 99%ige Ethanol-Lösung<sup>2</sup>

Lagerung bei RT
-----------------

#### Isopropanol<sup>2</sup>

Lagerung bei RT
-----------------

#### Xylol<sup>2</sup>

Lagerung bei RT
-----------------

#### Paraffin 1, 3, 6 und 9<sup>18</sup>

Lagerung bei 60°C
-------------------

#### SuperFrost®Plus Objektträger<sup>10</sup>

**Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)**

40 g	Natriumchlorid (NaCl) <sup>2</sup>
5,75 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>
1 g	Kaliumchlorid (KCL) <sup>2</sup>
1 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>
ad 1 Liter Aqua dest.	
Lagerung bei RT	
pH 7,2	

**Mayer´s Hematoxilin Solution<sup>2</sup>**

Lagerung bei RT
-----------------

**Eosin-Lösung**

0,5 g	Eosin <sup>2</sup>
ad 100 ml 70%igen Ethanol <sup>2</sup>	
Lagerung bei RT	

**Eukitt® Eindeckelmedium<sup>19</sup>**

Lagerung bei RT
-----------------

**Deckgläser<sup>13</sup>****4.14.2. Material für die Giemsa-Färbung****In Paraffin fixierte Proben****Giemsa-Lösung**

10 ml	Giemsa-Stammlösung <sup>14</sup>
ad 170 ml Pufferlösung	

**Pufferlösung**

16 ml	Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>
32 ml	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>2</sup>

ad 952 ml Aqua dest.
----------------------

pH 5 und filtrieren
---------------------

#### **4.14.3. Gewinnung von Organen und Vorbereitung für die Histologie**

Wie unter Punkt 5.5.1 ausführlich erklärt fanden in dem *in vivo* Experiment vorliegender Arbeit SPF-Hühner (engl.: *specific pathogen free*) im Alter von 8 Wochen Verwendung. Die Tiere wurden nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Nach Eröffnung des Abdomens wurden sowohl die Milz als auch die beiden Caeca und Caecaltonsillen entnommen. Die Milz wurde zuerst entnommen, um die Sterilität der Körperhöhle zu nutzen. Die Caeca wurden der Länge nach eröffnet und in PBS gewaschen. Die Caecaltonsillen wurden ausgeschnitten. Alle Arbeiten zur Organentnahme und –vorbereitung wurden mit autoklaviertem Besteck durchgeführt. Es wurden Proben sowohl für Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) als auch für die Giemsa-Färbung gewonnen. Dieser Versuch fand in Berlin statt, die histologische Weiterbearbeitung der Proben erfolgte am eigenen Institut in München.

Für die HE- und die Giemsa-Färbungen wurden die Organe sofort in für die Histologie geeignete Einbettkästchen in 4%igem Formalin fixiert.

In München wurden die Organe in Paraffin eingebettet und bis zur Weiterverarbeitung bei RT gelagert.

#### **4.14.4. Anfertigung der Schnitte**

Es wurden Paraffinschnitte für die Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Giemsa-Färbung hergestellt.

#### **Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die Anfertigung der 2-3 µm dicken Paraffinschnitte erfolgte bei allen Organen mit dem Rotationsmikrotom HM360 der Firma Microm. Nach dem Strecken der Schnitte im 47°C warmen Wasserbad wurden sie auf Objektträger übertragen und anschließend über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei RT in speziellen Objektträgerkästen. Erst unmittelbar vor der Verwendung wurden die Präparate für 10 min in Xylol verbracht, um das Paraffin wieder aus dem Gewebe herauszulösen.

#### 4.14.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen anhand von zwei Einzelfärbungen.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Eigenschaft zu entwickeln, muss er zu Hämalaun aufbereitet werden. Hämalaun färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle acidophilen beziehungsweise basischen (eosinophilen) Strukturen rot, was vor allem die Zellplasmaproteine umfasst.

Die in 4.14.4 vorbereiteten Paraffinschnitte dienen der HE-Färbung. Die Färbungen wurden manuell nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 1.) Kernfärbung mit *Hematoxylin I* (10 min)
- 2.) Spülung mit Aqua dest.
- 3.) Bläuen in fließendem Leitungswasser (10 min)
- 4.) Gegenfärbung mit Eosin (max. 3 min)
- 5.) Nochmalige Spülung mit Aqua dest.
- 6.) Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
  - Ethanol 70%ig (bis keine Farbwolken mehr abgehen)
  - Ethanol 96%ig (2 min)
  - Isopropanol (2 x 5 min)
  - Xylol (1 x 5 min, 1 x 10 min)

Im Anschluss an die Färbung wurden die Präparate mit Eukitt<sup>®</sup>, einem Kunstharz auf Xylolbasis, fixiert und nach 24-stündiger Trocknung durchlichtmikroskopisch bei unterschiedlicher Vergrößerung ausgewertet.

#### 4.14.6. Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung liefert eine gute Darstellbarkeit von Kernstrukturen und des Zytoplasmas. Das Chromatin der Zellkerne zeichnet sich rotviolett ab, Zytoplasma und Nukleone blau. Folglich sind auch Salmonellen im Präparat gut zu erkennen.

Die Giemsa-Gebrauchslösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methyleneblau-Eosinat und Methyleneblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator und fand in 10%iger Konzentration Verwendung.

Die Färbungen wurden manuell nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1.) absteigende Alkoholreihe

Xylol (10 min)

Isopropanol (2 x 5 min)

Ethanol 96%ig (2 min)

Ethanol 70%ig (10 min)

2.) Giemsa-Gebrauchslösung (1 Stunde bei 65°C)

3.) Spülen in Aqua dest.

4.) ca. 1 sec in 0,5%iger Essigsäure differenzieren (bis zum Farbumschlag von blau nach rot)

5.) 96% Alkohol (2 sec)

6.) 100% Alkohol (2 x 2 sec)

7.) Xylol (5 min)

Im Anschluss an die Färbung wurden die Präparate mit Eukitt<sup>®</sup>, einem Kunstharz auf Xylolbasis, eingedeckelt und nach 24-stündiger Trocknung lichtmikroskopisch bei unterschiedlicher Vergrößerung ausgewertet.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit dem Zeiss Axioskop. Fotos wurden mit der AxioCam MRc5 und der Axiovision 4.8 -Software gemacht.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Etablierung einer primären Hühnermakrophagenkultur

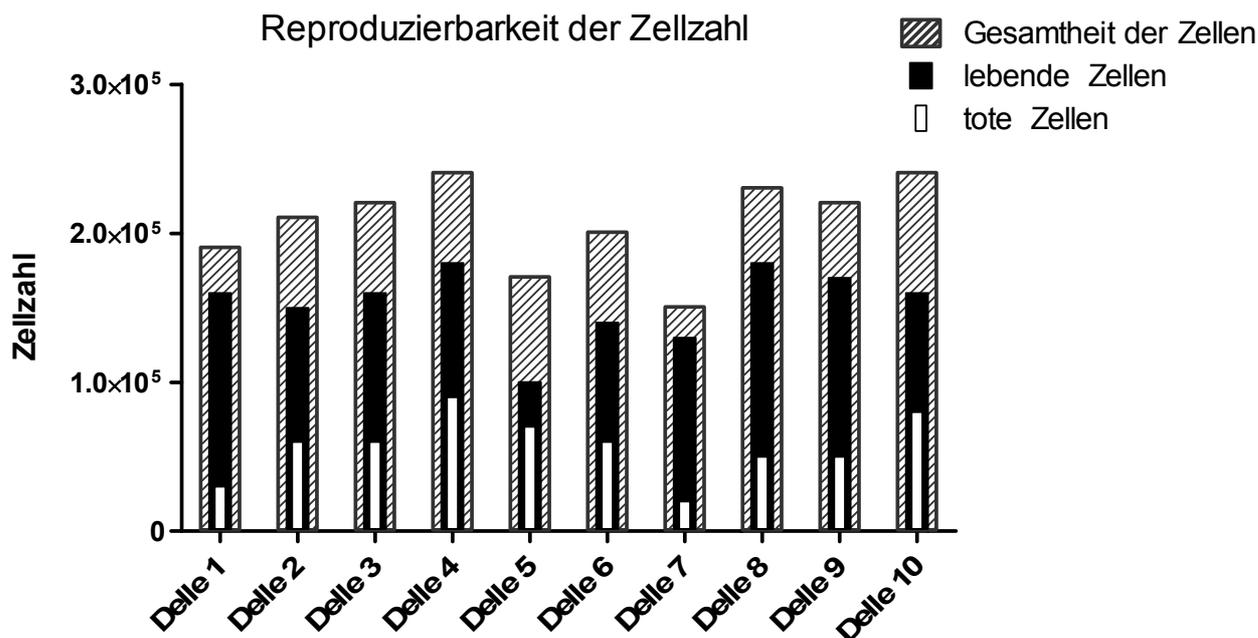
Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben können primäre Makrophagen des Huhnes entweder durch Differenzierung von Monozyten des Blutes oder aus der Milz gewonnen werden. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden peripheren Blutleukozyten (PBL) aus Vollblut verwendet, um primäre Makrophagen zu gewinnen.

Um die Qualität der erhaltenen Makrophagenzellkultur zu evaluieren, wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt: (i) Eine hohe Reproduzierbarkeit der erhaltenen Zellzahlen, die durch das herkömmliche Verfahren der Trypanblaufärbung ermittelt wurden. (ii) Die Zellmorphologie, die mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops beurteilt wurden. (iii) Eine hohe RNA-Qualität als Voraussetzungen für die weiteren Analysen. Hier lieferten die Analysen der gewonnenen RNAs in einem Agilent 2100 Bioanalyser Systems und einem Spectrophotometer NanoDrop objektive Beurteilungskriterien.

#### 5.1.1. Zellzahl

Gleiche Zellzahlen mit einer sehr hohen Reproduzierbarkeit zu erhalten, war unabdingbar für die später folgenden verschiedene *in vitro* Experimente. Daher wurden mehrere Ansätze von Kulturen durchgeführt und mit Hilfe der Trypanblaufärbung die Makrophagenzahl mikroskopisch ermittelt. Die Methode wurde unter 4.3.3 beschrieben. Die Anzahl der über Ficoll gewonnenen PBLs bewegte sich im Bereich von  $2 \times 10^5$  und  $9 \times 10^5$  Zellen pro ml Zellsuspension. Aus ursprünglich 40 ml Vollblut konnten konstant ca.  $1 \times 10^8$  lebende Makrophagen gewonnen werden.

Makrophagen sind stark adhärierende Zellen, so dass eine enzymatische Behandlung zum Ablösen der Zellen notwendig ist. In diesen Versuchen wurde beobachtet, dass dabei ein Teil der Makrophagen durch die Behandlung getötet wurde. Diese Veränderungen in der Zellpopulation wurde bei der Zählung berücksichtigt.



**Abb. 7: Reproduzierbarkeit der Zellzahl**

Diese Abbildung zeigt exemplarisch ein Experiment, welches in einem 10-fachen Ansatz durchgeführt wurde. Es wurden  $5 \times 10^6$  PBLs pro Delle einer 6-Lochplatte ausgesät und nach 72 Stunden gezählt. Durch die enzymatische Ablösung vom Kulturgefäß wird ein Teil der Zellen abgetötet, was hier beachtet und dargestellt wurde. Der graue Balken stellt somit die Gesamtheit der toten (weißer Balken) und der lebenden (schwarzer Balken) Zellen dar. Die Gesamtzahl der nach 72 Stunden lebenden primären Makrophagen pro Delle betrug zwischen  $1,5 \times 10^5$  und  $2,4 \times 10^5$ , wenn  $5 \times 10^6$  PBLs ausgesät wurden.

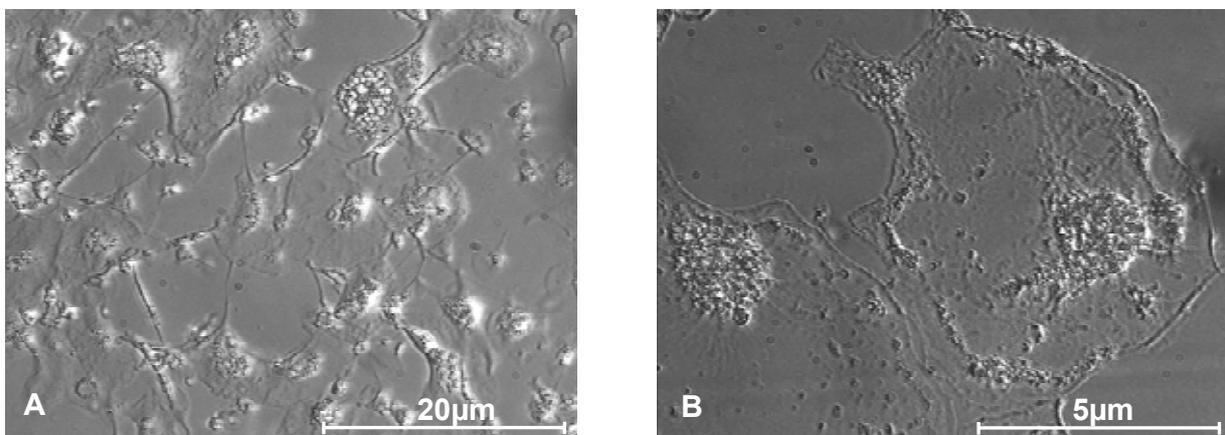
In Abb. 7 ist exemplarisch ein Experiment im 10-fachen Ansatz gezeigt. Dargestellt sind die durch Trypanblaufärbung ermittelten Zellzahlen; aufgeschlüsselt nach Makrophagen, die die enzymatischen Ablösung überlebten (schwarzer Balken) und nach solchen Zellen, die durch die enzymatische Ablösung abgetötet wurden (weißer Balken). Der dritte Balken zeigt die rechnerische Gesamtheit der Makrophagen. Demnach entspricht der grau geriffelte Balken der Anzahl an nach 72 Stunden insgesamt gewonnenen primären Makrophagen. Diese Zellzahl bewegte sich zwischen  $1,5 \times 10^5$  und  $2,4 \times 10^6$ , wenn  $5 \times 10^6$  PBLs ausgesät wurden. Dieses Experiment wurde fünf Mal wiederholt und das Ergebnis wurde in allen Ansätzen bestätigt.

### 5.1.2. Subjektive Beurteilung der Zellmorphologie

Makrophagenkulturen wurden in verschiedenen Ansätzen unabhängig von einander mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt und das Kulturbild photographisch festgehalten. Diese Dokumentation erfolgte zu unterschiedlichsten Zeitpunkten und

wurde repetitiv durchgeführt.

In Abb. 8 wird exemplarisch ein Foto jeweils in unterschiedlicher Vergrößerung einer Makrophagenkultur gezeigt. In Bild A ist eine klassische Makrophagenkultur zu erkennen. Die Zellen zeigen erhabene Vakuolen und flache ausgestreckte Pseudopodien. In der gesamten Kultur befand sich nur diese Zellart, weswegen davon auszugehen ist, dass es sich um eine reine Makrophagenkultur handelte. In Bild B ist ein einzelner Makrophage in einer größeren Vergrößerung dargestellt. Auch hier sind die Vakuolen und die Pseudopodien, typische Merkmal eines Makrophagen, zu erkennen.



**Abb. 8: Morphologie von primären Makrophagen des Huhnes**

Bei diesen Bildern handelt es sich um primäre Makrophagen des Haushuhnes 72 Stunden nach der Vollblut-Präparation. Gezeigt sind Zellkultur-Präparate unter einem Phasenkontrastmikroskop, die in 10facher (A) und in 40facher (B) Vergrößerung abgebildet sind.

### 5.1.3. RNA-Qualität

Die RNA aus mehreren unabhängigen Experimenten wurde wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben isoliert und im Folgenden die RNA-Qualität beurteilt.

Die Qualität wurde sowohl photometrisch im NanoDrop als auch mittels Mikroelektrophorese im Bioanalyzer beurteilt. Im NanoDrop wurde eine RNA als kontaminationsfrei bewertet, wenn der 260/280-Quotient über 1,9 und der 260/230-Quotient über 2,0 lag. Die RIN (*RNA integrity number*) musste mindestens einen Wert von 7,0 erreichen, damit die RNA als intakt bewertet wurde. Die 50 (5 Wiederholungen in einem 10-fachen Ansatz) RNA-Proben aus diesen *in vitro* Vorversuchen mit primären Makrophagen erreichten konstant eine RIN von über 9,0.

Die RNA-Menge bewegte sich zwischen 2 und 5 µg pro Delle ( $2 \times 10^6$  Makrophagen)

der ursprünglichen 6-Lochplatte.

## **5.2. Vervollständigung der Annotation des verwendeten Microarrays**

Das Hühnergenom ist im Vergleich zu den Genomen anderer Spezies, wie zum Beispiel denen des Menschen oder der Maus, schlecht annotiert. Hierin mag einer der Gründe für die schlechte Annotierung des verwendeten Microarrays liegen. Um eine möglichst umfassende Auswertung der Arrayexperimente zu ermöglichen, wurde wie unter Punkt 4.12.3 beschrieben, eine weitere Annotierung durchgeführt.

Die von Agilent angegebenen Sequenzen wurden dazu zunächst einer automatisiert (siehe 4.12.3) BLAST Recherche unterzogen. Diese Recherchen wurden anschließend durch zusätzliche manuelle Datenbank-Abgleiche ergänzt.

Insgesamt konnten von den 44 000 angegebenen Sequenzen 24 515 einer *accession number* zugeordnet werden, wobei einige Gene mehrfach auf dem Microarray vorhanden sind. Das Hühnergenom wird auf ca. 22 000 Genen geschätzt. Nach Abzug der Duplikate und der Durchführung weiterer Annotierung wurden 13 535 Gene einer *accession number* und damit einer biologischen Funktion zugeordnet. Mit diesen identifizierten 13 535 Gene wurden in vorliegender Arbeit durchgeführten Arrays ausgewertet.

## **5.3. *in vitro* Studien**

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, *in vitro* Untersuchungen zur Genexpression nach einer Salmonelleninfektion von Makrophagen durchzuführen. Um zunächst die Funktionalität der kultivierten Zellen zu überprüfen, wurden diese mit definierten Stimuli aktiviert. Gewählt wurden hierfür einerseits LPS, ein prototypisches PAMP, und andererseits IFN- $\gamma$ , ein Zytokin mit bekannter Makrophagen aktivierender Aktivität. Die Reaktion der Zellen wurde durch qRT-PCR Analysen der Expression ausgewählter Gene quantifiziert.

Zusätzlich sollte das Invasionsverhalten der Bakterien in diesen Kultursystemen untersucht werden. Genutzt wurde hierzu ein GFP-markiertes Bakterium und andererseits ein klassisches Invasionssystem

### 5.3.1. Stimulation mit LPS und IFN- $\gamma$

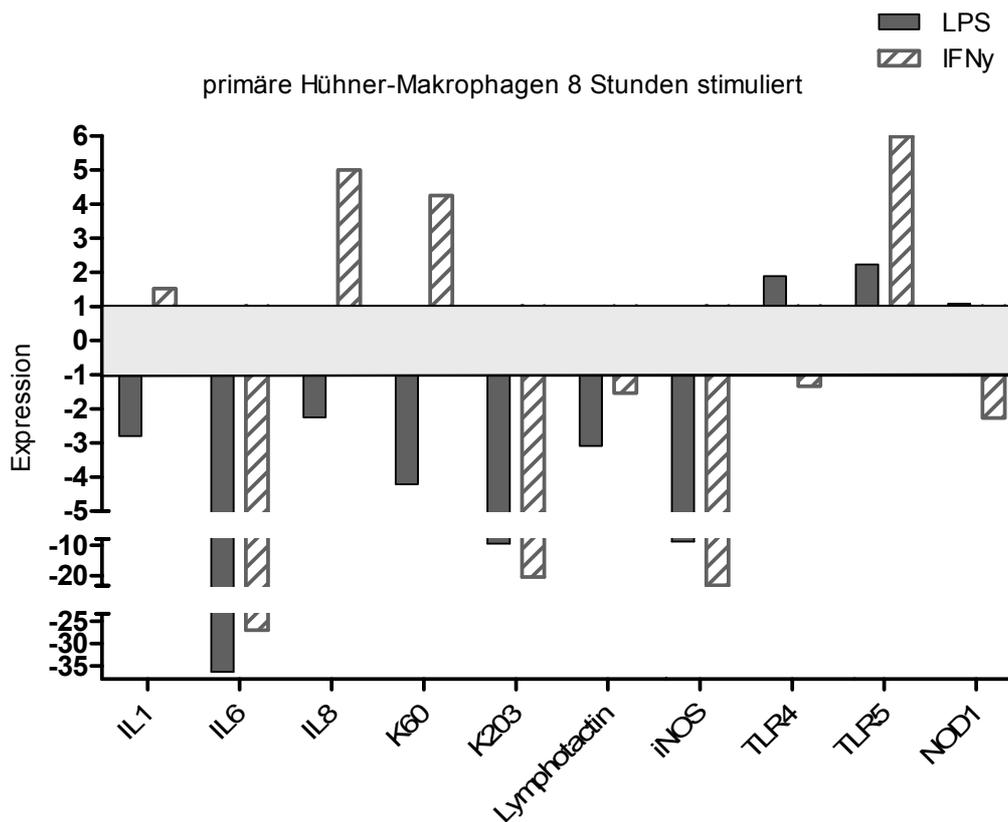
Makrophagen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben isoliert und kultiviert. Sie wurden mit LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) oder IFN- $\gamma$  (1:100, nähere Beschreibung der Konzentration siehe 4.11.4) stimuliert und nach 8 Stunden geerntet. Im Anschluss daran wurde die Makrophagen-RNA wie unter 4.4.4 beschrieben gewonnen.

Um den Einfluss von LPS und IFN- $\gamma$  auf Makrophagen beurteilen zu können, wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe der quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Gemessen wurde die Regulation der Interleukine der frühen Immunantwort wie IL1 $\beta$ , IL6, die Chemokine IL8, K60, K203 und Lymphotactin, die *pattern recognition receptors* (PRR) TLR4, TLR5 und NOD1 sowie iNOS. Das Ergebnis dieser qRT-PCR-Messung ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.

Der Vergleich zwischen nicht aktivierten und durch LPS aktivierten Makrophagen ergab, dass alle Gene bis auf die der beiden *toll like receptors* (TLRs), eine verminderte Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigten. TLR4, welches der PRR für LPS ist und TLR5, der PRR für Flagellin, waren mäßig hochreguliert

Der Vergleich zwischen nicht aktivierten und durch IFN- $\gamma$  aktivierten Gene ergab ebenfalls eine Runterregulation der Gene mit Ausnahme von den Chemokinen K60 und IL8, dem PRR für Flagellin, TLR5 und dem pro-inflammatorischen Zytokin IL1 $\beta$  zum Ausdruck

Das Chemokin K60 ist hoch homolog zu IL8. Dementsprechend zeigen diese beide Gene ein ähnliches Expressionsverhalten. Durch die Stimulation mit LPS waren sie in ihrer Expression vermindert, wogegen die Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine Expressionssteigerung induzierte.



**Abb. 9: Expressionsmuster in der qRT-PCR (*in vitro*)**

Primäre Hühnermakrophagen wurden nicht stimuliert oder aber mit LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder IFN- $\gamma$  (1:100, nähere Angaben zur Konzentration siehe 4.11.3) stimuliert und nach 8 Stunden geerntet. Die Werte, die auf der Ordinate aufgetragen wurden, sind die x-fach Expression über bzw. unter der Kontrolle. Auf der Abszisse sind die untersuchten Gene aufgeführt.

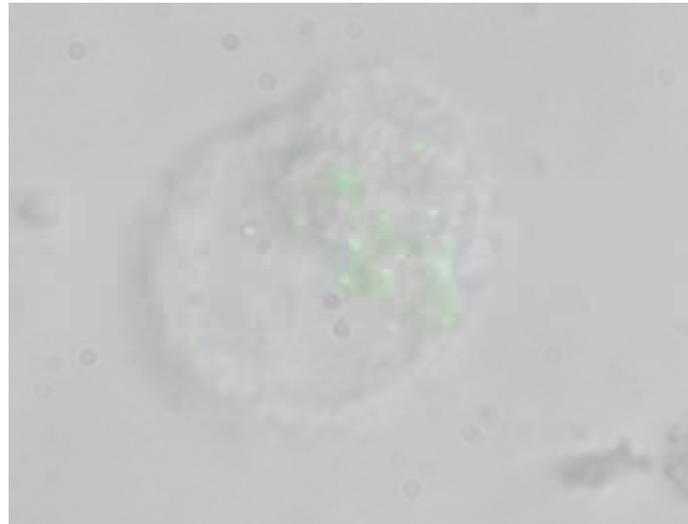
Bei dieser Darstellung ist zu beachten, dass Werte unter 1,0 als  $-1/(2^{\Delta\Delta\text{Ct}})$  dargestellt sind, um die tatsächliche Expressionsminderung gegenüber der Kontrolle zu verdeutlichen. Werte über 1,0 entsprechen einer Expressionssteigerung und sind die  $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Werte. Der grau hinterlegte Bereich zwischen 1 und -1 beschreibt einen Bereich, in dem die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen sind.

### 5.3.2. Infektion der Kulturen mit GFP-markierten Salmonellen

Der in vorliegender Arbeit verwendete Salmonellenstamm *S. enteritidis* stand auch GFP (grün fluoreszierendes Protein)-markiert zur Verfügung. Die nähere Beschreibung des Stammes ist unter 4.11.1 zu finden. Makrophagen wurden durch eine Blutpräparation wie unter 4.2.2 beschrieben isoliert und kultiviert. 72 Stunden nach der Gewinnung der Zellen wurden sie mit dem GFP-markierten Stamm infiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Kulturen im Fluoreszenzmikroskop beurteilt und das Ergebnis fotografisch festgehalten.

Wie in Abb. 10 zu sehen, wiesen die Bakterien eine deutliche Invasivität auf. Der hier verwendete Salmonellen-Stamm ist gegenüber dem Antibiotikum Gentamicin

empfindlich. Da die Kulturen mit einem standardisierten Gentamicin-Protokoll (4.11.3) behandelt wurden, wurden alle extrazellulär gelegenen Bakterien getötet. Überleben konnten lediglich solche Bakterien, denen es gelungen war in die Makrophagen einzudringen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop war zudem zu erkennen, dass die Bakterien stets beweglich und damit vital waren.



**Abb. 10: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines *S. enteritidis* GFP infizierten Makrophagen**

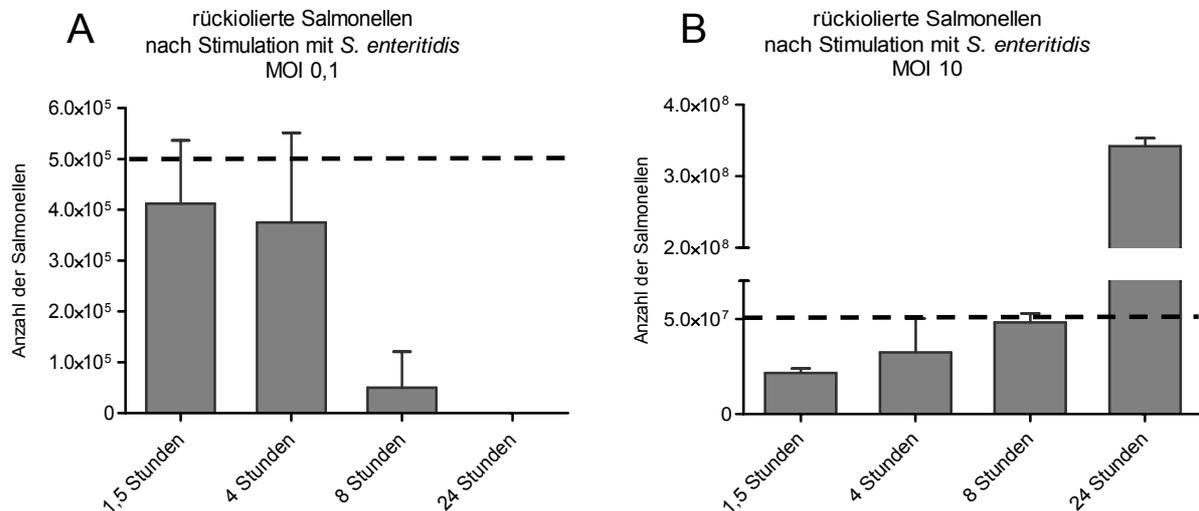
Dieses Foto wurde 24 Stunden nach einer Infektion mit *S. enteritidis* aufgenommen. Zu erkennen ist die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien. Zudem war im Livebild eine Motilität deutlich zu sehen.

Die intrazelluläre Überlebensfähigkeit der Salmonellen in den Makrophagen wurde durch diese Methode gezeigt. Dies wurde unter 5.3.3 nochmals mittels Invasionsassays demonstriert und quantifiziert.

### **5.3.3. Weiterführende Untersuchungen zur Makrophagen-Bakterien-Interaktion**

Im Folgenden sollten das Invasionsverhalten und der Einfluss der Bakterien auf die Makrophagenkulturen genauer analysiert werden. Dabei galt es insbesondere eine für die weiteren Untersuchungen optimale Infektionsdosis zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 11 dargestellt. Zu erkennen ist, dass eine MOI von 0,1 zu einer Aufnahme der Bakterien durch die Phagozyten führte, dass diese aber in der Lage waren die Salmonellen binnen 8 Stunden nahezu vollständig zu eliminieren. (Abb 11A). Eine MOI von 10 führte zum gegenteiligen Ergebnis. Hier war die aufgenommene Bakterienzahl offensichtlich so hoch, dass diese erfolgreich in den Makrophagen replizieren konnten, was in der Zunahme der Bakterienzahlen zum Zeitpunkt 8 und 24 Stunden p.i. zum Ausdruck kam. Bei

Infektionen mit einer MOI von 1 blieb die Zahl intrazellulärer Bakterien bis zu einem Zeitpunkt von 6 Stunden p.i. nahezu konstant (Abb. 12). Blieben diese Zellen ohne weitere aktivatorische Stimuli, konnten die Bakterien den bakteriziden Mechanismen der Makrophagen entkommen und intrazellulär replizieren.



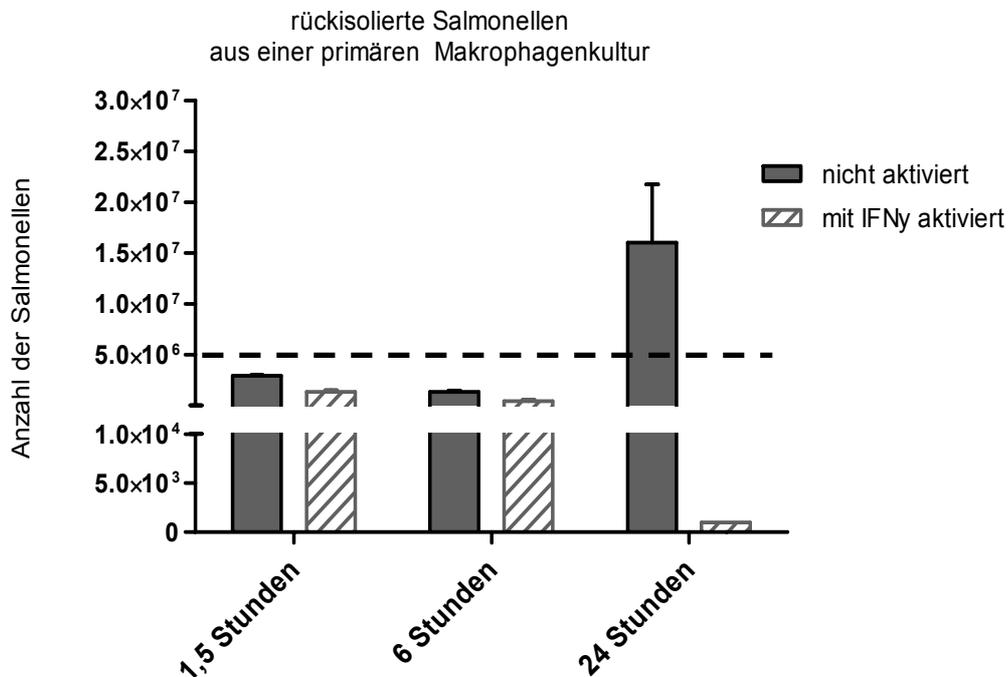
**Abb. 11: Auswirkung unterschiedlicher Infektionsdosen (MOI)**

In dieser Abbildung sind zwei verschiedene Invasionsassays gegenüber gestellt. In beiden Experimenten wurden Makrophagenkulturen mit *S. enteritidis* infiziert und nach 1,5, 4, 8 und 24 Stunden lysiert. Die Kulturen wurden mit einer MOI von 0,1 (A) und 10 (B) infiziert. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt die Zahl der Salmonellen, die zu den Makrophagenkulturen hinzugegeben wurden.

Des Weiteren wurden Makrophagen wie unter 4.2.2 beschrieben isoliert und kultiviert. Nach 72 Stunden wurden vier Dellen mit IFN- $\gamma$  aktiviert, vier Dellen blieben nicht aktiviert. Sie wurden mit einer MOI von 1 infiziert und wie bereits im Abschnitt 4.11.3 ausgeführt behandelt. Die Ernte der infizierten Makrophagen erfolgte nach 1,5, 6 und 24 Stunden. Aus den Zelllysaten wurden die Bakterien rückisoliert und die Bakterienzahl quantifiziert.

Wie viele Salmonellen aus diesen Makrophagen rückisoliert wurden, ist in Abb. 12 graphisch dargestellt. Die schwarze gestrichelte Linie in dieser Graphik zeigt die Zahl an Salmonellen, die zu Beginn des Experimentes in den Kulturüberstand hinzugegeben wurde. Dementsprechend ist zu erkennen, dass die Salmonellenzahl 1,5 und 6 Stunden p.i. der gestrichelten Linie nahezu entsprach, wobei es kaum eine Rolle spielte, ob die Makrophagen mit IFN- $\gamma$  aktiviert waren oder nicht. Das heißt, dass die in den Überstand gegebenen Bakterien nach 1,5 Stunden fast alle in die Makrophagen invadierten. Nach 24 Stunden allerdings stieg bei den nicht aktivierten Makrophagen die Anzahl der rückisolierten Salmonellen auf  $1,6 \times 10^7$ , wohingegen

sich bei den mit IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen die Anzahl der rückisolierten Salmonellen auf  $1 \times 10^3$  dezimierte. Nicht aktivierte Makrophagen sind demnach erst bei sehr geringen MOIs (0,1) in der Lage die Bakterien-Replikation zu kontrollieren, während IFN- $\gamma$  aktivierte Zellen binnen 24 Stunden alle Bakterien töten können.



**Abb. 12: Durch IFN- $\gamma$  verursachte Unterschiede der Invasivität bzw. Replikation**

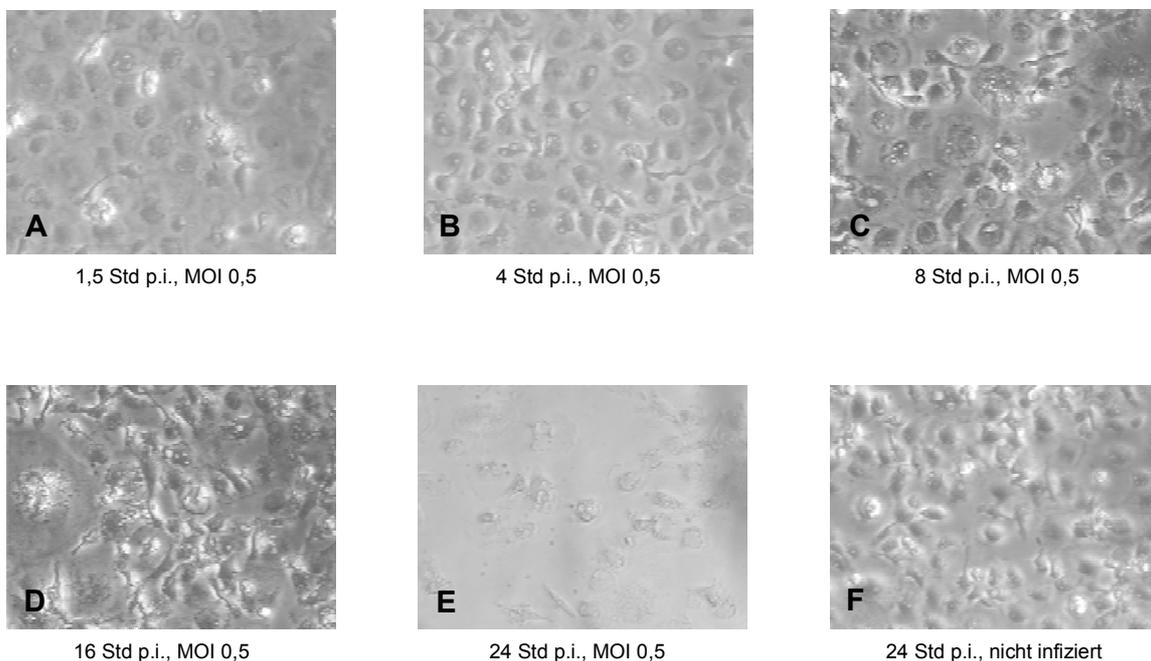
Diese Abbildung zeigt das Ergebnis eines Invasionsassays, bei dem Makrophagen vor einer Salmonelleninfektion für 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  voraktiviert wurden ( $n = 4$ ). Vier Dellen wurden zum Vergleich nicht aktiviert. Die Kulturen wurden mit einer MOI 1 infiziert und die Ernte erfolgte nach 1,5, 6 und 24 Stunden. Die schwarze gestrichelte Linie zeigt die Zahl der Salmonellen, die zu Beginn des Experimentes zu den Makrophagenkulturen gegeben wurde.

#### 5.3.4. Infektion einer Makrophagenkultur mit einer MOI 1

Unter Punkt 5.3.1 wurde der Einfluss auf die Genexpression primärer Makrophagen durch eine IFN- $\gamma$ - bzw. LPS-Stimulation untersucht. Unter Punkt 5.3.2 wurde durch ein GFP-markiertes *Salmonella* Serovar gezeigt, dass dieses intrazellulär überleben und unter Punkt 5.3.3 wurde schließlich die Invasionsquantität und deren zeitlichen Verlauf näher untersucht. Aufgrund genannter Experimente stellte sich eine MOI von 1 als geeignet für die weiteren Untersuchungen heraus. Aus diesem Grunde wird im Folgenden beispielhaft ein Infektionsexperiment mit einer MOI 1 beschrieben. Dieses Experiment wurde fünf Mal wiederholt und die Ergebnisse entsprachen dem hier ausführlich dargestellten Versuch.

Makrophagen wurden wie in Abschnitt 4.2.2 gewonnen und kultiviert. Sie wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen pro Delle einer 6-Lochplatte ausgesät und entsprechend mit  $5 \times 10^6$  Salmonellen infiziert. Nach Quantifizierung der Makrophagenzahl und der Bakterienzahl ergab sich eine MOI von 0,5. Je 6-Lochplatte blieb eine Delle zur Kontrolle uninfiziert. Benutzt wurde ein *S. enteritidis* Serovar, das unter 4.11.1 näher klassifiziert ist. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 1,5, 4, 8, 16 und 24 Stunden.

Abb. 13 zeigt diese Makrophagenkultur. Zu erkennen ist, dass die Zellen nach 1,5 und 4 Stunden morphologisch unverändert aussahen. Nach 8 und 16 Stunden zeigte sich eine Veränderung der Lichtbrechung. Die Makrophagen veränderten offensichtlich ihre Beschaffenheit. Im Vergleich der beiden 24-Stunden Werte (infizierte Probe versus Kontrolle) ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Kontrolle zeigt eine unauffällige intakte Makrophagenkultur. Bei der infizierten Kultur hingegen hat die Zellzahl der adhärennten Zellen deutlich abgenommen, die verbliebenen Zellen zeigen eine starke Änderung der Morphologie

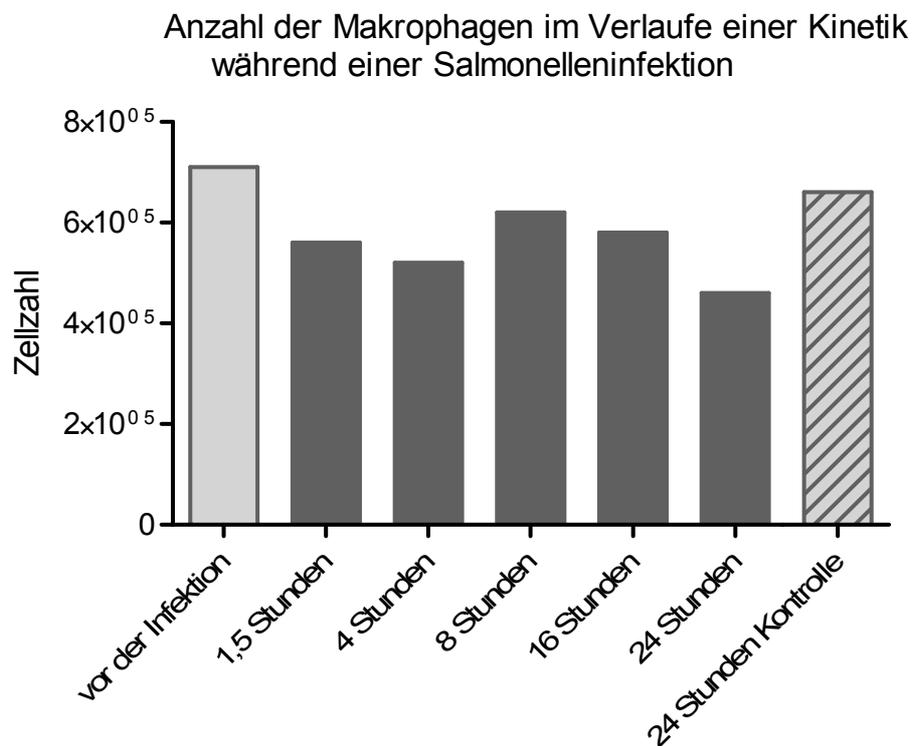


**Abb. 13: Beurteilung der Morphologie (Phasenkontrastmikroskopie) im Verlaufe einer Infektion**

Makrophagen wurden mit Salmonellen (MOI 0,5) infiziert. Die Fotos wurden nach 1,5 (A), 4 (B), 8 (C), 16 (D) und 24 (E) Stunden aufgenommen. Ebenso wurden Kontrollen (F) fotografiert, die ebenfalls für 24 Stunden in Kultur waren. Zu erkennen ist, dass sich ab dem 8-Stunden-Wert die Lichtbrechung und somit die Morphologie deutlich änderte. Die Zellen des 24-Stunden-Wertes erschienen in ihrer Morphologie deutlich verändert und in ihrer

Anzahl stark vermindert. Die Kontrolle nach 24 Stunden war mit dem 1,5-Stunden-Wert vergleichbar und ist als unauffällige Makrophagenkultur einzustufen.

Nach der Dokumentation der Morphologie, wurden die Zellen wie unter 4.11.3 beschrieben abgenommen und mittels einer Trypanblaufärbung gezählt. Dieses Ergebnis ist in Abb. 14 graphisch dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Zellzahlen im Verlaufe der Infektion abnahmen und zwar von  $7,1 \times 10^5$  auf  $4,6 \times 10^5$ . Die Kontrolle nach 24 Stunden hatte mit  $6,6 \times 10^5$  annähernd die gleiche Zellzahl wie zum Zeitpunkt der Infektion.

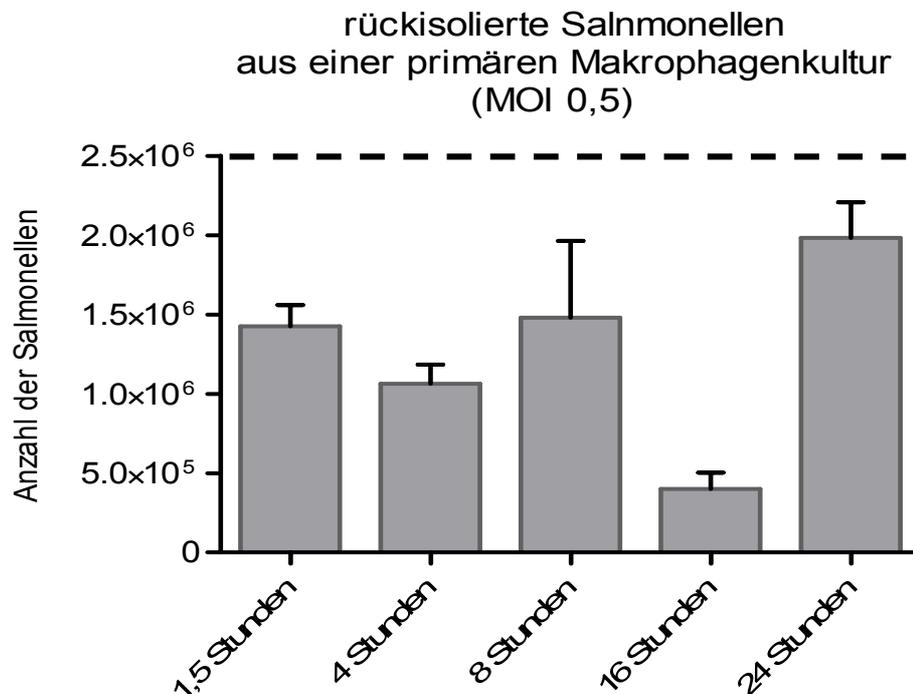


**Abb. 14: Beurteilung der Zellzahl (Trypanblaufärbung) im Verlaufe einer Kinetik**

Makrophagen wurden mit einer MOI von 0,5 infiziert und die Zellzählung mittels Trypanblaufärbung erfolgte nach 1,5, 4, 8, 16 und 24 Stunden. Zudem gab es eine Kontrolle, die ebenfalls nach 24 Stunden gezählt wurde. Eine Abnahme (von  $7,1 \times 10^5$  auf  $4,6 \times 10^5$ ) der Zellzahl ist zu erkennen. Die Kontrolle nach 24 Stunden war mit  $6,6 \times 10^5$  Zellen mit dem 0-Stunden-Wert vergleichbar.

Wie Abb. 15 zeigt, wurden in diesem Experiment außerdem die Salmonellen rückisoliert. Hierzu dienten zu jedem Zeitpunkt zwei Dellen. Dies erfolgte wie unter Punkt 4.11.3 beschrieben mittels Triton-X-100-Lyse. In der Graphik ist zu erkennen, dass die Anzahl der aus den Makrophagen rückisolierten Salmonellen bis zu dem Zeitpunkt von 16 Stunden abnahm. Sie fiel von  $1,5 \times 10^6$  auf  $3,8 \times 10^5$  ab. Nach 24 Stunden stieg die Salmonellenzahl auf  $2 \times 10^6$  und überstieg damit den 1,5-Stunden-

Wert. Daher entspricht dieser Wert weniger der Invasion als vielmehr einer Vermehrung der Bakterien. Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Salmonellenzahl dar, die zu Beginn des Experimentes zu jeder Delle hinzugefügt wurde. Sie betrug  $2,5 \times 10^6$  entsprechend einer MOI von 0,5. Die Methode ist unter 4.11.3 ausführlich beschrieben.



**Abb. 15: Beurteilung der Invasion im Verlaufe einer Infektion**

Diese Abbildung zeigt einen Invasionsassay im Verlaufe einer Infektion. Auf der Ordinate erkennt man die Anzahl der rückisolierten Salmonellen; auf der Abszisse den zeitlichen Verlauf. Zu sehen ist, dass die Salmonellenzahl bis 16 Stunden  $1,5 \times 10^6$  auf  $3,8 \times 10^5$  abfiel, von  $1,5 \times 10^6$  auf  $3,8 \times 10^5$ . Nach 24 Stunden stieg die Salmonellenzahl auf  $2 \times 10^6$  und überstieg damit den 1,5-Stunden-Wert. Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Salmonellenzahl, die zu Beginn des Experimentes zu den Makrophagenkulturen hinzugefügt wurden, dar. Die MOI betrug 0,5.

## 5.4. *in vitro* Infektionsstudie

Aufgrund der Ergebnisse der bisher besprochenen *in vitro* Studien aus Kapitel 5.3 wurde ein Versuchsaufbau eines *in vitro* Infektionsversuches entwickelt, bei dem primäre Hühnermakrophagen mit *S. enteritidis* infiziert wurden. Diese Proben wurden mit Hilfe der Microarray-Technik analysiert und die Genexpressionsveränderungen von identifizierten Kandidatengenen wurden in der qRT-PCR überprüft.

### 5.4.1. Versuchsaufbau

Primäre Makrophagen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben gewonnen. Zur

Blutentnahme dienten M11-Hühner, die zwischen sechs und neun Monate alt und unterschiedlichen Geschlechts waren. Jedes Tier spendete zwischen 6 und 8 ml Blut. Nach 72 Stunden in Kultur wurden vier Dellen (i) mit einer MOI von 10 infiziert, vier Dellen dienten als Kontrolle. Außerdem wurde jeweils eine Delle zur (ii) subjektiven Beurteilung der Morphologie genutzt (nicht abgebildet) und jeweils eine weitere Delle diente der (iii) Zellzahlbestimmung, um im Nachhinein die MOI berechnen zu können.

Das Experiment wurde vier Stunden nach der Infektion beendet. Es folgte die Homogenisierung der Zellsuspension, die RNA-Isolation inklusive der RNA-Qualitätskontrollen mit anschließender cDNA-Synthese.

#### 5.4.2. RNA-Isolation und -Qualität

Die RNA-Qualität erfüllte in der photometrischen Messung des NanoDrops die erforderlichen Qualitätsanforderungen und wurde aufgrund der 260/280- und 260/230-Quotienten als hinreichend kontaminationsfrei beurteilt. Die Ergebnisse der Bioanalyser Analyse deuteten auf keinerlei Degradation hin und die RNA-Menge war ausreichend. Nach dieser Beurteilung wurde aus diesen RNA-Proben (i) einerseits für die qRT-PCR cDNA synthetisiert, (ii) andererseits wurden sie für die Microarray-Analyse vorbereitet.

Wie in Tab. 5 aufgelistet bewegten sich die RNA Mengen zwischen 370 und 680 ng/µl, was einer Gesamtmenge zwischen 3,3 und 6,1 µg entsprach. Die 260/280-Quotienten waren alle größer als 1,84 und die 260/230-Quotienten waren alle größer als 1,95, womit sich keine Hinweise auf Kontaminationen ergaben. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurden die RNA-Proben im Bioanalyser gemessen. Die RINs überschritten alle einen Wert von 9,8.

Probe	Konzentration ng/µl	260/280	260/230	RIN
Kontrolle 1	683,93	2,01	1,97	9,8
Kontrolle 2	447,13	1,88	2,05	10,0
Kontrolle 3	454,88	1,87	2,12	10,0
Kontrolle 4	375,93	1,84	2,17	9,8
Salmonellen infiziert 1	393,00	1,89	1,95	9,8
Salmonellen infiziert 2	370,77	1,84	2,1	9,8
Salmonellen infiziert 3	379,25	1,84	2,19	9,9
Salmonellen infiziert 4	370,16	1,85	2,19	9,9

**Tab. 5: Probenqualität isolierter RNA des *in vitro* Versuches**

Das Probenmaterial wurde aus mit Salmonellen infizierten primären Makrophagen und nicht infizierten Kontrollkulturen gewonnen. Gezeigt sind die RNA-Konzentration, die Verhältnisse der Absorptionsspektren bei 280 nm bzw. 230 nm in Bezug zu 260 nm und die RNA *integrity number* (RIN) der Bioanalyser Messung. Mit diesen RNA-Proben wurden Microarray-Experimente durchgeführt.

**5.4.3. cDNA-Synthese**

Die cDNA wurde nach Herstellerangaben und wie unter Abschnitt 4.5 beschrieben synthetisiert. In diesem Experiment wurde nach vorangegangenem DNase Verdau (DNase I, RNase-free von Fermentas) das *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von der Firma Invitrogen genutzt. Mit dieser gewonnenen cDNA wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt.

**5.4.4. Microarrays**

Die Microarrays wurden wie unter 4.12 beschrieben durchgeführt. Die RNA Konzentration wurde in jeder Probe auf 500 ng in 5,3 µl nuklease-freiem Wasser eingestellt. Die weitere Durchführung fand im Laboratorium für funktionelle Genomanalyse (LaFuGa) am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) statt.

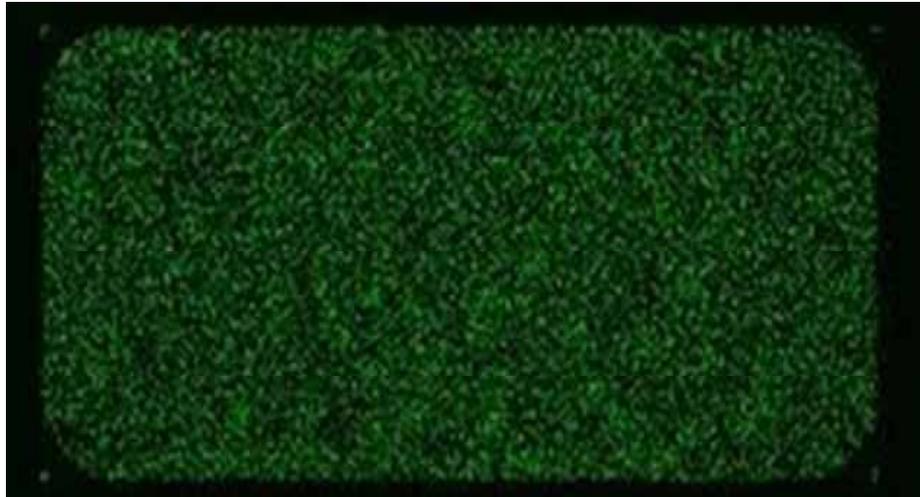
Die spezifische Aktivität wurde, wie unter 4.12.6 erklärt, durch einen Quotienten berechnet und ist ein Maß dafür, wie viel des Farbstoffes Cyanin in die fragmentierte RNA eingebaut wurde. Die spezifische Aktivität durfte den Wert 9,0 nicht unterschreiten; wie in Tab. 6 aufgelistet bewegte sie sich bei diesen Proben zwischen 11,01 und 12,38.

Probe	Spezifische Aktivität (pmol Cyanin pro µg cRNA)
Kontrolle 1	11,01
Kontrolle 2	12,13
Kontrolle 3	11,29
Kontrolle 4	11,58
Salmonellen infiziert 1	11,86
Salmonellen infiziert 2	11,30
Salmonellen infiziert 3	12,38
Salmonellen infiziert 4	11,66

**Tab. 6: Vorbereitung des Microarrays: spezifische Aktivität der *in vitro* Proben**

Die spezifische Aktivität beschreibt eine Mengenangabe der Cyaninmoleküle, die in die fragmentierte RNA eingebaut wurde. Sie durfte den Wert von 9,0 nicht unterschreiten; bei diesen Proben bewegte sie sich zwischen 11,01 und 12,38.

Nach dem erfolgreichen Einbauen der Cyanin Moleküle in die fragmentierte RNA, fand die Hybridisierung der Arrays statt. Im Anschluss daran wurden alle acht Proben erfolgreich gescannt. Sie wiesen wie beispielhaft in Abb. 16 gezeigt keine Auffälligkeiten auf.



**Abb. 16:** Eines der acht Array-Scan-Bilder des *in vitro* Versuches

Die Scans des *in vitro* Versuches zeigten keine Auffälligkeiten auf und konnten somit ausgewertet werden. Hier ist lediglich beispielhaft eines der acht Scan-Bilder gezeigt.

Zur Auswertung dieses Experimentes wurden die Programme R, SAM, Pathway Express, Expander und MEV benutzt. Alle Daten und Ergebnisse wurden in einer Access Datenbank verknüpft und gespeichert. Die bioinformatische Auswertung wurde wie sie unter Punkt 4.13 ausführlich erklärt wurde, durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses *in vitro* Experimentes schrittweise beschrieben.

### **Eigenkontrollen der Agilent Software**

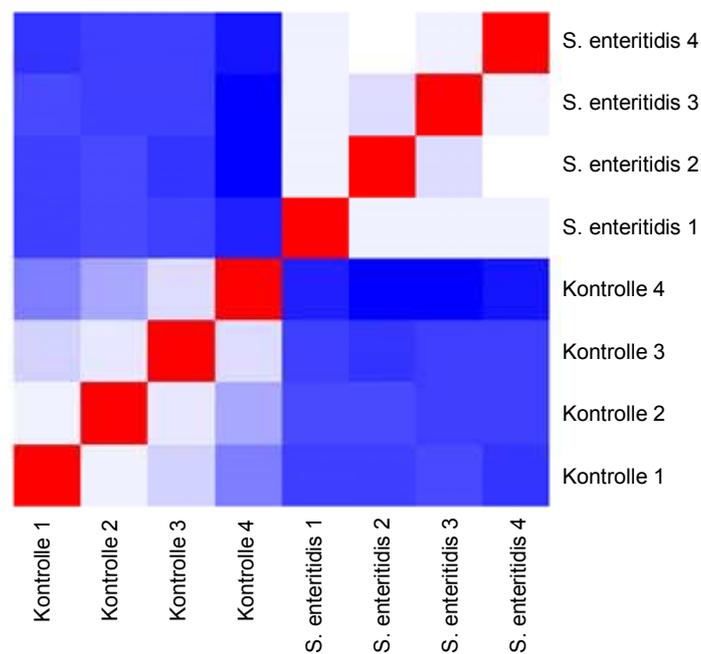
Gleichzeitig mit dem Scannen wurden von der Agilent Software die internen Kontrollen, die sich auf dem Array befinden, ausgewertet. Die einzelnen Punkte wurden unter Punkt 4.13.1 bereits beschrieben. Diese Eigenkontrollen waren bei allen acht Proben unauffällig.

### **Auswertung durch die Software „R“**

In dem Programm „R“ wurden die Daten normalisiert. Außerdem wurden damit alle Daten anhand ihrer Ähnlichkeit untereinander gruppiert, was in Form einer sogenannten „heatmap“ dargestellt wird.

In einer *heatmap* sind alle Proben in einem Koordinatensystem aufgetragen. Damit

stehen sich immer zwei Proben gegenüber. Ihre Ähnlichkeit im Expressionsmuster der Gene auf dem Array ist anhand einer Farbcodierung dargestellt. Je heller das Blau des sich bildenden Quadrates ist, desto ähnlicher waren sich die Proben in ihrem Expressionsverhalten. Je dunkler das Blau ist, desto unähnlicher waren sich die gegenüber gestellten Proben. Wenn sich ein- und dieselbe Probe gegenüber steht, ergab sich entsprechend eine hundertprozentige Übereinstimmung. Das ist rot gekennzeichnet. In folgender *heatmap* ist zu erkennen, dass sich jeweils die vier Kontrollen untereinander und die vier infizierten Proben untereinander sehr ähnlich in ihrem Expressionsverhalten waren. Die hohe Reproduzierbarkeit ist eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Analysen.



**Abb. 17: Heatmap des Microarrays des *in vitro* Versuches**

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass sich die mit *S. enteritidis* infizierte Gruppe und die Kontrollgruppe in ihrem Expressionsverhalten unterscheiden. Je heller das Blau, desto ähnlicher; je dunkler das Blau, desto unähnlicher sind sich die Proben. Rot bedeutet, dass es sich um identische Proben handelt.

### Auswertung durch die Software „SAM“

Wie unter Punkt 4.13.3 beschrieben, wurde mit Hilfe des Programms SAM (*significance analysis of microarrays*) die statistische Analyse der durch R normalisierten Arraydaten durchgeführt, um die signifikant regulierten Gene identifizieren zu können. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,01 festgelegt. Das heißt, es wurden maximal 1 % falsch positive Ergebnisse akzeptiert. Mit Hilfe des Excel-Programms wurde der Expressionsunterschied zwischen infizierten und nicht

infizierten Proben der einzelnen Gene auf dem Array errechnet. Als biologisch relevanter Expressionsunterschied („*Fold Change*“) wurden Werte von +/- 2 festgesetzt.

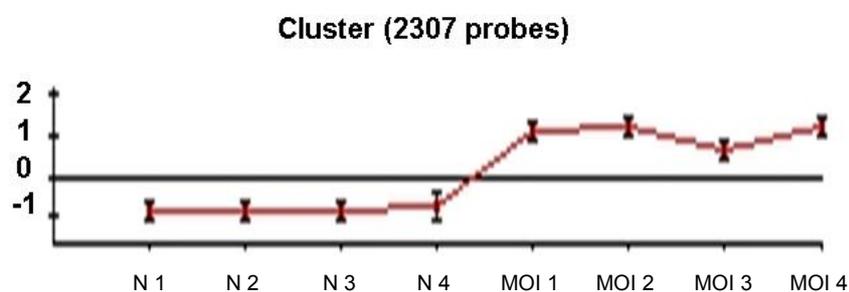
Mit diesen definierten Kriterien ergaben sich im durchgeführten Experiment 5 933 regulierte Gene, wovon 1 945 hoch- und 3 988 runterreguliert waren.

### Auswertung durch die Software „Expander“

Expander ist eine Software, die Gene aufgrund der Signifikanz ihres Expressionsverhaltens filtert und Clusteranalysen durchführt. Details zur Anwendung dieses Programms wurde unter Punkt 4.13.7 erklärt.

Zu Beginn der Anwendung wurde ein p-Wert festgelegt. Der p-Wert (engl. *p-value* von *probability*, Wahrscheinlichkeit) steht in enger Beziehung zum Signifikanzniveau. Je kleiner der p-Wert ausgewählt wird, desto feiner werden die Gene gefiltert. In diesem Experiment wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt, hieraus ergaben sich 8149 signifikant regulierte Gene.

Wie in Abb. 18 abgebildet ergab die Clusteranalyse lediglich ein signifikantes Cluster. Das heißt, es ergab sich lediglich eine Gruppe von Genen, die zum einen signifikant reguliert waren und zum anderen ein ähnliches Expressionsverhalten hatten. In diesem Cluster zeigten die Kontrollen ein niedrigeres und die infizierten Gruppen ein erhöhtes Expressionsniveau. Dies umfasste 2 307 Gene. Zu betonen ist, dass diese Cluster lediglich aufgrund ihres Expressionsverhaltens und nicht aufgrund ihres funktionellen Verhaltens gruppiert wurden.



**Abb. 18: Von der Software Expander identifiziertes signifikant reguliertes Cluster**

Diese Graphik zeigt das einzig signifikant regulierte Gencluster, welches von der Software Expander generiert wurde. Diese 2307 Gene, die hier zusammengefasst wurden, zeigten in den Kontrollen ein niedrigeres und in der infizierten Gruppe ein erhöhtes Expressionsniveau. „N“ steht für die Kontrollen und „MOI“ für die infizierten Proben.

Diese 2 307 signifikant regulierten Gene, die sich wie in Abb. 18 abgebildet in ihrem Expressionsverhalten gleichen, wurden von Expander einer biologischen Funktion zugeordnet. Es ergab sich folgendes Ergebnis.

Cluster-Klassen	Biologische Funktion
A	Chemokin Aktivität
B	Immunantwort
C	Zytokin Aktivität
D	Zelltod
E	Proteinbindung
F	Zelluläre Entwicklungsprozesse
G	Zelloberfläche
H	Organentwicklung

**Tab. 7: Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen**

Expander genierte ein signifikant reguliertes Cluster (Abb. 18), welches 2307 Gene enthielt. Diese Gene wurden funktionell in acht Gruppen (A bis H) unterteilt. Diese Tabelle zeigt die Zuordnung zu diesen Gruppen.

Zudem bestand die Möglichkeit, die Gene, die sich in einer Gruppe innerhalb des Clusters befanden, auflisten zu lassen. An dieser Stelle ist zu betonen, dass nur Gene erschienen, deren Gensymbole in humanen Datenbanken mit den annotierten Genen des Hühnergenoms übereinstimmten und bekannt waren.

Von den 8 Cluster-Klassen (A – H) aus Tab. 7 sind die zugeordneten Gene der ersten drei Klassen in Tab. 8 aufgelistet. Dabei handelt es sich um das Cluster der Chemokin-Aktivität, der Immunantwort und der Zytokin-Aktivität. Zu sehen ist, dass Gene, wie zum Beispiel das Chemokin IL8, mehrere Cluster-Klassen zugeordnet wurden.

A: Chemokin Aktivität	B: Immunantwort	C: Zytokin-Aktivität
CCL20	IL10	IL10
CCLi5	LOC378902	INHBA
CX3CL1	IL2	IL2
CXCL12	CD40	LOC422510
CXCL14	IL1B	LOC422509
CXCR4	XCL1	LOC417533
IL8	Lat2	IL6
K203	CXCL14	CXCL12
LOC417533	B-G	IL8
LOC422509	NFKB2	CXCR4
LOC422510	LOC422510	EDA
XCL1	BCL6	K203
	TGFB2	IL1B

	LOC422509	XCL1
	IL6	CX3CL1
	LOC417533	CCLi5
	IL8	CXCL14
	CXCL12	CCL20
	CXCR4	
	EDA	
	K203	
	CX3CL1	
	SIGIRR	
	CCLi5	
	CCL20	

**Tab. 8: Gene aus den ersten drei Gruppen des signifikant regulierten Clusters**

Diese Tabelle zeigt die Namen der Gene, die sich in den ersten drei funktionellen Gruppen der Clusteranalyse befanden. In dieser Tabelle erscheinen nur Gene, deren Gensymbole aus Humandatenbanken mit den annotierten Genen des Hühnergenoms übereinstimmten und die bekannt waren.

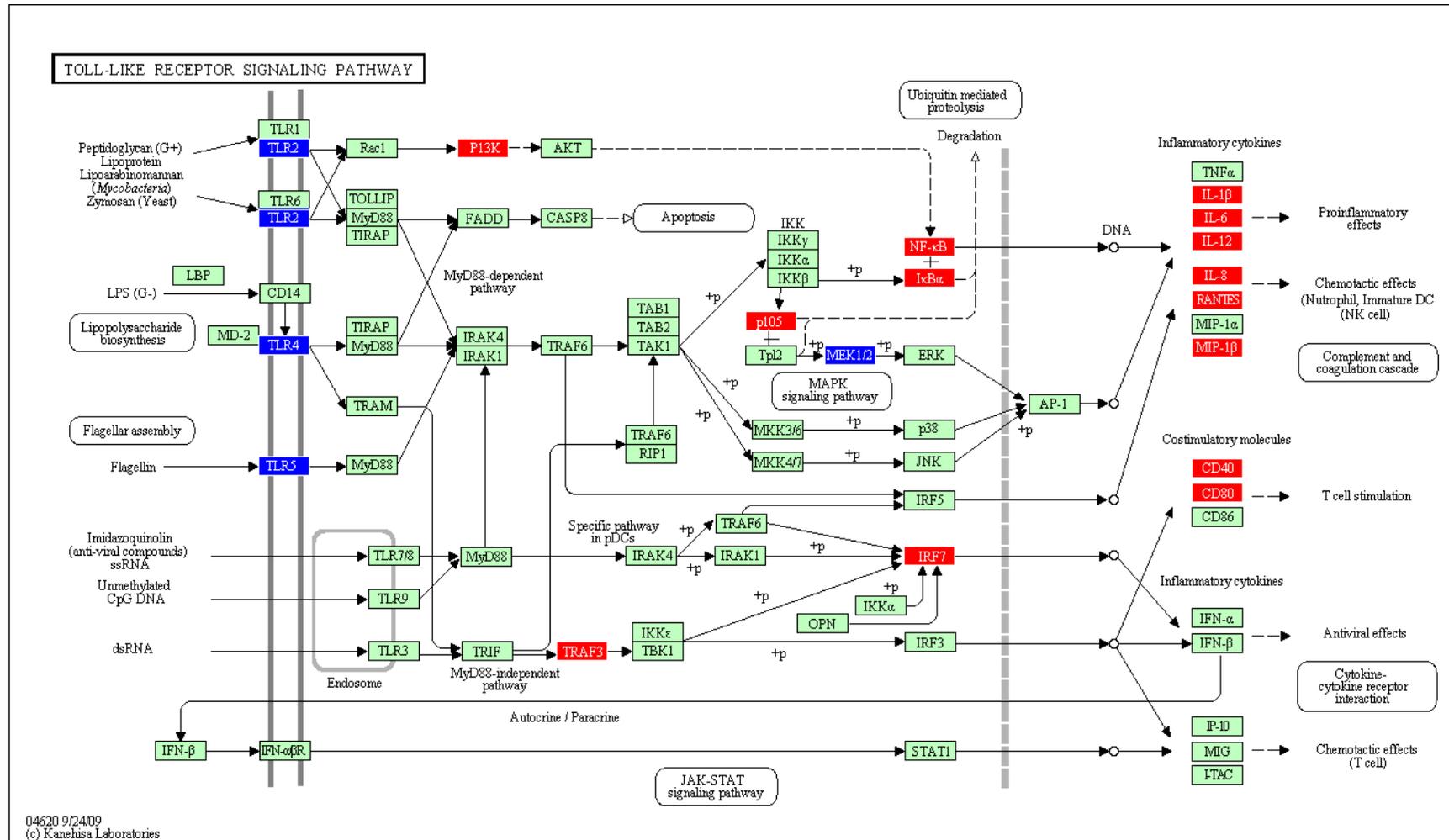
### **Auswertung durch die Software „Pathway express“**

Wie bereits unter 4.13.6 erläutert können mit „*Pathway Express*“ Analysen der Signalwege durchgeführt werden. Diese werden nach ihrem „*impact factor*“ (IF) sortiert aufgelistet. Je höher der *impact factor* eines Signalweges ist, desto spezifischer sind die darin enthaltenen Gene für diesen Signalweg. Des Weiteren wird der korrigierte gamma p-Wert angezeigt. Ein Signalweg ist signifikant, wenn der korrigierte gamma p-Wert unter 0,05 liegt. Jedoch können auch Signalwege mit einem korrigierten gamma p-Wert von unter 0,25 biologisch relevant sein. Daher wurden diese Signalwege durchaus auch beachtet. Demnach fanden sich in diesem *in vitro* Versuch 55 (p-Wert unter 0,25) Signalwege, wovon 33 (p-Wert unter 0,05) signifikant regulierte waren.

Zu jedem Signalweg wird von der Software eine Graphik generiert. In folgender Abb. 19 wird beispielhaft die Graphik des Toll-like Rezeptor Signalweges gezeigt. Gene mit einem erhöhten Expressionsniveau gegenüber der Kontrolle sind rot und Gene mit einem verminderten Expressionsniveau gegenüber der Kontrolle sind blau dargestellt. Zu erkennen ist, dass die meisten Toll-like Rezeptoren (TLRs) vermindert und NF $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) vermehrt exprimiert wurde. Des Weiteren ist zu erkennen, dass als Antwort darauf die inflammatorischen Zytokine IL1 $\beta$ , IL6 und IL12 sowie die Chemokine IL8 (CXCL8), RANTES (CCL5) und MIP-1 $\beta$  (CCL4, K203) vermehrt exprimiert wurden. Zu beachten ist, dass es sich dabei um Gen-Symbole der humanen Genomdatenbank

---

handelt, welche von den Bezeichnungen innerhalb des Hühnergenoms abweichen können. Die Software *Pathway Express* generierte 55 zu untersuchende Signalwege (p-Wert unter 0,25), wobei 33 Signalwege davon signifikant (p-Wert unter 0,05) reguliert waren. Die dazugehörigen Graphiken sind in Anhang 10.4 und somit auf beigefügter CD zu finden.



**Abb. 19: Toll-like Rezeptor Signalweg des *in vitro* Experimentes**

Makrophagen wurden 4 Stunden mit *S. enteritidis* infiziert. Hier dargestellt sind die Genexpressionsänderungen des Toll-like Rezeptor Signalweges. Gene mit einer verminderten Genexpression sind blau und Gene mit einer erhöhten Genexpression sind rot dargestellt.

## Expressionswerte

Die Berechnung der Expressionswerte wurde unter Punkt 4.13.4 ausführlich erläutert. Der Fokus vorliegender Arbeit lag auf der frühen Reaktion des angeborenen Immunsystems. Entsprechend wurden zwei Signalwegen besondere Beachtung geschenkt. Dies waren die Signalwege der Toll-like Rezeptoren und der Zytokin / Zytokinrezeptor-Interaktion.

In den zwei genannten Signalwegen stachen zum einen die Zytokine mit ihren Vertretern der Interleukine, Interferone, Tumor Nekrose Faktoren Familienmitglieder und Chemokine heraus und zum anderen die Toll-like-Rezeptoren. Sehr hoch in ihrer Expression waren IL1 $\beta$ , IL6, IL2, IL12p40, IFN- $\gamma$ , IL10, TNFSF11, TNFSF15. Ein bisher nur beim Huhn annotiertes Gen, TRAIL-like, war erheblich runterreguliert. Unter den regulierten Chemokinen stach CCL20 heraus, welches gegenüber der Kontrolle 342-fach hochreguliert war. Alle signifikant regulierten Toll-like-Rezeptoren zeigten eine Runterregulation. In folgender Tabelle werden die in diesem *in vitro* Experiment näher untersuchten Gene mit ihrem Expressionsniveaus dargestellt.

Gene	Synonyme	Expression
<b>pro-inflammatorische Zytokine</b>		
IL1 $\beta$		14,74
IL6		27,98
<b>Zytokine der Th1-Antwort</b>		
IL2		9,65
IL12p40		146,80
IL18		2,89
IFN- $\gamma$		17,60
<b>Zytokine der Th2-Antwort</b>		
IL10		9,48
<b>Interleukin-Rezeptoren</b>		
IL2Ra		2,43
IL23R		8,09
<b>Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF)</b>		
TNFSF5	CD40	17,7
TNFSF10	TRAIL	3,82
TNFSF11	RANKL, TRANCE, CD254	14,76

TNFSF15	TL1a, VEGI	16,21
-	TRAIL-Like	-6,30
<b>TNFSF-Rezeptoren</b>		
TNFRSF18		-5,80
<b>Chemokine</b>		
CCL1		65,55
CCL4	K203	68,92
CCL5	RANTES	10,40
CCL20	MIP-3 $\alpha$	342,99
CXCL8	IL8	6,50
CXCL12	SDF-1	65,13
CXCL13	BCA-1	4,86
CXCL14	JSC	3,97
CX3CL1	Fractalkine, Neurotactin	17,28
<b>Toll-like Rezeptoren</b>		
TLR2		-2,31
TLR4		-3,68
TLR5		-2,05

**Tab. 9: Im Array gemessene Expressionswerte des *in vitro* Experimentes**

Primäre Hühnermakrophagen wurden für vier Stunden mit *S. enteritidis* mit einer MOI von 10 stimuliert. Die vorliegende Tabelle zeigt die Expressionswerte über der Kontrolle. Die aufgelisteten Gene stellten sich aufgrund der Anwendung der Softwares R und SAM als signifikant reguliert heraus.

Die gesamten Expressionswerte des *in vitro* Infektionsversuches sind im Anhang 10.3 und somit auf beigefügter CD zu finden.

#### 5.4.5. qRT-PCR

Folgende Gene wurden aufgrund der Array Daten bei diesem *in vitro* Experiment in der qRT-PCR gemessen. Die Ct-Werte und Genexpressionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle sind in folgender Tab. 10 aufgelistet.

Abgesehen von IL4 und TLR5 waren alle von den hier gemessenen Genen signifikant reguliert, was mit den Daten des Arrays korrelierte.

Gen	Mittelwert Ct-Wert		Expression (x-fach reguliert)
	Kontrolle	Probe	
IFN- $\gamma$	37,82	32,69	32,76
IL1 $\beta$	24,72	20,92	12,12
IL6	28,05	23,03	32,99
IL12p40	30,45	23,55	111,24
IL18	21,93	20,25	3,00

IL4	39,00	38,92	0,99*
IL10	28,56	24,27	16,78
iNOS	21,92	16,50	39,95
TLR5	28,54	29,45	0,50*
TL1a	23,52	18,78	25,02
IL8	20,87	17,12	12,53
K60	22,09	18,08	14,26
K203	23,61	16,10	170,66
Lymphotactin	34,79	32,00	6,49

**Tab. 10: in der qRT-PCR bestätigte Expressionswerte des *in vitro* Experimentes**

Primäre Hühnermakrophagen wurden vier Stunden mit *S. enteritidis* mit einer MOI von 10 stimuliert. In Tab. 9 wurden die Expressionsdaten, die im Array generiert worden sind, dargestellt. In dieser Tabelle werden nun die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse der gleichen Gene des gleichen Experimentes gezeigt.

\* IL4 und TLR5 waren nicht signifikant reguliert

## 5.5. *in vivo* Infektionsstudie

Die bisher beschriebenen Versuche hatten die Reaktion von kultivierten Makrophagen auf die Infektion mit Salmonellen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die gewählte Analysemethode gut geeignet ist, um Genexpressionsänderungen zu detektieren und dass die quantitativen Daten des Microarrays gut mit denen der qRT-PCR korrelierten.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten nun vergleichende Analysen mit Gewebeproben infizierter Tiere durchgeführt werden. Ziel dieses Teils der Arbeit war es, Veränderungen der Genexpression im Verlaufe der Zeit während einer Salmonelleninfektion im Haushuhn zu analysieren. Daher wurden bei dieser Studie Hühner mit *S. enteritidis* infiziert, zu den unten ausgeführten Zeitpunkten getötet und deren Organe zur RNA-Isolation entnommen.

### 5.5.1. Versuchsaufbau

Im *in vivo* Versuch wurden SPF-Hühner (engl.: *specific-pathogen free*), die zu Versuchsbeginn 8 Wochen alt waren, genutzt. Um den Stress für die Tiere möglichst gering zu halten, wurden sie zur Eingewöhnung bereits eine Woche vor Versuchsbeginn eingestallt.

Die Hühner wurden mit einer Dosis von  $1 \times 10^7$  Salmonellen pro ml oral infiziert. Die Suspension wurde mit Hilfe einer autoklavierten Knopfkanüle direkt in den Kropf gegeben. Das Volumen betrug 1 ml. Den Kontrolltieren wurde PBS appliziert. Um die exakten Entnahmezeitpunkte einhalten zu können, wurden die Tiere im Abstand von

10 min infiziert. Die Gruppe der infizierten Tiere bestand je Zeitpunkt aus 8 Hühnern, die Kontrollgruppen jeweils aus 6 Tieren. Bei vier Entnahmezeitpunkten ergab sich eine Gesamtzahl von 56 Hühnern. Um Kreuz-Kontaminationen zu vermeiden, wurden die mit Salmonellen infizierten Hühner und die Kontrollen in zwei verschiedenen Räumen eingestallt. Außerdem wurden die Kontrollen stets zuerst behandelt bzw. getötet. Zudem wurden für jede Gruppe eigene autoklavierte Puffer und Bestecke benutzt. Die Hühner zeigten bis zum Zeitpunkt des Schlachtens keinerlei klinische Symptome.

Folgende Entnahmezeitpunkte wurden festgelegt: 5, 12, 24 und 48 Stunden p.i.. Die Hühner wurden möglichst stressfrei mechanisch betäubt und durch Blutentzug getötet. Nach Eröffnen der Bauchhöhle wurde zuerst die Milz steril entnommen. Im Anschluss daran wurden die Caeca entnommen, der Länge nach eröffnet und mit autoklaviertem PBS gespült. Aus den gereinigten Caeca wurden die Caecaltonsillen isoliert. Die Organe wurden unverzüglich je nach weiterem Gebrauch aufgeteilt. Zum Schluss wurde Kot aus dem Colon gewonnen.

Die organischen Materialien wurden wie folgt aufgeteilt:

**Proben für bakteriologische Untersuchung:**

- ca. 1 cm des rechten Caecums
- Kot aus dem Colon
- halbe Milz

**Proben für Formalin fixierte Histologie:**

- ca. 1 cm des linken Caecums
- rechte Caecaltonsille

**Proben für RNA-Isolation:**

- linke und rechte Caecumspitze
- linke Caecaltonsille
- halbe Milz

Die Proben für die bakteriologischen Untersuchungen wurden in Falconröhrchen zügig in das Labor zur direkten Weiterverarbeitung gegeben. Die histologischen Proben wurden in Formalin fixiert. Proben für die RNA-Isolation wurden in RNA/ater®, konserviert.

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden im Rahmen des Verbundprojektes

FBI-Zoo von den Kooperationspartnern, Dr. Karsten Tedin und Sven Maurischat (Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin), durchgeführt. Die Proben für die Histologie und die Genexpressionsanalysen wurden im Lehrstuhl für Tierphysiologie in München durchgeführt. Die histologischen und die Genexpressionsanalysen wurden am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie in München durchgeführt werden.

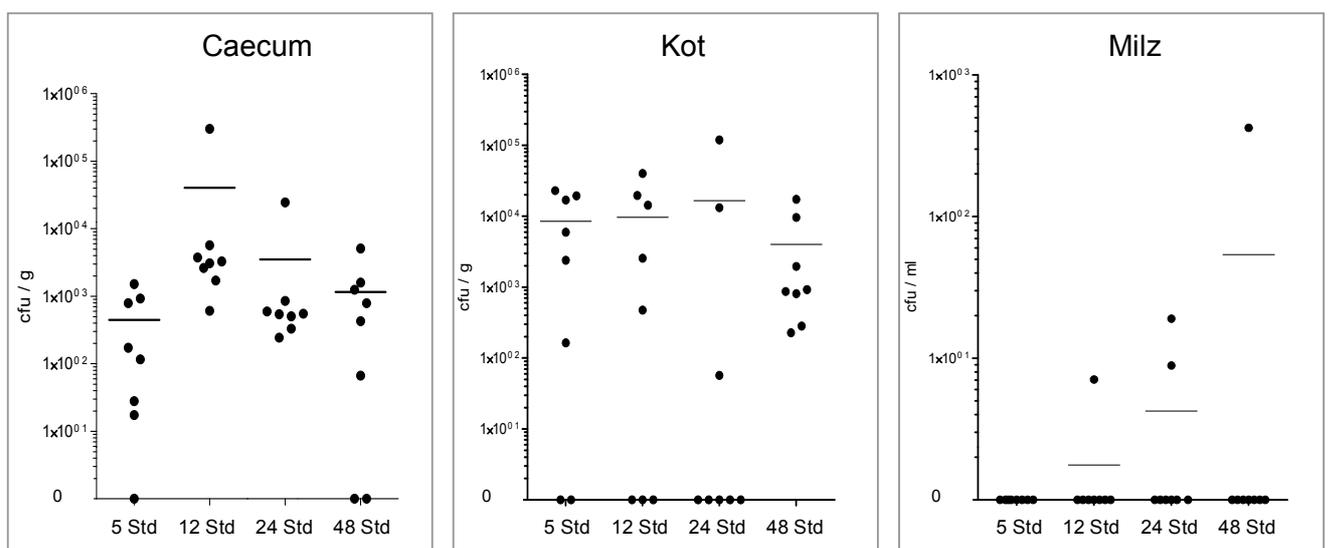
### 5.5.2. Ergebnisse der bakteriologische Untersuchung

Caecumgewebe, Faeces und Milz wurden zur bakteriologischen Untersuchung gewonnen.

Das Caecumgewebe wurde gewaschen, homogenisiert und auf Salmonellen spezifischen Nährböden ausplattiert. Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, erreichte die bakterielle Last zwölf Stunden nach Infektion ihr Maximum. Im Verlaufe der Kinetik fiel die Anzahl der nachgewiesenen Salmonellen wieder ab. Bei insgesamt drei Tieren konnten zu den Zeitpunkten 5 und 48 Stunden nach Infektion keine Salmonellen aus dem Caecumgewebe rückisoliert werden. Im Kot war die bakterielle Last im Durchschnitt recht konstant. Allerdings konnte bei einigen Tieren keine Salmonellen nachgewiesen werden. In den Milzproben konnten erst nach 24 Stunden und auch nur bei insgesamt vier Tieren Salmonellen nachgewiesen werden.

Bei allen Kontrolltieren konnten keine Salmonellen rückisoliert werden.

#### Bakterielle Last



**Abb. 20: bakterielle Last der Hühner zu den vier Entnahmezeitpunkten**

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden bakteriologisch untersucht. Untersucht wurden drei Kompartimente: Caecum, Kot und Milz. Jeder Punkt entspricht einem einzelnen infizierten Huhn (n = 8). Die Kontrolltiere (n = 6) sind nicht abgebildet; sie waren ausnahmslos negativ. Die bakterielle Last ist auf der Ordinate in cfu (engl.: *colony forming unit*) pro Gramm Gewebe bzw. Kot angegeben.

**5.5.3. RNA-Isolation und -Qualität**

Caecum und Caecaltonsille standen zur RNA-Gewinnung zur Verfügung. Die RNA/*later*® fixierten Proben wurden wie unter 4.4 beschrieben isoliert und behandelt. Die zuvor festgelegte RNA-Qualität der photometrischen Messung im NanoDrop wurde bei allen Proben erreicht. Die RNA Mengen der Proben bewegte sich zwischen 10 und 50 µg. Die 260/280-Quotienten waren alle über 1,9 und die 260/230-Quotienten waren alle über 2,0, womit sich keine Hinweise auf Kontaminationen ergaben. Zur weiteren Qualitätskontrolle wurden die RNA-Proben im Bioanalyzer untersucht. Die RINs überschritten alle einen Wert von 8,5 und deuteten daher auf keinerlei Degradation hin. Nach dieser Beurteilung wurden mit diesen RNA-Proben Microarray-Analysen durchgeführt.

Alle Werte, die im NanoDrop und Bioanalyzer ermittelt wurden, sind für die gesamten Proben des Caecums und der Caecaltonsillen in Anhang 10.7 aufgelistet und befinden sich somit auf beigefügter CD.

**5.5.4. cDNA-Synthese**

Die cDNA wurde nach Herstellerangaben und wie unter Abschnitt 4.5 beschrieben synthetisiert. In diesem Experiment wurde nach vorangegangenem DNase Verdau (DNase I, RNase-free von Fermentas) das *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von der Firma Invitrogen genutzt.

**5.5.5. Microarrays**

Je Organ (Caecum und Caecaltonsille), je Gruppe (Salmonellen, PBS) und je Zeitpunkt (5, 12, 24, 48 Stunden p.i.) wurden fünf Proben für die Microarray-Analyse ausgewählt.

Die Microarrays wurden wie unter 4.12 beschrieben durchgeführt. Die RNA Konzentration wurde in jeder Probe auf 500 ng in 5,3 µl nuklease-freiem Wasser eingestellt. Die weitere Durchführung fand im Laboratorium für funktionale

Genomanalyse (LaFuGa) im Genzentrum der LMU statt.

Wie unter Punkt 4.12.5 näher erklärt, beschreibt die spezifische Aktivität, wie viele Cyanin-Moleküle in die fragmentierte RNA eingebaut wurden. Die spezifische Aktivität durfte den Wert 9,0 nicht unterschreiten, wenn die RNA weiter bearbeitet und hybridisiert werden sollte. Die in diesem Experiment generierten Proben überschritten alle den Wert 9,0. Die Werte der spezifischen Aktivität sind gesammelt in Anhang 10.8 aufgeführt und somit auf beigefügter CD zu finden.

Nach der Hybridisierung wurden alle 80 Proben gescannt. Keines der Scan-Bilder wies Auffälligkeiten auf.

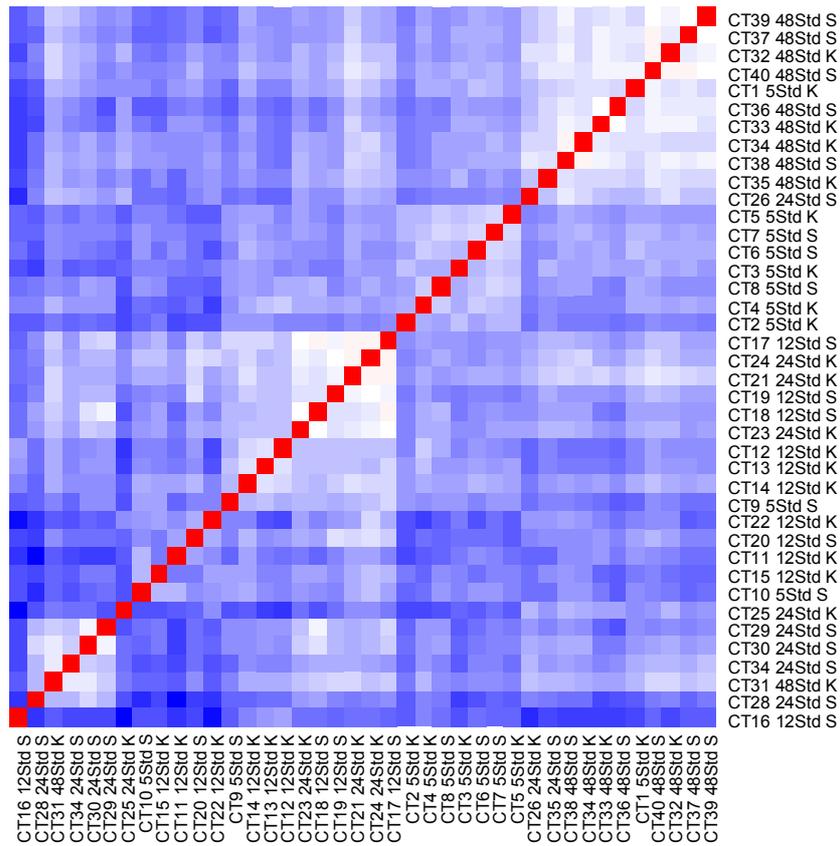
### **Eigenkontrollen der Agilent Software**

Gleichzeitig mit dem Scannen wurden von der Agilent Software die internen Kontrollen, die sich auf dem Array befinden, ausgewertet. Die einzelnen Punkte wurden unter Punkt 4.12 bereits beschrieben. Diese Eigenkontrollen waren bei allen 80 Proben unauffällig.

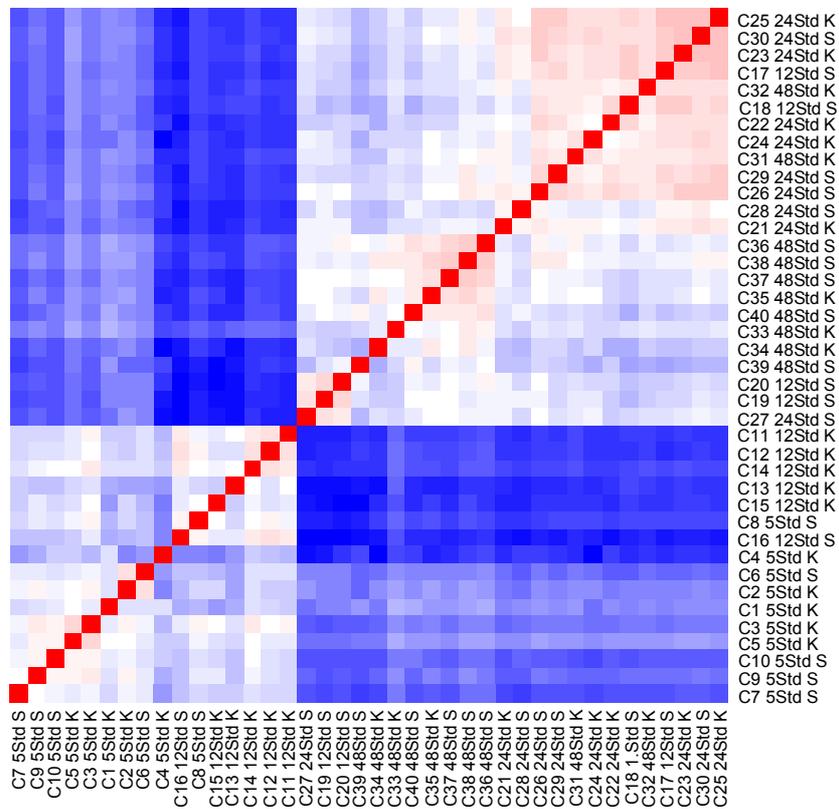
### **Auswertung mittels der Software „R“**

Mit der Software “R” erhält man wie oben beschrieben (siehe 4.13) die normalisierten Daten und die sogenannte *heatmap*. Sie ist ein Maß dafür, wie ähnlich sich die Proben in ihrem Expressionsverhalten waren. Wenn ein Expressionsunterschied vorlag, dann grenzen sich die einzelnen Gruppen untereinander ab. Immer zwei Proben stehen sich im Koordinatensystem der *heatmap* gegenüber und ergeben ein blau eingefärbtes Kästchen. Je heller das Blau ist, desto ähnlicher waren sich die Proben in ihrer Expression. Wenn sich ein und dieselbe Probe gegenüber steht, ist das Kästchen rot gefärbt.

### Caecaltonsillen



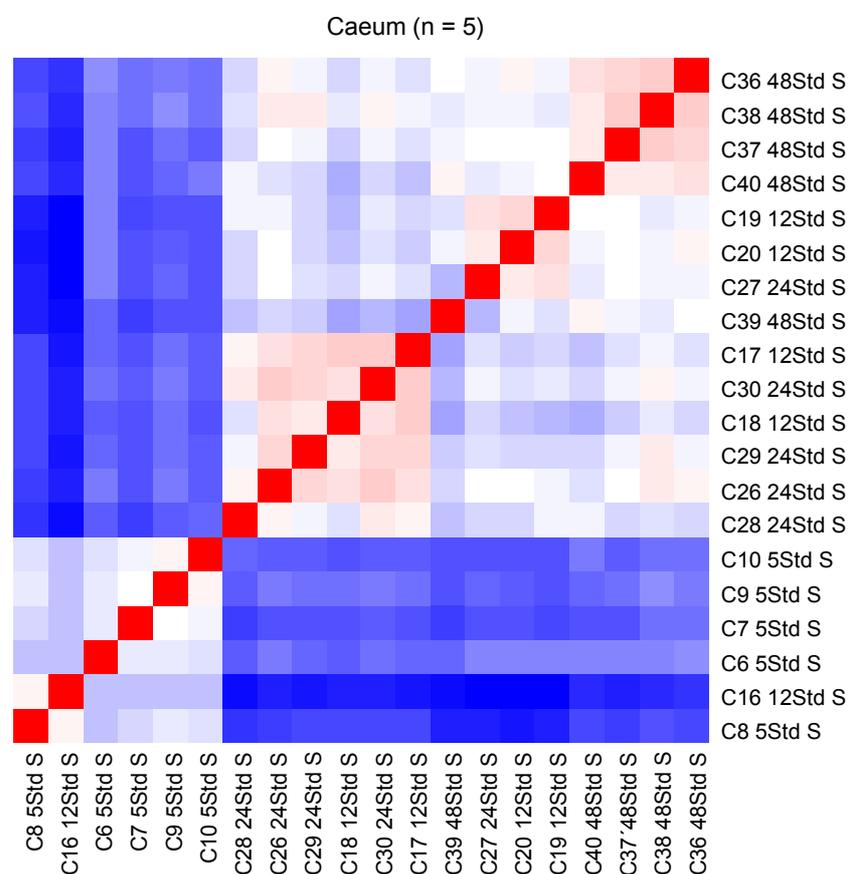
### Caeca



**Abb. 21: Vergleich der *heatmaps* zwischen Caecaltonsillen und Caecum**

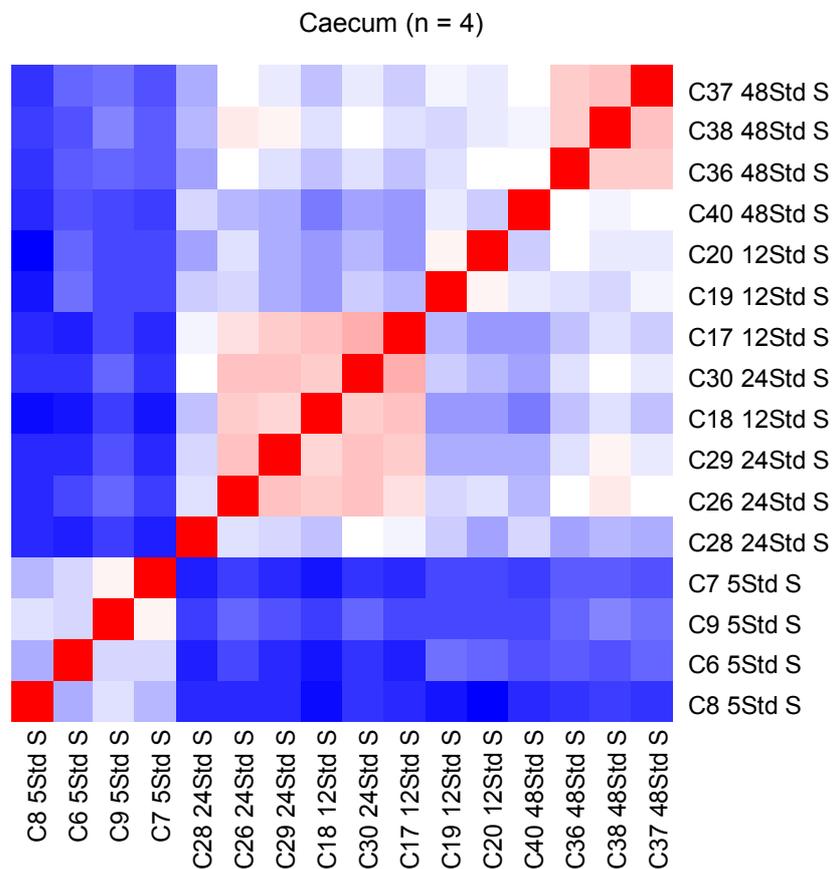
8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet; die Caecaltonsillen und Caeca wurden für vorliegende Arrayanalyse aufgearbeitet. Auf der rechten Seite und unterhalb der *heatmap* findet sich die Beschriftung, um welches Tier es sich handelte. Die Organe sind mit „C“ für Caecum oder mit „CT“ für Caecaltonsille beschriftet. Die arabische Zahl im Anschluss beschreibt die Reihenfolge, in der die Tiere infiziert worden sind. Daraufhin folgt der Tötungszeitpunkt nach der Infektion. „K“ steht für Kontrolle, „S“ steht für Salmonellen und stellte daher die infizierten Tiere dar. Zu erkennen ist, dass das Bild der Caecaltonsille homogen erscheint und dass sich in dem Bild der Caeca die Proben gruppieren ließen.

Abb. 21 zeigt jeweils die Gesamtheit aller untersuchten Caeca und Caecaltonsillen. Das Bild der Caecaltonsillen stellt sich sehr homogen dar. Im Gegensatz dazu ist bei dem Bild der Caeca eine klare Gruppierung zu erkennen. Des Weiteren wurden wie in folgender Abb. 22 gezeigt lediglich die infizierten Tiere verglichen. Zu erkennen sind zwei Ausreißer: „C16 12Std S“ und „C39 48Std S“. Dies zeigt sich dadurch, dass C16 als einziges Tier zu den 5-Stunden-Tieren gruppiert wird. Im ähnlichen Sinne wurde C39 von den anderen 48-Stunden-Tieren gesondert aufgezeigt. Die Software „R“ wurde als eine zusätzliche Qualitätskontrolle angesehen und aufgrund von Abb. 22 wurde aus jeder Gruppe ein Tier und zwar die Tiere 10 (5 Stunden), 16 (12 Stunden), 27 (24 Stunden) und 39 (48 Stunden) von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Es wurde von hier ab nur noch mit  $n = 4$  gearbeitet (siehe Abb. 23).



**Abb. 22: Heatmap der Caeca (n = 5)**

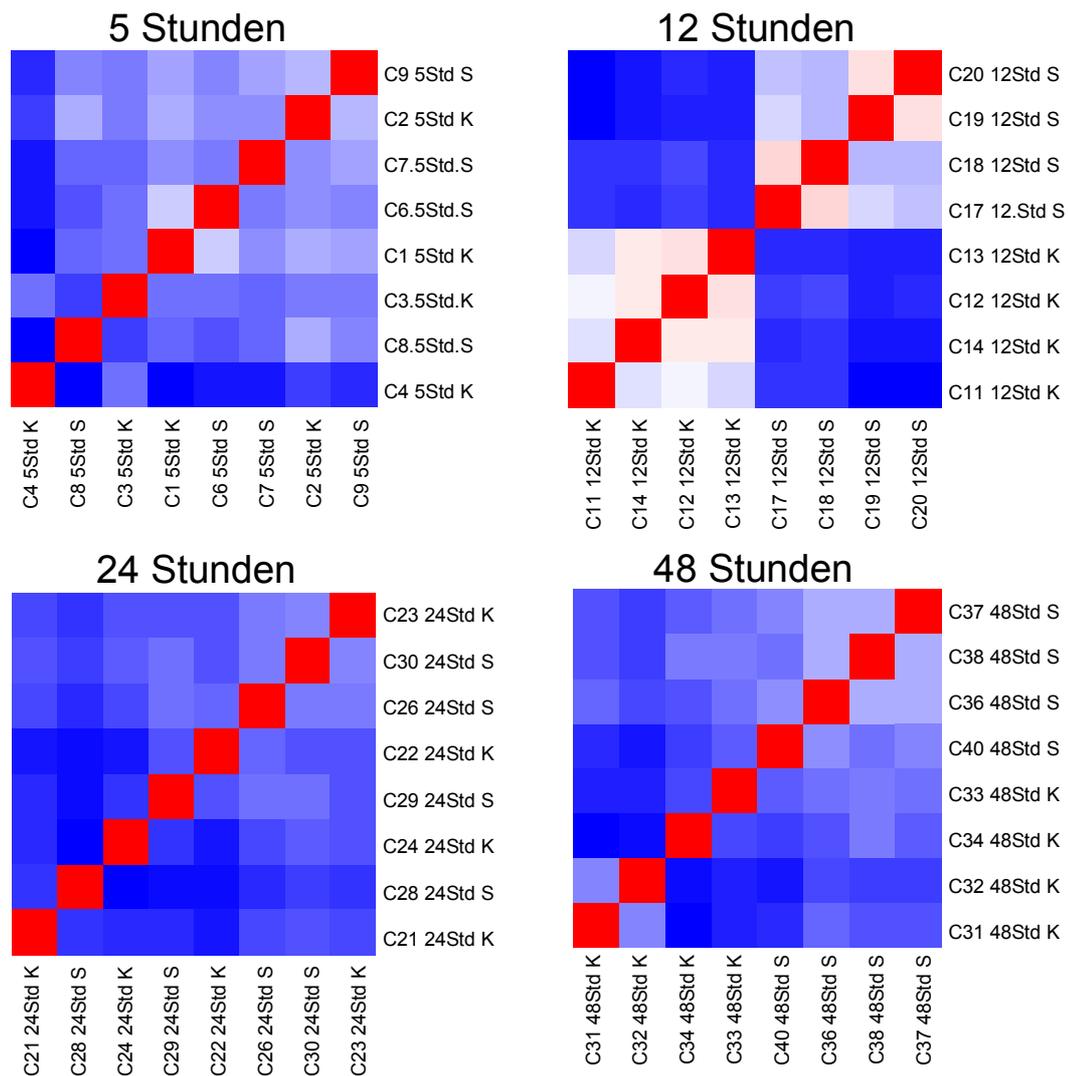
8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet. Hier dargestellt sind alle 40 Caecum-Proben. C steht für Caecum und die arabische Zahl für ein Huhn. Hinter der Tiernummer steht der Tötungszeitpunkt nach der Infektion. „S“ steht für Salonellen, in dieser Darstellung wurde die Kontrolltiere nicht dargestellt. Zu erkennen sind Varianzen innerhalb der einzelnen Gruppen.

**Abb. 23: Heatmap der Caeca (n = 4)**

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet. Hier dargestellt sind lediglich die Caecum-Proben, die in den weiteren Analysen berücksichtigt worden sind. Nach den Eigenkontrollen von Agilent und der Durchführung von „R“ kristallisierten sich diese hier dargestellten Tiere heraus (n = 4). „C“ steht für Caecum und die arabische Zahl für ein Huhn. Hinter der Tiernummer steht der Tötungszeitpunkt nach der Infektion. Zu erkennen ist, dass sich die Tiere innerhalb einer Gruppe nahe stehen. Das heißt, es lag eine geringe Varianz innerhalb einer kinetischen Gruppe vor. Diese hier dargestellten Tiere wurden für weitere Analysen herangezogen.

Zudem wurden mit der Software „R“ alle Zeitpunkte mit ihrer dazugehörigen Kontrollen analysiert, was in Abb. 24 dargestellt ist. Es kristallisierte sich lediglich bei den „12-Stunden-Tieren“ eine Varianz der Expressionsunterschiede zwischen den Kontrollen und den infizierten Tieren heraus. Dies bezieht sich allerdings nur auf die Caeca wie in Abb. 24 dargestellt. Bei den Caecaltonsillen zeigte sich keine Varianz der Expressionsunterschiede innerhalb der Gruppen und es wurde daher auf eine Abbildung verzichtet.

## Caecum



**Abb. 24: Heatmaps der Caeca zu den einzelnen Zeitpunkte**

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet. Die Proben wurden mit der Software „R“ ausgewertet. Lediglich bei der 12-Stunden-Gruppe des Caecums zeichnete sich eine Clusterbildung ab. „C“ steht für Caecum und die arabische Zahl für ein Huhn. Hinter der Tiernummer steht der Tötungszeitpunkt nach der Infektion. „K“ bedeutet Kontrolle und „S“ bedeutet Salmonellen und stellt daher die infizierten Tiere dar.

### Auswertung mittels der Software SAM

Die Software *significance analysis of microarrays* (SAM) dient dem Generieren von Listen signifikant regulierter Gene. Es wurde sowohl die Abfrage der einzelnen Zeitpunkte als auch eine *multiclass*-Abfrage durchgeführt. Beides wurde im Abschnitt 4.13 näher erläutert.

Bei einer *false discovery rate* (FDR) von 0,01 und einer Akzeptanz von einem *fold change* (FC) von +/- 1,5 ergaben sich folgende Anzahl von Genen, die gegenüber der Kontrolle signifikant reguliert waren.

Organ	Zeitpunkte	Anzahl der signifikant regulierten Gene
Caecum	5 Stunden	665
	12 Stunden	6561
	24 Stunden	1046
	48 Stunden	2566
Caecaltonsille	5 Stunden	871
	12 Stunden	1380
	24 Stunden	919
	48 Stunden	751

**Tab. 11: Anzahl der signifikant regulierten Gene des *in vivo* Versuches**

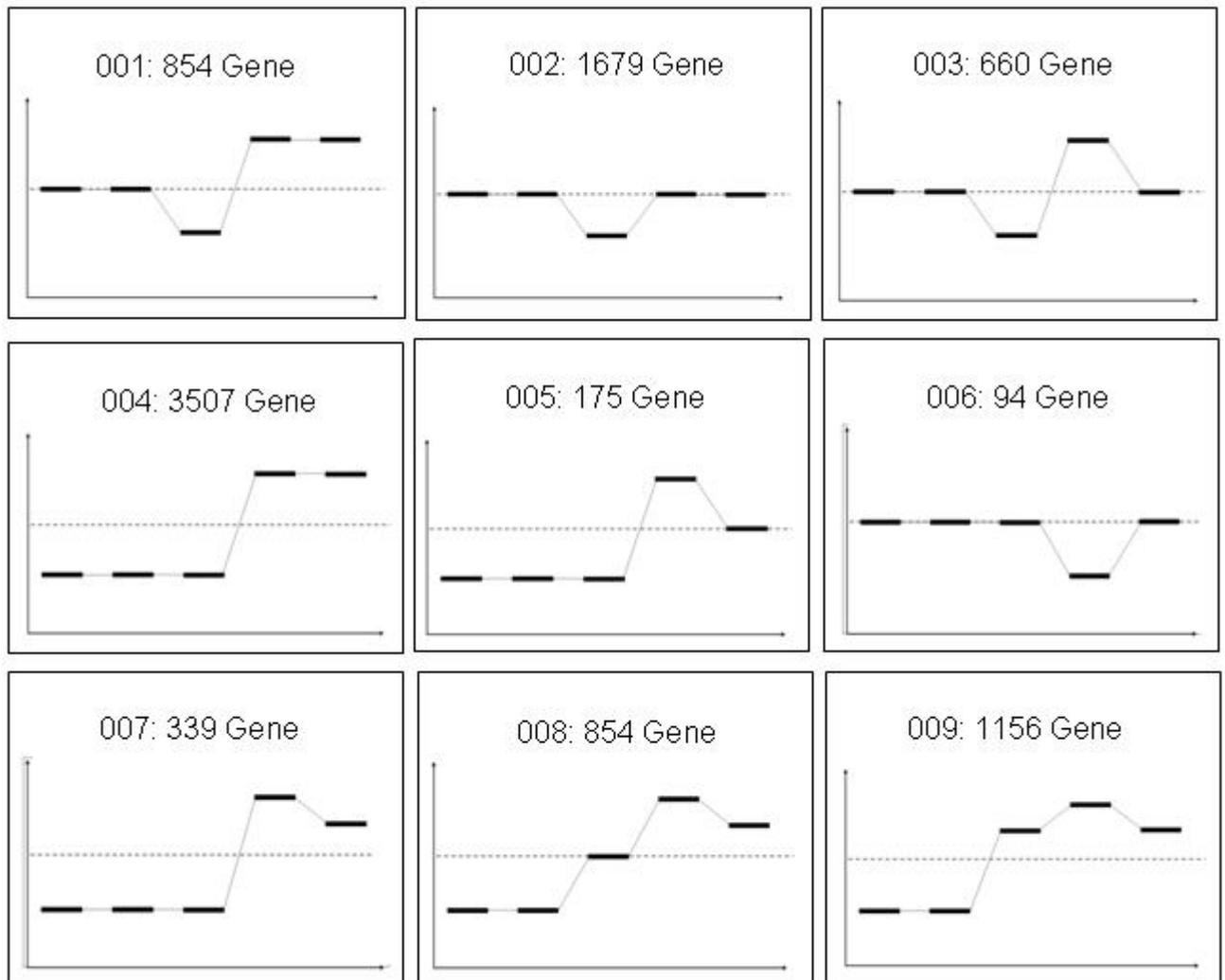
8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet; Caeca und Caecaltonsillen wurden für Arrayanalysen aufgearbeitet. Hier zusammengefasst sind die mit SAM generierten Anzahlen der signifikant regulierten Gene. Dies bezieht sich auf eine FDR von 0,01 und einem FC von +/- 1,5.

In Tab. 11 ist zu erkennen, dass beim Caecum auch hier bei zwölf Stunden das Maximum der Anzahl der signifikant regulierten Gene erreicht wurde, was sich bereits bei der Analyse der bakteriellen Last und den *heatmaps* abzeichnete. Die Zahl regulierter Gene der Caecaltonsillen zeigt ebenfalls bei zwölf Stunden ein Maximum, wobei das Gesamtniveau sehr viel niedriger ist als bei den Caecumproben.

### **Auswertung mittels der Software MEV**

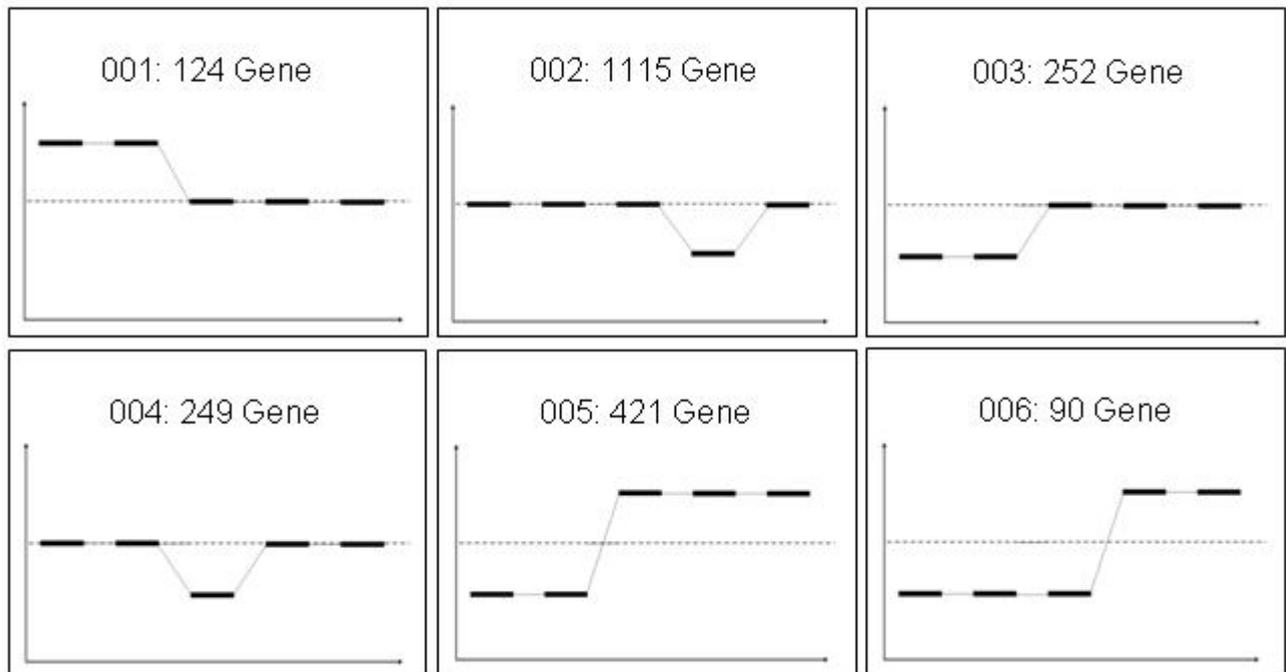
Durch die Software *multi experiment viewer* (MEV) wurde aus den normalisierten Daten in einer *multiclass*-Analyse ein Datenblatt erstellt, welches in MEV benutzt werden konnte. Diese Software wurde wie unter Punkt 4.13 beschrieben angewandt.

Die Analyse ergab spezifische Expressionsmuster, die eine bestimmte Anzahl von Genen enthielten. Das heißt diese Gene, die sich in dem gleichen Cluster befinden, verhielten sich in ihrer Expression auf sehr ähnliche Art und Weise. Abb. 25 (Caecum) und Abb. 26 (Caecaltonsille) fassen dies zusammen.

**Caecum****Abb. 25: MEV-Analyse signifikant regulierter Gencluster der Caecumproben**

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet; Caeca und Caecaltonsillen wurden für Arrayanalysen aufgearbeitet. In den Caeca ergaben sich durch die Software „MEV“ 9 signifikant regulierte Expressionsmuster. In einem jeweiligen Schaubild ist der erste Balken ein Kontrolle und stellt somit den Zeitpunkt 0 dar. Die weiteren Balken entsprechen dem zeitlichen Verlauf von 5, 12, 24 und 48 Stunden p.i.. Die mittlere grau gepunktete Linie entspricht einem unveränderten Expressionsniveau. In der Überschrift eines jeden Schaubildes steht die Anzahl der darin enthaltenen Gene.

## Caecaltonsille



**Abb. 26: MEV-Analyse signifikant regulierter Gencluster der Caecaltonsillen**

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet; Caeca und Caecaltonsillen wurden für Arrayanalysen aufgearbeitet. In den Caecaltonsillen ergaben sich durch die Software „MEV“ 6 signifikant regulierte Expressionsmuster. Zu erkennen sind je Schaubild 5 Balken, die der Kinetik entsprechen. Der erste Balken entspricht der Kontrolle und ist somit den Zeitpunkten 0. Nachfolgend sind die Zeitpunkte 5, 12, 24 und 48 Stunden p.i. dargestellt. Die mittlere grau gepunktete Linie entspricht einem unveränderten Expressionsniveau. In der Überschrift eines jeden Schaubildes steht die Anzahl der darin enthaltenen Gene.

Die Liste, um welche Gene es sich in diesen einzelnen Clustern handelte, befindet sich im Anhang 10.6. auf beigefügter CD.

### Pathway express

Pathway Express wurde wie unter Punkt 4.13 beschrieben durchgeführt. Der Stand der Annotation des Hühnergenoms war zum Zeitpunkt dieser Auswertung bei 13 353 Genen. Auch an dieser Stelle wird darauf hingewiesen werden, dass die hier zugrunde liegenden Gensymbole auf humanen Datenbank beruhen, welche von der Nomenklatur der Gene des Haushuhnes durchaus abweichen können.

Ein „corrected gamma p-value“ von 0,05 ist signifikant. Bei diesem *in vivo* Versuch wurde der „corrected gamma p-value“ von bis zu unter 0,25 beachtet, da auch Werte von über 0,05 biologisch relevant sein könnten.

Folgende Tab. 12 fasst die Anzahl der signifikanten Signalwege zusammen. Die

Liste, um welche Signalwege es sich dabei handelt und die dazugehörigen Graphiken befinden sich in Anhang 10.4.

Organ	Zeitpunkt	Anzahl der signifikanten Signalwege (p-Wert unter 0,05)	Anzahl der Signalwege (p-Wert unter 0,25)
Caecum	5 Stunden	14	41
	12 Stunden	41	66
	24 Stunden	20	53
	48 Stunden	32	55
Caecaltonsille	5 Stunden	23	54
	12 Stunden	11	40
	24 Stunden	13	41
	48 Stunden	17	44

**Tab. 12: Anzahl der signifikant regulierten Signalwege des *in vivo* Versuches**

Mit einem „corrected gamma p-value“ von bis zu unter 0,25 bzw. unter 0,05 ergaben sich die hier aufgelisteten Anzahlen der Signalwege. Wenn der p-Wert unter 0,05 war der Signalweg signifikant reguliert.

### Expressionswerte

Bei der Auswertung des *in vitro* Infektionsversuches in Abschnitt 5.4 wurde ein Schwerpunkt auf die Signalwege der Zytokine- und Toll-like-Rezeptoren gelegt. Daher wurde bei der Auswertung in vorliegendem *in vivo* Experiment derselbe Fokus festgelegt. Die Ergebnisse wurden in Abschnitt 5.5.7 vergleichend aufgelistet.

In Tab. 13 sind die Expressionswerte des *in vivo* Experimentes aufgeführt und es ist zu erkennen, dass im Gewebe der Caeca eine deutlichere Expressionsregulation stattfand als in den Caecaltonsillen. Die Höhe der Expressionsunterscheide bzw. die Regulation ins Positive oder Negative korrelierte mit Ausnahme von TRAIL-like, ein bisher nur beim Huhn annotiertes Gen, mit den Expressionsniveaus der *in vitro* Daten.

Deutlich unterschiedlich in ihrem Expressionsniveau zur Kontrolle waren IL1 $\beta$ , IL6, IL2, IL12p40, IL18, IFN- $\gamma$ , IL10, TNFSF5, TNFSF10 und TRAIL-like. Ferner waren die Chemokine CCL4, CCL20, und CXCL8 deutlich gegenüber der Kontrolle hoch reguliert. Ein bemerkenswerter Expressionsunterschied erzielte CCL20 mit einer 5-fachen Hochregulation gegenüber der Kontrolle; diese Tendenz zeigte sich bereits in der *in vitro* Studie. Die Toll-like-Rezeptoren sind nicht oder minimal runterreguliert.

Gruppe	Gensymbol	in vivo, Caecum				in vivo, Caecaltonsille			
		5 Std	12 Std	24 Std	48 Std	5 Std	12 Std	24 Std	48 Std
inflammatorische Zytokine	IL1 $\beta$	-	2,2	-	1,7	-	-	-	-
	IL6	-2,2	-	-	3,8	-1,7	-	-	1,7
Zytokine der Th1-Antwort	IL2	-1,7	1,6	-	2,1	-1,6	-	-	-
	IL12p40	-	-2,3	-	-	-	-	-	-
	IL18	-2,4	2,8	-	-	-	-	-	-
	IL15	1,8	4,2	-	-	-	-	-	-
	IFN $\gamma$	-	2,4	-1,6	1,9	-1,8	-	-	-
Zytokine der Th2-Antwort	IL10	-	-2,3	-	1,6	-	-	-	-
Interleukin-Rezeptoren	IL1R1	-	1,6	-	-	-	-	-	-
	IL1RL2	-	1,9	-	-	-	-	-	-
	IL1R2	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	IL2RA	-	-	-	1,7	-	-	-	-
	IL10RA	-	-2,0	1,9	2,4	-	-	-	-
	IL13RA2	-	-	-	1,9	-	-	-	-
	IL23R	-	-	-	1,7	-	-	-	-
Tumornekrose Faktor Superfamilie	TNFSF5 (CD40)	-	-	-	2,0	-	-	-	-
	TNFSF10 (TRAIL)	-	-	1,8	2,1	-	-	-	-
	TNFRSF11B	-	-	-	-	-	-	-	-
	TNFSF15 (TL1a)	-	-	-	-	-	-	-	-
	TNFRSF18	-	2,7	-	-	-	-	-	-
	TNFRSF23 (mSOB)	-	-	-	-	-	-	-	-
	TRAIL-like	2,9	3,0	4,5	4,7	-	-	-	-
Chemokine	CCL1	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCL4 (K203)	-	3,7	-	-	-	-	-	-
	CCL20	-1,7	5,0	-	-	-	-	-	-
	CXCL8 (IL8)	-2,2	2,9	-	2,6	-	-	-	-
	K60 (IL8-Homolog)	-1,9	3,2	-1,1	2,3	-	-	-	-
	CXCL13	-2,6	-	-	2,8	-1,6	-	-	-
Chemokin-Rezeptoren	CXCR7	-	-	-	-	-	-	-	-
	CCR6	-	-	-	1,7	-	-	-	-
Toll-like-Rezeptoren	TLR2	-	-	-	-	-	-	-	-
	TLR4	-	-1,6	-	-	-	-	-	-
	TLR5	-	1,6	-	-	-	-	-	-
	TLR15	-	-	-	2,2	-	-	-	-
Stoffwechsellmoleküle der Makrophagen	iNOS	-	1,7	-	2,6	-	-	-	-

**Tab. 13: im Array gemessene Expressionsdaten des *in vivo* Experimentes**

8 Wochen alte Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet. Als Probenmaterial dienten Caecum und Caecaltonsillen. Die vorliegende Tabelle zeigt die Expressionswerte gegenüber der Kontrolle. Die Auswahl der Gene orientierte sich an den *in vitro* Daten wie es sich in 5.4.4 abzeichnete. Es kristallisierte sich ein Fokus auf Vertreter der Interleukine, Interferone, Tumor Nekrose Faktoren Familienmitglieder und Chemokine heraus. Bei mit Gedankenstrich versehenen Feldern handelte es sich um nicht signifikante Werte, sie sind daher nicht dargestellt.

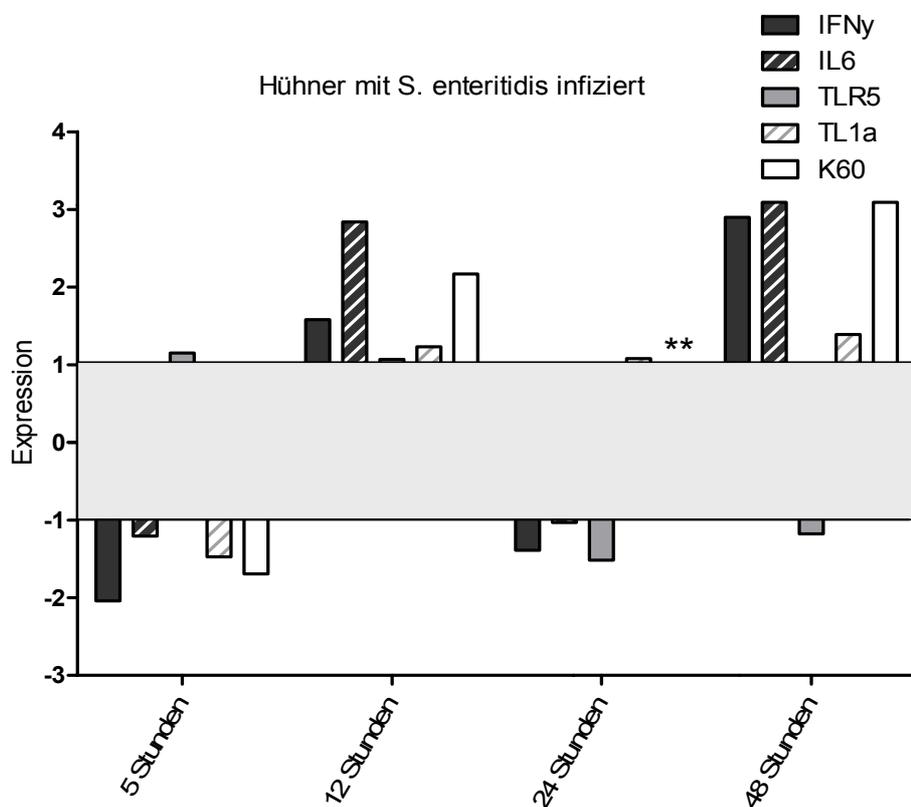
### 5.5.6. qRT-PCR

IFN- $\gamma$ , IL6, TLR5, TL1a und K60 wurden in der qRT-PCR validiert. Die Genexpression gegenüber der Kontrolle wird in Abb. 27 graphisch dargestellt.

Auffällig ist, dass bei den Zeitpunkten 5 und 24 Stunden, eine verminderte Regulation und bei den Zeitpunkten 12 und 48 Stunden eine Hochregulation überwog. Nach 12 Stunden ist ein Höhepunkt der Expressionsunterschiede zu erkennen. Diese Tatsache korrelierte mit den 12 Stunden Maxima bei der

bakteriologischen Untersuchung (5.5.2) und der Arrayanalyse (5.5.5).

IFN- $\gamma$  zeigte 12 und 48 Stunden p.i. eine erhöhte und 5 und 24 Stunden p.i. eine verminderte Expression. IL6, ein proinflammatorisches Zytokin, zeigte eine deutliche und erwartete Hochregulation. Die nahezu unveränderte Expression von TLR5, einem *pattern recognition receptor* (PRR), welcher Flagellin bindet, zeichnete sich bereits in den Arrayanalysen ab. TL1a des Huhnes, welches als möglicher funktioneller Ersatz für TNFSF15 der Maus postuliert wird, zeigte im Verlaufe der Kinetik eine geringe Hochregulation. K60, ein IL8-Homolog, stieg mit Ausnahme des 24 Stunden Wertes stetig an. Insgesamt wurden die Verhältnisse aller Expressionsdaten aus der Arrayanalyse mit der qRT-PCR-Methode bestätigt, was in 5.5.7 gezeigt ist.



**Abb. 27:** in der qRT-PCR gemessene Expressionswerte des *in vivo* Experimentes in einer Graphik

8 Wochen alte SPF-Hühner wurden mit *S. enteritidis* infiziert und nach 5, 12, 24 und 48 Stunden getötet. Die gewonnenen Proben wurden bereits in der Microarray-Analyse gemessen und nun in der qRT-PCR vergleichend analysiert. Auf der Ordinate ist die Expression gegenüber der Kontrolle aufgetragen. Auf der Abszisse sind die gemessenen Gene zu finden. Bei dieser Darstellung ist zu beachten, dass Werte unter 1,0 als  $-1/(2^{-ddCt})$  dargestellt sind, um die tatsächliche Expressionsminderung gegenüber der Kontrolle zu verdeutlichen. Werte über 1,0 entsprechen einer Expressionssteigerung und sind die  $2^{-ddCt}$ -Werte. Der grau hinterlegte Bereich zwischen 1 und -1 beschreibt einen Bereich, in dem die Genexpressionsunterschiede als nicht signifikant anzusehen sind.

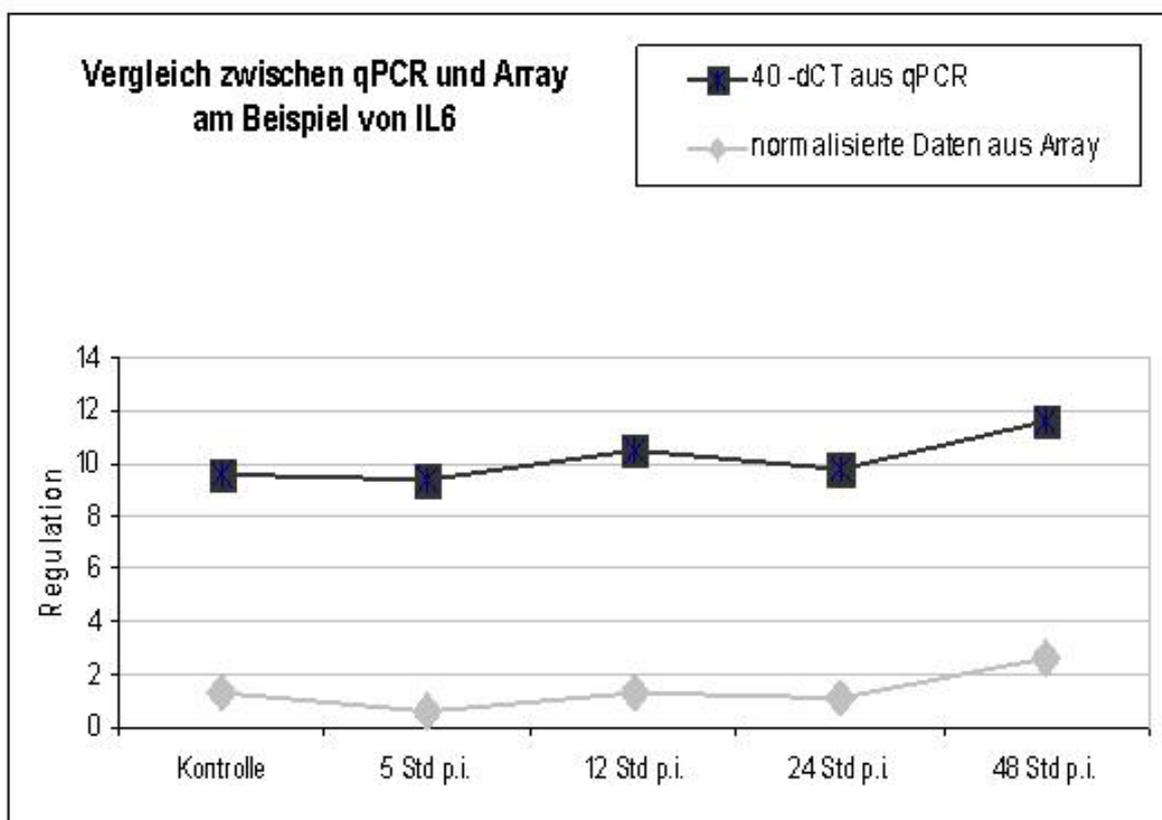
\*\* K60 war 24 Stunden p.i. nicht signifikant reguliert.

### 5.5.7. Analysenvergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien

Ziel vorliegender Studie war es die Veränderung der Genexpression im Hinblick auf die angeborene Immunantwort des Haushuhnes nach einer Salmonelleninfektion zu analysieren. Zu diesem Zwecke wurden Infektionsversuche sowohl in Hühnern als auch in kultivierten Makrophagen mit demselben *Salmonella* Serotyp durchgeführt. Um die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Experimente besser vergleichen zu können, sind diese in Tab. 14 gegenübergestellt.

#### Vergleich zwischen Array- und qRT-PCR Methode

Wenn die Expressionsdaten des Microarrays mit denen der qRT-PCR direkt in Vergleich gegenüber gestellt werden, so bestätigen sich die Ergebnisse. Alle Gene, die in der qRT-PCR gemessen wurden, wurden mit den normalisierten Daten des Arrays verglichen. Dies wurde in folgendem Schaubild beispielhaft an IL6 im Caecum abgebildet.



**Abb. 28: Vergleich der Expressionsdaten zwischen Array und qRT-PCR**

Hier wurden Daten des *in vivo* Versuches direkt gegenübergestellt. Zum einen die normalisierten Daten des Arrays und zum anderen die 40- $\Delta$ Ct-Werte der qRT-PCR. Es zeigt sich deutlich, dass die Verhältnisse sehr ähnlich sind und beide Methoden in ihrer Zuverlässigkeit bestätigt werden.

## Vergleich der Array Expressionsdaten

Aufgrund oben beschriebener Vergleichbarkeit zwischen Array und qRT-PCR, wird nun im Folgenden der Fokus auf die Arraydaten gelegt. Schließlich verschafft diese Methode einen Überblick über das gesamte Hühnergenom, soweit zumindest annotiert. Diese Arbeiten wurden wie unter Punkt 4.12.3 beschrieben bei einem Stand von 13 353 annotierten Genen durchgeführt.

Wenn die Daten der Arrays miteinander verglichen werden, was folgende Tab. 14 zeigt, ist ein deutlicher Unterschied, dass bei den *in vitro* Daten die Expressionsniveaus insgesamt sehr viel höher sind. Dies ist zu erwarten. Es wurde eine reine Makrophagenkultur mit Salmonellen infiziert; dem gegenüber stand im *in vivo* Versuch ein gesamter Organismus mit zellulären Barrieren und Matrix entgegen.

Des Weiteren zeigten die Caecaltonsillen-Proben sehr viel weniger signifikant regulierte Gene. Dem gegenüber reagierten die Caeca mit einer deutlich höheren Anzahl signifikant regulierter Gene.

Gruppe	Gensymbol	in vivo, Caecum				in vivo, Caecaltorsille				in vitro
		5 Std	12 Std	24 Std	48 Std	5 Std	12 Std	24 Std	48 Std	4 Std
inflammatorische Zytokine	IL1 $\beta$	-	2,2	-	1,7	-	-	-	-	14,8
	IL6	-2,2	-	-	3,8	-1,7	-	-	1,7	28,0
Zytokine der Th1-Antwort	IL2	-1,7	1,6	-	2,1	-1,6	-	-	-	7,8
	IL12p40	-	-2,3	-	-	-	-	-	-	146,8
	IL18	-2,4	2,8	-	-	-	-	-	-	2,9
	IL15	1,8	4,2	-	-	-	-	-	-	-2,0
	IFN $\gamma$	-	2,4	-1,6	1,9	-1,8	-	-	-	17,7
Zytokine der Th2-Antwort	IL10	-	-2,3	-	1,6	-	-	-	-	9,5
Interleukin-Rezeptoren	IL1R1	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-2,9
	IL1RL2	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-1,6
	IL1R2	-	2,5	-	-	-	-	-	-	1,9
	IL2RA	-	-	-	1,7	-	-	-	-	2,4
	IL10RA	-	-2,0	1,9	2,4	-	-	-	-	4,7
	IL13RA2	-	-	-	1,9	-	-	-	-	11,5
	IL23R	-	-	-	1,7	-	-	-	-	2,6
Tumornekrose Faktor Superfamilie	TNFSF5 (CD40)	-	-	-	2,0	-	-	-	-	17,7
	TNFSF10 (TRAIL)	-	-	1,8	2,1	-	-	-	-	-
	TNFRSF11B	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7
	TNFSF15 (TL1a)	-	-	-	-	-	-	-	-	16,2
	TNFRSF18	-	2,7	-	-	-	-	-	-	-5,6
	TNFRSF23 (mSOB)	-	-	-	-	-	-	-	-	8,5
	TRAIL-like	2,9	3,0	4,5	4,7	-	-	-	-	-2,8
Chemokine	CCL1	-	-	-	-	-	-	-	-	65,6
	CCL4 (K203)	-	3,7	-	-	-	-	-	-	31,9
	CCL20	-1,7	5,0	-	-	-	-	-	-	285,6
	CXCL8 (IL8)	-2,2	2,9	-	2,6	-	-	-	-	5,9
	K60 (IL8-Homolog)	-1,9	3,2	-1,1	2,3	-	-	-	-	7,6
	CXCL13	-2,6	-	-	2,8	-1,6	-	-	-	4,9
Chemokin-Rezeptoren	CXCR7	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0
	CCR6	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-
Toll-like-Rezeptoren	TLR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-1,9
	TLR4	-	-1,6	-	-	-	-	-	-	-3,7
	TLR5	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-2,0
	TLR15	-	-	-	2,2	-	-	-	-	2,8
Stoffwechsellipide der Makrophagen	INOS	-	1,7	-	2,6	-	-	-	-	18,5

**Tab. 14: Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Array Expressionsdaten**

In dieser Tabelle sind alle Array Expressionsdaten der Gene, auf die der Fokus gelegt wurde und annotiert waren, zusammengefasst. Zum einen die Daten der zwei Organe (Caecum und Caecaltonsille) des *in vivo* Versuches zu den Zeitpunkten 5, 12, 24 und 48 Stunden. Und zum anderen die Daten aus dem *in vitro* Versuch, bei dem primäre Makrophagen über 4 Stunden mit einer MOI von 10 und demselben Salmonellen Serotyp infiziert wurden.

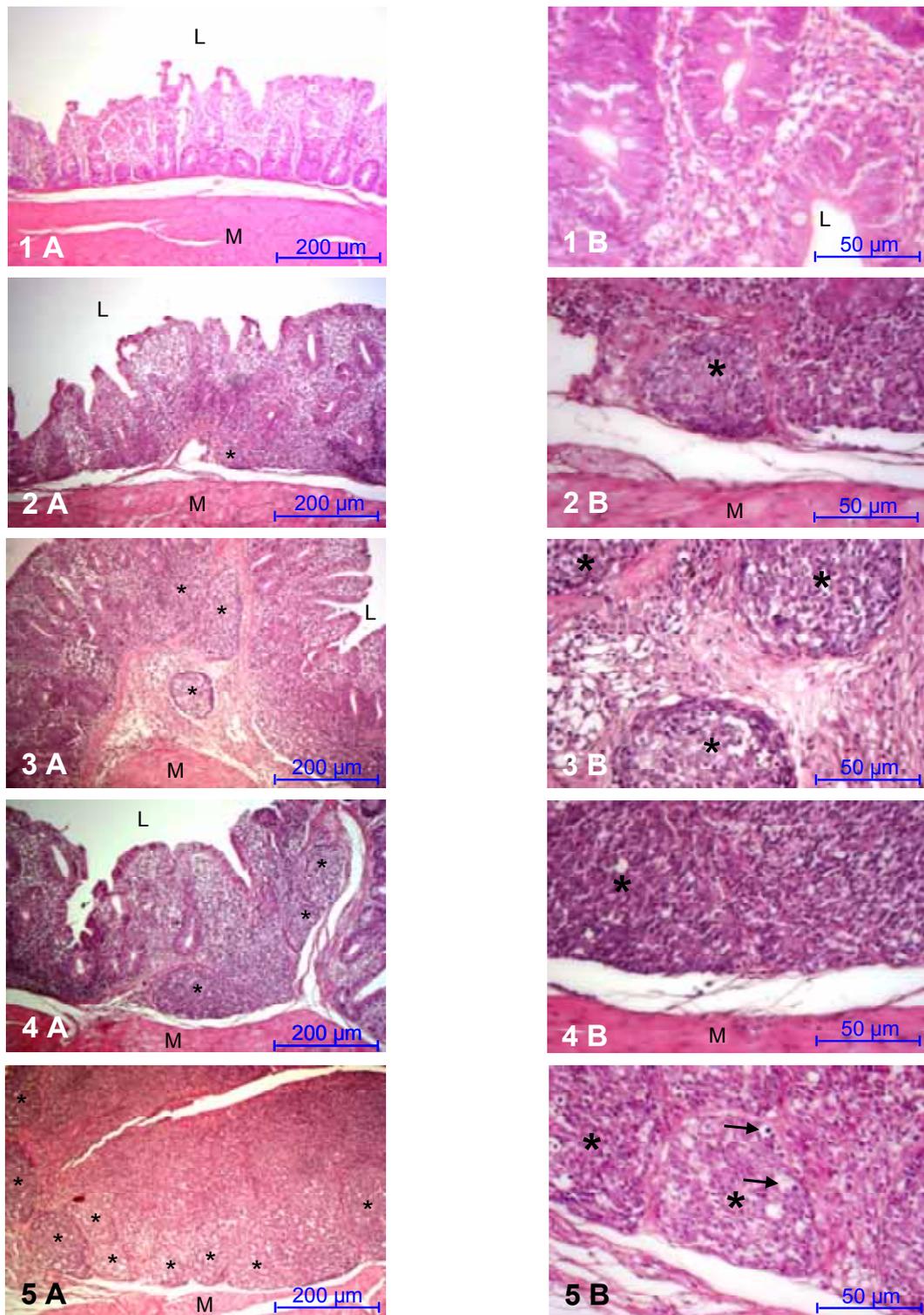
**5.5.8. Histologie**

Die Caecum- und Caecaltonsillen-Proben des *in vivo* Experimentes wurden durch Hämatoxylin-Eosin- und Giemsa-Färbung histologisch untersucht.

**Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der Unterscheidung von Gewebestrukturen. Vor allem Zellkerne werden klar angefärbt.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Mukosa im Verlaufe der Infektion in ihrer Masse zunahm. Zudem fanden sich vermehrt mononukleäre Zellen, wobei es sich scheinbar um Entzündungszellen handelte. Des Weiteren sind Zellen mit großem zytoplasmatischem Anteil zu erkennen, was auf Fresszellen schließen lässt. Zusammenfassend ist zu erkennen, dass ein Entzündungsgeschehen stattfindet.



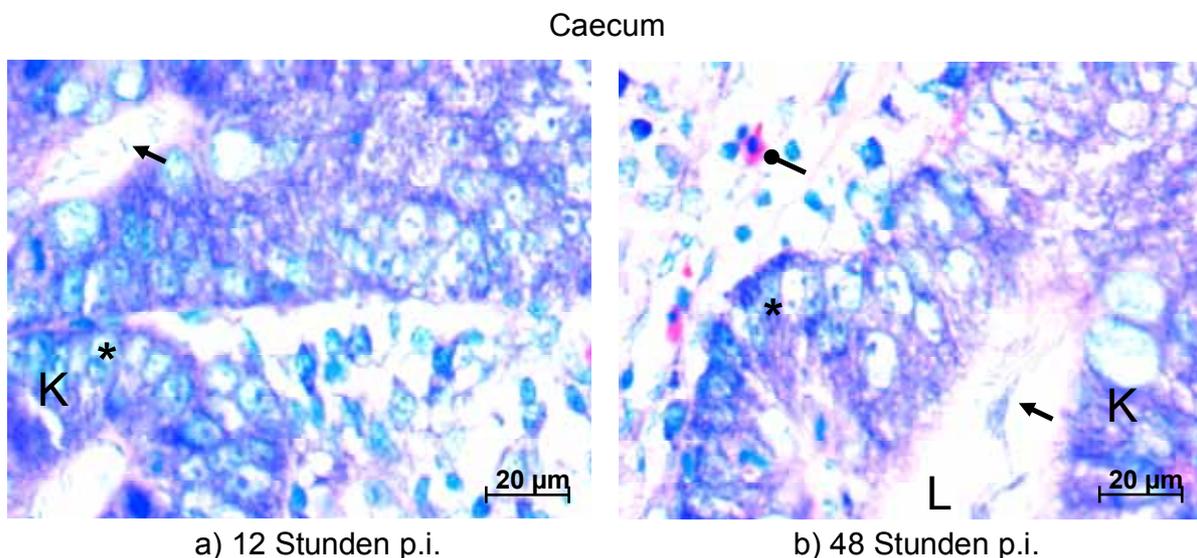
**Abb. 29: Verlauf einer *S. enteritidis* Infektion im Caecum des Huhnes (HE-Färbung)**

Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Kontrolle (1), 5 Stunden p.i. (2), 12 Stunden p.i. (3), 24 Stunden p.i. (4), 48 Stunden p.i. (5), jeweils mit 10facher (A) und 40facher (B) Vergrößerung gezeigt. Durch \* werden die Germinalen Zentren gekennzeichnet. M betitelt die Zona Muscularis und L das Darmlumen. Die mit Pfeil markierten Zellen sind Zellen, die einen großem zytoplasmatischen Anteil aufweisen, welches auf Fresszellen hindeutet.

### Giemsa-Färbung

Durch eine Giemsa-Färbung sollte einerseits bewiesen werden, dass die Salmonellen in dem erwarteten Zielorgan tatsächlich zu finden waren und andererseits wurde sie als Übersichtsfärbung durchgeführt.

Die mit Formalin fixierten Proben wurden auch mit der Giemsa-Färbung wie in Abb. 30 gezeigt angefärbt. Der Vorteil an dieser Färbung ist die klare Erkennung der Bakterien. Allerdings waren die Salmonellen intraepithelial nur schwer zu differenzieren. Beispielhaft sind in folgender Abbildung zwei Schnitte von Caecumgewebe gezeigt. Bemerkenswert ist, dass in den histologischen Schnitten der Caecaltonsillen keine Salmonellen zu finden waren (nicht gezeigt).



**Abb. 30: Verlauf einer *S. enteritidis* Infektion im Caecum des Huhnes (Giemsa-Färbung)**

Diese Schnitte zeigen Caeca, die 12 Stunden p.i. (a) und 48 Stunden p.i. (b) gewonnen worden sind. Sie sind in 100facher Vergrößerung abgebildet. Durch den klassischen Pfeil sind die Salmonellen, durch den abgerundeten Pfeil die Erythrozyten und durch Sternchen werden die Epithelzellen gekennzeichnet. L betitelt das Darmlumen und K die caecalen Krypten. In den Caecaltonsillen hingegen waren keine Salmonellen zu finden

## 6. DISKUSSION

Salmonellosen des Menschen sind nach Infektionen mit *Campylobacter* die zweithäufigste durch Lebensmittel übertragene bakterielle Infektion in Deutschland und der Europäischen Union. Die wichtigste Infektionsquelle dieser Erkrankung sind vom Huhn stammende Lebensmittel wie Eier, Eiprodukte und das Fleisch der Tiere. Dabei sind die nicht wirts-spezifischen Serovare *S. typhimurium* und *S. enteritidis* die häufigsten Auslöser gastro-intestinaler Erkrankungen beim Menschen. Beide Erreger können Hühner infizieren, ohne aber eine Erkrankung bei den Tieren auszulösen. Die gesetzlich vorgeschriebene Impfung von Legehennen hat sich nicht nur unter experimentellen, sondern auch unter Feldbedingungen als geeignete Maßnahme zur Reduktion von Salmonellosen beim Menschen erwiesen und wird daher auch zukünftig ein wichtiges Instrument zur Kontrolle von Salmonellosen sein. Die Mechanismen der Impfstoffwirkung sind aber immer noch weitgehend unklar, ebenso wie die immunologischen Kontrollmechanismen im Huhn, die für die geringe Empfänglichkeit der Tiere gegenüber den nicht-wirtsspezifischen Salmonellen verantwortlich sind. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Erkenntnisse aus der Maus auch für das Huhn Gültigkeit haben. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass das *S. typhimurium* Modell in der Maus eher *S. typhi* Infektionen des Menschen mit schweren Krankheitsverläufen widerspiegelt, nicht aber die Situation der inapparenten Infektion im Huhn [127, 128]. Es kann daher angenommen werden, dass Hühner Immunreaktionen auf eine Salmonelleninfektion zeigen, die sich sowohl qualitativ als auch quantitativ von denen des Mausmodells unterscheiden. Sinnvoll erscheinen daher nur Studien, die direkt im aviären System durchgeführt werden.

Seit der Entdeckung der Dichotomie des adaptiven Immunsystems und der Ontogenese lymphatischer Organe im Huhn [129, 130] wurden erhebliche Fortschritte auf dem Gebiet der Hühnerimmunologie gemacht. Insbesondere die Sequenzierung des Hühnergenoms [4] hat der Vogelimmunologie geholfen jene Gene zu identifizieren, die entscheidende Funktionen in der Abwehr von Infektionserkrankungen übernehmen. Im Besonderen wurden zahlreiche Chemokine und Zytokine klassifiziert, die aus dem Mausmodell bekannte Funktionen im Rahmen der Immunabwehr zeigen. Zudem konnten neue Technologien, wie die holistische Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Microarrays, auch für das Huhn etabliert und

bis zur Anwendungsreife entwickelt werden. Damit stehen heute neue und leistungsfähige Methoden zur Untersuchung der Immunreaktion auf Infektionskrankheiten beim Huhn zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Microarrays verwendet, um sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zur Immunreaktion auf *S. enteritidis* Infektionen durchzuführen.

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion mit Salmonellen, da sie die Bakterien aufnehmen können, ohne sie aber effizient zu eliminieren [64]. Vielmehr haben Salmonellen zahlreiche Mechanismen entwickelt, um in diesen Zellen zu überleben und sie als Vehikel zur systemischen Ausbreitung zu nutzen (siehe Punkt 2.2.6). Entsprechend stand die Interaktion von Salmonellen mit diesen Zellen auch in früheren Studien im Zentrum des Interesses. Die bislang bekannten Erkenntnisse zur Reaktion der frühen angeborenen Immunantwort stammen vor allem aus *in vitro* Studien mit der Hühner-Makrophagenlinien HD11 [131-133]. Allerdings ist diese Zelllinien, wie auch die meisten anderen aviären Zelllinien, aus einer retroviralen Transformation hervorgegangen, woraus zahlreiche Veränderungen im Genom der Zellen und in der Genexpression resultieren [134]. Dies demonstrierte auch eine Arbeit aus dem Jahre 2001, in welcher primäre Makrophagen und Zelllinien mittels Chemilumineszenz-Analysen miteinander verglichen wurden. Genannte Zellen zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Reaktion. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf einen Einfluss auf ihre Genexpression übertragbar [135]. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Studie primäre Hühnermakrophagen für die *in vitro* Studien genutzt. Ergänzend sollten in einer *in vivo* Untersuchung an einem *S. enteritidis* Infektionsmodell vergleichende Daten erarbeitet werden. Als analytische Methode sollte dazu die Microarray basierte Genexpressionsanalyse zur Anwendung kommen, die simultane Untersuchung von tausenden von Genen in einer Probe ermöglicht..

## 6.1. Agilent Microarray Technologie

Für die hier durchgeführten Analysen der angeborenen Immunantwort wurde die Microarray-Technologie der Firma Agilent gewählt. Agilent Microarrays ermöglichen die zeitgleiche Untersuchung von tausenden Transkripten bei einer hohen Flexibilität und Empfindlichkeit. Als Format wurden die 4x44K Variante gewählt, die die gleichzeitige Hybridisierung von 4 Arrays mit je 44 000 Oligonukleotidsequenzen ermöglicht. Eine Besonderheit der Agilent-Technologie ermöglichte es zudem, das

bestehende Katalog-Array, das einen Querschnitt aller bekannter DNA-Sequenzen des Hühnergenoms enthält, um weitere Oligonukleotide zu erweitern. Daher wurden für die vorliegende Arbeit weitere 1 699 Sequenzen von bekannten und immunologisch besonders relevanten Genen ausgewählt und vom Hersteller nach unseren Angaben auf die Array-Slides aufgetragen. Um die funktionellen Untersuchungen der Array-Expressionsdaten zu ermöglichen, wurden den Sequenzen die entsprechenden Gene zugeordnet. Anzumerken ist, dass sich die Annotation, die vom Hersteller durchgeführt wurde, auf lediglich ca. 6 000 Gene beschränkte und damit die Möglichkeiten eines 44K Arrays bei weitem nicht ausschöpfte. Die hier zusätzlich durchgeführte Annotation des Katalog- und Custom-Arrays ergab, wie unter 5.2 erläutert, eine Zahl von 24 515 Sequenzen, die ihrem entsprechenden Gen zugeordnet werden konnten. Hierunter befanden sich zahlreiche Gene, die mehrfach auf dem Array vertreten waren, so dass tatsächlich 13 353 Gene auf dem Array identifiziert werden konnten. Schätzungen über den Umfang des Hühnergenoms gehen von einer dem humanen Genom ähnlichen Anzahl von ca. 20 000 bis 22 000 Genen aus [4], denen jedoch zu einem erheblichen Teil noch keine Funktion zugeordnet werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der hier verwendete Array nach der Annotation das Hühnergenom ausreichend gut repräsentiert und damit die Erstellung von genomweiten Expressionsprofilen ermöglicht.

### **6.1.1. Statistische Auswertungsmethoden**

Die Verwendung kommerzieller Microarrays ermöglicht die schnelle und hochgradig reproduzierbare Probenanalyse. Die wesentliche Herausforderung bei solchen holistischen Analysen liegt in der nachfolgenden Datenauswertung. Um diese auf einer statistischen Grundlage auszuführen, wurden die Daten mittels SAM einer Signifikanzanalyse unterzogen. Die durchgeführten „*two class unpaired*“ und „*Multiclass*“ Analysen stellen somit die Grundlage für zwei mögliche Betrachtungsweisen der Microarray-Auswertung dar. In der „*two class unpaired*“ Signifikanzbestimmung werden zwei Gruppen einander gegenübergestellt, so dass die direkten Expressionsunterschiede als „*Fold Change*“ (FC) dargestellt werden können. Dies ermöglicht die Evaluierung der Gene, die zwischen den verglichenen Infektionszeitpunkten bzw. Proben eine differentielle Expression zeigen. Aus diesen Gegenüberstellungen konnten funktionell genomische Untersuchungen, wie

Signalweganalysen und die Einteilung der Gene in funktionelle Gruppen, durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Auswertungen zeigen dabei nicht nur für die einzelnen Vergleiche charakteristisch regulierte Signalwege, sondern auch solche, die in jedem der vier angesetzten Gegenüberstellungen signifikant differentiell reguliert waren.

Dem entgegen gibt die „*Multiclass*“-Signifikanzanalyse die statistische Grundlage für die Betrachtung des Genexpressionsverlaufs über mehrere Zeitpunkte wieder. Die signifikant regulierten Gene wurden in Clusteranalysen gefiltert und in Expressionsprofile eingeteilt, so dass Gene mit ähnlichem Verhalten Gruppen zugeordnet werden konnten. Anhand dieser Profile können Gene die an bestimmten Zeitpunkten aktiv sind, in Zusammenhang mit der Salmonelleninfektion gesehen werden. Die Größe der erstellten Cluster spiegelt die bereits in den Einzelvergleichen gewonnenen Erkenntnisse wieder. Im *in vivo* Versuch ergaben sich für das Caecum neun und für die Caecaltonsille sechs signifikant regulierte Cluster.

## **6.2. *in vitro* Infektionsexperimente mit primären Makrophagen**

In einem ersten Versuchsansatz sollte die Microarray-Technologie zur Untersuchung der Reaktion primärer Makrophagen auf eine Infektion mit *S. enteritidis* genutzt werden. Dabei sollte die Technologie erstmals im eigenen Labor in einem Infektionsmodell auf ihre Anwendbarkeit geprüft werden. Zugleich ermöglichte dieser Ansatz aber auch die Analyse der Genexpressionsmuster von infizierten versus nicht infizierten primären Makrophagen. Die Isolierung und Kultivierung von primären Hühnermakrophagen stand als etabliertes System im Labor zur Verfügung. Allerdings existierten keine Erkenntnisse über die Reaktion dieser Zellen auf eine Salmonelleninfektion. Auch die verfügbare Literatur lieferte keine Hinweise für eine Optimierung des Infektionssystems. Entsprechend wurden zunächst umfangreiche Vorversuche zur Infektionskinetik, zur zellulären Reaktion und zur Optimierung der Infektionsdosis durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Infektion der Zellen mit einer MOI von 1 zu den besten Ergebnissen hinsichtlich der Vitalität der Makrophagen über einen längeren Zeitraum (bis 24 Stunden) führte. Bei einer MOI von 10 konnten bis 8 Stunden nach Infektion überwiegend vitale Makrophagen rückisoliert werden, die effizient Bakterien aufgenommen hatten. In den über diesen Zeitpunkt hinausgehenden Versuchen ergab sich, dass die Bakterien in den Zellen replizieren können. Diese Beobachtung entspricht den im Mausmodell erarbeiteten Daten, die

zeigen, dass Salmonellen zahlreiche Mechanismen entwickelt haben, um in der bakteriziden Umgebung im Makrophagen überleben zu können [136-139]. Ebenfalls in Übereinstimmung mit publizierten Daten ist der beobachtete Effekt von IFN- $\gamma$  auf die Replikationsfähigkeit der Bakterien in den Makrophagen [140, 141]. Die Voraktivierung der Zellen mit IFN- $\gamma$  führte zwar nicht zu einer Steigerung der Bakterienaufnahme, bewirkte aber die Aktivierung bakterizider Mechanismen und damit die effektive Abtötung der aufgenommenen Salmonellen. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass primäre Hühnermakrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  zahlreiche toxische Moleküle bilden, darunter in hohen Konzentrationen Stickstoffmonoxid [142, 143]. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass das Makrophagensystem des Huhns in der Abwehr von Salmonelleninfektionen eine große Homologie zu dem der Maus aufweist.

Bis heute wurde keine Arbeit publiziert, die umfassende Genexpressionsanalysen der Immunreaktion von primären Hühnermakrophagen als Reaktion auf eine Salmonelleninfektion beschreibt. Die Analyse der Expressionsdaten zeigte, dass Salmonellen infizierte Makrophagen bereits 4 Stunden nach der Infektion eine ganze Reihe immunregulatorischer Moleküle bilden. Erwartungsgemäß fanden sich darunter solche Faktoren, die als prototypische Zytokine der Entzündungsreaktion bekannt sind. Neben IL1 $\beta$  und IL6 sind dies auch Zytokine aus der TNF-Familie (siehe Tab. 9). Für weiterführende Studien erscheint in diesem Zusammenhang das Zytokin TL1a besonders interessant. TL1a wurde erst kürzlich beim Huhn charakterisiert und als mögliches funktionelles Homolog zu TNF- $\alpha$  beschrieben [144]. Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass TNF- $\alpha$  bei vielen Infektionserkrankungen eine zentrale Rolle in der Abwehr spielt [145]. Interessanterweise wurde dieses Zytokin bisher nicht im Hühnergenom gefunden [146], was zu der Hypothese führte, dass TL1a möglicherweise die Funktion von TNF- $\alpha$  beim Huhn übernehmen könnte [144].

Auffällig war in den Datensätzen, dass infizierte Makrophagen praktisch keine Th2-Zytokine bildeten, dagegen mit IL12p40, IL18 und IFN- $\gamma$  die drei wichtigsten Th1-Zytokine exprimierten. Die Infektion mit Salmonellen induziert offensichtlich eine deutlich polarisierte Immunreaktion, die zur Aktivierung von Th1-Zellen führt und damit zellvermittelte Abwehrprozesse induziert. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit Daten aus dem Säugersystem, die zeigen, dass humorale Abwehrmechanismen in der Kontrolle von Salmonelleninfektionen eine

untergeordnete bzw. gar keine Rolle spielen [147]. Gleiches wurde kürzlich mit Hilfe von Burspektomieexperimenten auch für das Huhn nachgewiesen [148]. Die beobachtete Polarisierung der Makrophagenreaktion hin zur Aktivierung einer Th1-Reaktion untermauert damit weiter das Konzept, dass auch beim Huhn die zelluläre Immunreaktion die führende Rolle in der Salmonellenabwehr übernimmt. Allerdings gilt es, diese Hypothese durch funktionelle *in vivo* Untersuchungen zu beweisen. Hier bietet sich die Behandlung von Tieren mit rekombinantem IFN- $\gamma$ , dem Th1-Effektorzytokin, vor einer Infektion mit *S. enteritidis* an. Dass ein solcher experimenteller Ansatz durchaus sinnvoll ist, zeigen die eigenen Untersuchungen mit Makrophagenkulturen. Makrophagen, die *in vitro* mit IFN- $\gamma$  voraktiviert wurden, waren in der Lage die Infektion mit *S. enteritidis* zu kontrollieren und die Bakterien nach der Aufnahme in die Zelle zu eliminieren. In nicht aktivierten Makrophagen kam es dagegen zu einer signifikanten Vermehrung der Bakterien (siehe Abb. 12). Übertragen auf die *in vivo* Situation kann hieraus abgeleitet werden, dass Tiere, die eine deutliche Th1-Immunantwort ausbilden, Salmonelleninfektionen kontrollieren können, während Tiere die nur eine schwache oder keine Th1-Zytokinbildung zeigen dagegen für die Salmonelleninfektion hochgradig empfänglich sein dürften. Dieser Zusammenhang ist auch aus tierzüchterischer Sicht von Interesse, da sich hiermit erste Kandidatengene für die Selektion resistenterer Legehennen zeigen.

Die dritte Gruppe interessanter Faktoren ist die Gruppe der Chemokine. Diese Moleküle spielen eine zentrale Rolle in der Auswanderung von Immunzellen aus dem Blut in das infizierte Gewebe [149, 150]. Kultivierte Makrophagen bilden als Reaktion auf die Infektion eine ganze Reihe solcher Chemokine, wie die Microarray-Analysen gezeigt haben. Besonders auffällig war das Chemokin CCL20, welches eine 285-fache Hochregulation zeigte (siehe Tab. 9). Die Funktion dieser Chemokine im Huhn ist noch völlig unverstanden. Aus dem Säugersystem ist bekannt, dass CCL20 offenbar sowohl als inflammatorisches als auch als homöostatisches Chemokin wirkt. Eine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Gruppen ist offenbar nicht möglich.

Deutlich induziert waren auch solche Chemokine, die chemotaktisch auf die heterophilen Granulozyten der Hühner wirken, wie erst kürzlich gezeigt wurde [151]. Hierzu zählt das Chemokin IL8, welches im Microarray als signifikant reguliertes Gen identifiziert wurde und das mit dem IL8 verwandte Chemokin K60, welches in den qRT-PCR-Analysen signifikant hochreguliert war. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass heterophile Granulozyten nach einer Salmonelleninfektion rasch in die

Darmwand einwandern und dass sie in der Kontrolle der Infektion von Bedeutung sind [152, 153]. Zusammen unterstützen diese Befunde ein Konzept, nach dem die Infektion von residenten Makrophagen im Darmgewebe binnen weniger Stunden zur Sekretion einer Vielzahl von immunregulatorischen Molekülen führt, die rasch heterophile Granulozyten anlocken, nachfolgend aber auch die spezifische zelluläre Immunantwort (Th1-Reaktion) aktivieren.

### **6.3. *in vivo* Infektionsexperiment**

Den bisher generierten Daten aus dem *in vitro* Versuch sollten im Folgenden entsprechende Daten aus einem *in vivo* Infektionsversuch gegenüber gestellt werden. Um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde zum einen dasselbe Salmonellen Serovar und zum anderen dieselben Microarray basierte Analysemethoden benutzt. Zusätzlich wurden im gleichen Probenmaterial der Verlauf der Infektion durch bakteriologische Untersuchungen überprüft und durch die morphologischen Veränderungen anhand histologischer Untersuchungen dargestellt.

#### **6.3.1. Wahl der Probenentnahmezeitpunkte**

Um aussagekräftige Expressionsdaten zu erhalten, ist eine Probengewinnung unter standardisierten Bedingungen sowie eine sorgfältige Wahl der Probenentnahmezeitpunkte essentiell. In der geplanten Studie sollten insbesondere die frühen Reaktionen der angeborenen Immunabwehr untersucht werden. Frühere Untersuchungen bei Legehennen haben gezeigt, dass eine Besiedelung des Caecums bereits wenige Stunden nach einer Infektion stattfindet [154]. Basierend auf diesen und anderen publizierten Daten wurden die Zeitpunkte 5, 12, 24 und 48 Stunden nach oraler Infektion für diese Studie gewählt. Diese Auswahl der Probezeitpunkte stellte sich als für die Zielsetzung geeignet heraus, da sich ein Höhepunkt der Genregulation 12 Stunden nach der Infektion abzeichnete. Dies zeigte sich sowohl in den mittels „R“ erstellten *heatmaps* in Abb. 24 wie auch in den bakteriologischen Untersuchungen des Caecums in Abb. 20. Auch die weiteren Auswertungsschritte, die mittels SAM-Analyse und *Pathway Express* durchgeführt wurden, zeigten, dass zum Zeitpunkt 12 Stunden p.i. die Anzahl regulierter Gene (Tab. 11) und signifikant regulierter Signalwege (siehe Anhang 10.4), ein Maximum erreichten. Zusammengefasst zeigen diese Analysen, dass bereits 12 Stunden nach

Infektion eine Maximum in der Reaktion des caecalen Immunsystems beobachtet werden kann. Unerwartet ergaben die Auswertungen auch, dass zu den späteren Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) nur noch vergleichsweise wenig Gene reguliert waren.

### **6.3.2. Vergleich der Kolonisation und Immunreaktion in Caecum und Caecaltonsille**

Wie im Literaturteil bereits diskutiert, wurde wiederholt eine Größenzunahme der Caecaltonsillen als Reaktion auf die Infektion mit Salmonellen dokumentiert [45]. Diese Reaktion ist nicht mit einer Invasion der Bakterien in die Caecaltonsille assoziiert, die Ursache der Organvergrößerung ist aber bisher unklar. In der vorliegenden Arbeit ergab sich die Möglichkeit parallel zu den Gewebeproben aus dem Caecum auch Caecaltonsillen für die Genexpressionsanalysen zu gewinnen.

Insgesamt spiegeln die gewonnenen Daten wider, dass das Caecum eine deutlichere Reaktion des Immunsystems zeigte als die Caecaltonsillen. Sichtbar wird dies in der Gegenüberstellung der mittels „R“ erstellten *heatmaps* (Abb. 21) und der deutlich höheren Anzahl an regulierten Genen im Caecum wie in Tab. 11 aufgeführt. Entsprechend finden sich im Caecum auch eine höhere Anzahl an signifikanten Genclustern (Abb. 25) und Pathways (Tab. 12). Die Gegenüberstellung der Daten in Tab. 13 verdeutlicht diesen Unterschied.

Die histologischen Untersuchungen von Caecum und Caecaltonsillen an Giemsa gefärbten Präparaten zeigten zudem, dass ein Nachweis von Bakterien sehr wohl im Gewebe des Caecums gelang, in den Caecaltonsillen aber keine Bakterien gefunden wurden. Die Kolonisation der Tiere erfolgte demnach im Wesentlichen über die Mukosa des Caecums (siehe Abb. 30, Abb. 30). Dementsprechend zeigten sich auch deutliche Entzündungsreaktionen in den Gewebeproben des Caecums, während die morphologischen Veränderungen in den Caecaltonsillen eher geringgradig blieben. Diese Befunde spiegeln auch die Ergebnisse von Berndt et al. [1, 154] wider. Die Frage, ob die Caecaltonsillen als Eintrittspforte für Salmonellen eine Bedeutung haben, kann auf Grundlage dieser Befunde verneint werden.

Insgesamt zeigen die mit *S. enteritidis* infizierten Hühner eine vergleichsweise schwach ausgeprägte Immunreaktion, was sich sowohl in der Histologie, als auch bei den Expressionsdaten abzeichnete. Möglicherweise sind diese Beobachtung damit

zu erklären, dass in der vorliegenden Arbeit ein nicht-wirts-spezifisches Serovar verwendet wurde, welches bei Hühnern nur in den ersten Tagen nach dem Schlupf zu klinischen Symptomen führt. Die hier untersuchten Tiere waren ca. 8 Wochen alt und verfügten damit über ein voll entwickeltes Immunsystem [155], welches die Infektion gut kontrollieren konnte. Die bakteriologischen Untersuchungen zeigten aber, dass eine Infektion bei allen untersuchten Tieren erfolgte und dass maximale Bakterienzahlen 12 Stunden p.i. im Gewebe des Caecums gefunden wurden. Lediglich bei 4 Tieren gelang der Nachweis der Bakterien in der Milz. Offensichtlich gelang es dem Erreger nicht in jedem Tier die lokale Abwehr im Darm zu überwinden und eine systemische Infektion auszulösen. Zu erwarten wäre, dass nach einer Infektion mit den wirts-spezifischen Serovar *S. pullorum* oder *S. gallinarum* eine wesentlich deutlichere Immunreaktion auftreten würde, wie bereits publizierte Daten zeigen [151].

#### **6.4. Identifizierung von Kandidatengen**

Ziel dieser Arbeit war es Kandidatengene zu identifizieren, die in weiteren funktionellen Untersuchungen auf ihren Einfluss durch eine Salmonelleninfektion charakterisiert werden können. Synergistisch aus der Pathwayanalyse, *GeneOntology* und den Expressionsverläufen wurden Gengruppen ausgewählt, die im Bezug auf die differentielle Regulation während der untersuchten Zeitpunkte auffällig erschienen. Zu diesen auffälligen Genen zählen Vertreter der Zytokine, der Chemokine, der TNF-Superfamilie und der Toll-like-Rezeptoren.

Die Expressionstendenzen waren sowohl in der *in vitro* als auch in der *in vivo* Studie vergleichbar (Tab. 14). Es wurde beobachtet, dass sich die Expressionsmuster der mit Salmonellen infizierten primären Makrophagen in den Expressionsmustern der infizierten Hühner bzw. deren Caeca und Caecaltonsillen widerspiegelte. Es gibt lediglich bei den von uns in den Fokus gerückten Genen eine Ausnahme. Dabei handelt es sich um den hühnerspezifischen TNFSF-Vertreter TRAIL-like. Dieses Gen ist nach vier Stunden in den infizierten primären Makrophagen gegenüber der Kontrolle mit -2,8 vermindert exprimiert. Wohingegen TRAIL-like im Verlaufe der Kinetik des *in vivo* Versuches im Caecum vermehrt (zwischen 2,9 und 4,7) gegenüber der Kontrolle exprimiert ist. Ferner war dieses Gen in den Caecaltonsillen nicht signifikant reguliert.

Die Diskussion der Kandidatengene bezieht sich daher im Folgenden auf beide

Experimente und ergänzt die Besprechung der Ergebnisse der *in vitro* Versuche

#### **6.4.1. Regulation von Interleukinen während einer Salmonelleninfektion**

Die Arrayexperimente zeigten zum einen die erwarteten Genexpressionsmuster einer pro-inflammatorischen Reaktion [156, 157]. Hierzu zählen beispielsweise die erhöhten Expressionsniveaus von IL1 $\beta$  und IL6, ebenso, wie die im Folgenden besprochenen inflammatorischen Chemokine.

Die zuvor beschriebene Reaktion kultivierter Makrophagen zeigt sich auch in den Genexpressionsanalysen der Gewebeproben. So waren die Th1-Zytokine IL12p40 und IL18 deutlich hochreguliert. Beide Zytokine regulieren die Bildung von IFN- $\gamma$  durch T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen, wie *in vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen auch für das Huhn gezeigt haben [158]. Im Kontext der lokalen Salmonelleninfektion kann daher postuliert werden, dass diese Zytokine die lokale Bildung von IFN- $\gamma$  induzieren. Die eigenen Expressionsdaten bestätigen diese Annahme, da eine messbar vermehrte Expression von IFN- $\gamma$  in den untersuchten Proben nachweisbar war. IFN- $\gamma$  ist der wohl potenteste Aktivator bakterizider Mechanismen in Makrophagen. Ihm kommt damit, wie zuvor diskutiert (siehe 6.2), eine zentrale Rolle in der frühen Abwehr von Salmonelleninfektionen zu. Als Quelle der IFN- $\gamma$  Bildung kommen sehr wahrscheinlich eher die NK-Zellen als T-Zellen in Frage, da eine Invasion von T-Lymphozyten als Reaktion auf die Infektion erst zu wesentlich späteren Zeitpunkten beobachtet wird [159].

Interessanterweise fand sich sowohl im *in vitro* Versuch als auch in diesem *in vivo* Experiment eine deutliche Hochregulation von IL10. Eine der wichtigsten Funktionen dieses pleiotropen Zytokins ist seine immunregulatorische Aktivität [160]. Dies gilt insbesondere für die Kontrolle inflammatorischer Prozesse im Darm. IL-10 knockout Mäuse zeigen massive inflammatorische Darmerkrankungen und dienen als Morbus Crohn Modell. Im Kontext der hier untersuchten Infektion deutet die Induktion von IL10 darauf hin, dass zeitgleich mit den antibakteriellen Effektormechanismen auch immunregulatorische Prozesse aktiviert werden, die eine überschießende Entzündungsreaktion und gastro-intestinale Pathologie verhindern. Möglicherweise ist hierin auch die vergleichsweise geringgradige Entzündungsreaktion nach Infektionen mit den nicht-wirtsadaptierten Salmonellenserovaren begründet. Auch in diesem Fall müssen weiterführende *in vivo* Studien die tatsächliche funktionelle Relevanz klären. Als methodischer Ansatz bietet sich hier die Behandlung von Tieren

mit einem neutralisierenden monoklonalen Antikörper gegen IL10 während der Infektion an, wie dies exemplarisch für das Interferonsystem bereits gezeigt wurde [161].

#### **6.4.2. Regulation von Chemokinen während einer Salmonelleninfektion**

Des Weiteren wird durch das Expressionsmuster der Chemokine verdeutlicht, dass Entzündungszellen angezogen werden und in das Gewebe einwandern. CCL1, CCL4 (K203), CCL20, CXCL8 (IL8) und CXCL13 waren im Verlaufe der Infektion deutlich hochreguliert. Das Expressionsniveau von CCL20 ist dabei besonders auffällig und war in dieser Höhe nicht erwartet worden. CCL20 wurde 2009 beim Huhn kloniert und funktionell charakterisiert [162]. CCR6 wurde als dazugehöriger Rezeptor identifiziert. Die Autoren dieser Arbeit zeigten, dass CCL20 für die Rekrutierung von muren dendritischen Zellen in die mukosale Oberfläche verantwortlich ist. Ebenfalls demonstrierten sie, dass dieses Chemokin an der sehr frühen Immunantwort beteiligt ist, was durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden kann. CCL20 wird im Knochenmark, in sekundären lymphatischen Organen aber auch in mukosale Geweben wie der Lunge und dem Darm synthetisiert [162]. Die hohen Expressionswerte sowohl in den Makrophagenkulturen als auch in den Gewebeproben des *in vivo* Versuchs legen eine besondere funktionelle Bedeutung für diese Chemokin nahe.

#### **Hühnerspezifische Chemokine**

K60 ist ein hühnerspezifisches Struktur analog zum IL8 des Huhns und CXCL8 (IL8) des Säugers. Genauso ist K203 ein hühnerspezifisches Struktur analog zu CCL4 (MIP-1 $\beta$ , chCCLi2). Dies wurde im Jahre 2000 von Weining et al [163] postuliert und im Verlaufe der Zeit auch von andern Autoren bestätigt. In genannter Arbeit wurde gezeigt, dass die Chemokine K60 und K203 nach einer Stimulation mit LPS von Makrophagen vermehrt exprimiert werden. Dies spiegelte sich auch in vorliegender Arbeit wider. Hier wurden beide Gene nach der Infektion mit Salmonellen und nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  in den Makrophagen vermehrt exprimiert. Nach einer Stimulation durch LPS zeigte sich allerdings, wie in Abb. 9 dargestellt, eine verminderte Expression von IL8 und K60 in den Makrophagen. Eine kürzlich publizierte Arbeit [164] zeigte *in vitro* für beide Faktoren chemotaktische Aktivität gegenüber heterophilen Granulozyten des Huhns. Es ist daher naheliegend, dass

residente Makrophagen nach Aktivierung durch IFN- $\gamma$  beide Chemokine sezernieren und über diesen Weg die Immigration von heterophilen Granulozyten in die infizierte Mukosa und die Phagozytose der Bakterien induzieren.

#### **6.4.3. Regulation von TNF-Superfamilien Mitglieder während einer Salmonelleninfektion**

Vertreter der Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF), wie CD40, zeigen in der vorliegenden Studie eine vermehrte Expression. In der Literatur wurde gezeigt, dass CD40 nicht nur in der Entwicklung des Immunsystems eine Rolle spielt, sondern auch zur Rekrutierung von Zellen benötigt wird [165]. Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist TNFSF15, welches auch unter dem Synonym TL1a bekannt ist. Dies ist ein im Jahre 2005 von Aklba et al. kloniertes und charakterisiertes Zytokin [144]. In dieser Arbeit wird gezeigt, auf welche Stimuli in welchen Organen es synthetisiert wird und es wird das erste Mal postuliert, dass es ein möglicher funktioneller Ersatz für das aus dem Säuger bekannten TNF- $\alpha$  ist. Takahashi et al. griffen diese Hypothese im Jahre 2008 erneut auf und zogen aus ihren Untersuchungen die gleichen Rückschlüsse [166]. TNF- $\alpha$  im Säuger ist ein multifunktionales Zytokin des Immunsystems, welches sowohl an lokalen als auch an systemischen Entzündungsgeschehen beteiligt ist. TNF- $\alpha$  hat durch die Fähigkeit Apoptose auszulösen, sowie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine zu induzieren, einen wichtigen regulatorischen Einfluss auf viele Reaktionen des Organismus. Es wird beim Säuger vor allem durch Makrophagen gebildet. TNF- $\alpha$  ist bis zum heutigen Zeitpunkt beim Huhn bzw. dem Vogel nicht beschrieben worden. Die beobachtete Hochregulation von TL1a (TNFSF15) in dieser Arbeit unterstützt damit das oben diskutierte Postulat, dass TL1a (TNFSF15) ein möglicher funktioneller Ersatz für TNF- $\alpha$  sein könnte.

Ein weiteres Kandidatenglied ist TRAIL-like. Es ist bisher nur beim Huhn beschrieben und es ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Funktion dieses Zytokin im Huhn übernimmt. TRAIL (*tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand*) ist in vielen wichtigen biologischen Vorgänge der Zellproliferation und dem apoptotischen Zelltod involviert [167]. In einer Studie von Jørgensen et al [168] wird für das Gen TRAIL-like des Huhnes postuliert, dass es ähnliche Funktion übernimmt. TRAIL-like war in vorliegender Arbeit gegenüber der Kontrolle in der *in vivo* Studie erhöht und in der *in vitro* Studie vermindert exprimiert. Dieses Gen wurde im Huhn bisher nur in

einer Arbeit beschrieben, in der es nach einer Infektion mit *Infectious bursal disease virus* (IBDV) vermehrt reguliert war [168]. Zudem wurde eine verminderte Regulation von TRAIL-like als Reaktion auf eine bakterielle Infektion in der Regenbogenforelle [169] und im Graskarpfen [170] gezeigt. 2005 wurde TRAIL-like von Kaiser et al. der TNF-Superfamilie zugeordnet [91]. In Bezug auf seine biologische Funktion ist TRAIL-like bis heute ein schlecht untersuchtes Gen.

#### **6.4.4. Regulation von Toll-like-Rezeptoren während einer Salmonelleninfektion**

Insgesamt waren die TLRs in vorliegenden Genexpressionsstudien herunterreguliert. TLRs spielen eine zentrale Rolle in der Erkennung von Pathogenen durch das Immunsystem [171]. Sie sind daher konstitutiv exprimiert, um auf eindringende Mikroorganismen rasch reagieren zu können. Möglicherweise deutet die erniedrigte Expression der untersuchten TLRs darauf hin, dass zu späteren Zeitpunkten im Infektionsgeschehen die Pathogenerkennung gegenüber der Aktivierung von Effektormechanismen von untergeordneter Bedeutung ist. Zudem könnte die verminderte Regulation innerhalb weniger Stunden nach Infektion als weiterer Mechanismus zur Vermeidung überschießender Immunreaktionen verstanden werden.

#### **6.5. Ausblick**

K60 wird als IL8 Homolog, K203 als MIP-1 $\beta$  Homolog und CCL20 als MIP-3 $\alpha$  Homolog des Säugers postuliert. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass diese Gene nach einer Salmonelleninfektion rasch induziert werden. Sie dürften damit eine wichtige Rolle bei der frühen angeborenen Immunantwort spielen. Ebenso interessant ist die Frage nach der funktionellen Relevanz von TL1a, TRAIL-like und IFN- $\gamma$ . Funktionelle Untersuchungen dieser Faktoren erscheinen daher im Kontext der Salmonelleninfektion besonders interessant. Voraussetzung für die weitere Charakterisierung dieser Chemokine und der übrigen besprochenen Faktoren ist die Entwicklung geeigneter Werkzeuge. Hierzu zählen rekombinante Proteine, monoklonale Antikörper und funktionelle Inhibitoren, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* genutzt werden können. Überexpressionsstudien mit Zytokinen *in vivo* könnten, wie kürzlich für das Zytokin BAFF gezeigt [172], unter Verwendung des RCAS-Systems erfolgen.

Es hat sich im Verlaufe vorliegender Arbeit gezeigt, dass es sich bei dem verwendeten Salmonellen Serovar um ein für das Huhn schwach pathogenes Bakterium handelt. Stückweise war es das Ziel, solch ein Serovar zu nutzen, da im Feld genau dies die Problematik darstellt. Hühner infizieren sich mit für sie schwach pathogenen Erregern, erkranken daher in der Regel nicht und sind Wirt und inapparenter Ausscheider. Bei einem pathogenerem Erreger wäre zu erwarten, dass die Immunreaktion wesentlich deutlicher ausfällt und dass insbesondere die Caecaltonsillen eine stärkere Immunreaktion zeigen. Somit würden sich Unterschiede zwischen Caecum und Caecaltonsille klarer herauskristallisieren und hieraus Hinweise auf die Funktion der Caecaltonsillen in der Salmonellenabwehr ergeben.

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt bei der Untersuchung der angeborenen Immunantwort, wäre die Erforschung der Reaktion der Epithelzellen. Die Epithelzelle ist die erste Zielzelle für die Salmonellen. Sie stellen nicht nur eine zu überwindende mechanische Barriere dar, sondern neuere Arbeiten zeigen vielmehr, dass Signale von infizierten Epithelzellen die ersten immunologischen Reaktionen induzieren [173]. Voraussetzung für entsprechende Studien wäre die Etablierung von Kultursystemen primärer Epithelzellen. In diesem Zusammenhang bestünde auch die Möglichkeit, auf die Erforschung der Invasionsmechanismen beim Huhn einzugehen. Wie bereits unter 2.2.6 erwähnt gibt es beim Huhn keine M-Zellen, welche beim Säuger die Eintrittspforte für die Salmonellen darstellen.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel vorliegender Arbeit war es, die frühe angeborene Immunantwort des Haushuhns auf eine Infektion mit *Salmonella enteritidis* zu untersuchen. Infektionen mit *S. enteritidis* sind die häufigste Ursache für Salmonelleninfektionen des Menschen. Die Infektion erfolgt dabei durch von Hühnern stammende Lebensmittel wie Eier, Eiprodukte oder Hühnerfleisch. Der Erreger zählt zu den nicht wirts-adaptierten Serovaren und führt nur bei Küken in der ersten Lebenswoche zu klinischen Symptomen. Adulte Tiere erkranken nicht, können aber als inapparent infizierte Überträger fungieren.

Die Reaktion des Immunsystems auf eine *S. enteritidis* Infektion wurde sowohl an Makrophagenkulturen als auch nach oraler Infektion adulter Hühner an Gewebeproben untersucht. Als Analysemethode wurden Genexpressionsstudien mit Hilfe des 4x44K Hühner Microarrays der Firma Agilent durchgeführt.

Für die *in vitro* Studien wurden primäre Hühnermakrophagen-Kulturen über 4 Stunden mit *S. enteritidis* mit einer MOI von 10 infiziert. Die Genexpressionsanalyse zeigte eine deutliche inflammatorische Reaktion der Zellen. Diese umfasste die Expression von Genen aus der Gruppe der Interleukine (IL1 $\beta$ , IL6, IL12p40, IL18), der Chemokine (CCL1, CCL4 (K203), CCL20, CXCL8 (IL8), CXCL13), der Tumor Nekrose Faktor Superfamilie (TNFSF) und der Toll-like-Rezeptoren (TLR). Besonders ausgeprägt waren die Expressionsänderungen von K60 (IL8 Homolog), K203 (chCCLi2, MIP-1 $\beta$ ) und TL1a (TNFSF15). Darüber hinaus exprimierten infizierte Makrophagen eine Gruppe von typischen Th1-Zytokinen, darunter IL12p40, IL18 und IFN- $\gamma$ . Des Weiteren war die hochgradige Induktion des Chemokins CCL20 auffällig.

Der Fokus bei weiteren Analysen wurde daher auf die Gruppen der Zytokine, Chemokine sowie Mitglieder der TNF-Familie gelegt. Die Expressionsmuster des *in vitro* Experimentes entsprachen dem des *in vivo* Versuches.

Das *in vivo* Experiment wurden mit acht Wochen alten Tieren durchgeführt, die zu diesem Zeitpunkt ein voll entwickeltes Immunsystem aufwiesen. Die Infektion erfolgte in den Kropf mit einer Dosis von  $1 \times 10^7$  Salmonellen. Gewebeproben für bakteriologische, histologische und Genexpressionsanalysen wurden 5, 12, 24 und

48 Stunden nach der Infektion aus dem Caecum und der Caecaltonsille gewonnen. Bereits 5 Stunden nach der Infektion konnten bei der Mehrzahl der Tiere Bakterien aus den Caecumproben isoliert werden. Die Bakterienlast erreichte zum 12 Stunden-Wert das Maximum. Die Infektion des Caecumgewebes konnte auch in der Histologie durch den Nachweis von Bakterien und das Auftreten von Entzündungszellen bestätigt werden. Dagegen waren die Caecaltonsillen histologisch unauffällig, ein Nachweis von Bakterien gelang nicht. Dies spiegelte sich in den Genexpressionsanalysen wieder. Die Zahl differentiell regulierter Gene in den Caecaltonsillen war zu allen Zeitpunkten vergleichsmäßig gering, wohingegen in den Caecumproben insgesamt weit mehr Gene differentiell reguliert waren (siehe Tab. 11). Das Maximum der Reaktion wurde auch hier 12 Stunden nach der Infektion beobachtet. Des Weiteren konnten zu diesem Zeitpunkt 41 signifikant regulierte Signalwege identifiziert werden.

Insgesamt ergab sich in den *in vitro* und den *in vivo* Studien das Bild einer initialen inflammatorischen sowie einer durch typische Th1-Zytokine geprägten Reaktion. Die nähere funktionelle Charakterisierung genannter Kandidatengene, vor allem CCL20, CXCL8, K60, K203 und TL1a, sollten gezielt in Untersuchungen der angeborenen Immunantwort einbezogen werden. Dies könnte dazu beitragen, die erfolgreichen Abwehrmechanismen des Huhns gegen *S. enteritidis* in Zukunft besser zu verstehen und damit möglicherweise die Anzahl der Salmonellose-Fälle des Menschen einzudämmen.

## 8. SUMMARY

### **Gene expression analysis of early innate immune response of chickens induced via an infection with *Salmonella enteritidis* through microarray technology.**

Salmonella infections in humans arise through chicken-based food such as eggs, egg-products, or chicken meat. The most common cause for these infections is *Salmonella enteritidis*, and the aim of this study has been to analyze the early innate immune response of chickens induced via this pathogen. Note that *S. enteritidis* is a host-adapted serovar, which only causes clinical findings in young chickens during their first week of life; adult chickens do not get sick, but may nevertheless act as inapparent infected carriers.

We studied the reaction from the chicken immune system on *S. enteritidis*, using macrophage cultures as well as tissue samples of infected adult chickens. The gene expression studies were carried out by an “Agilent 4x44K chicken microarray” method.

In our *in vitro* studies, we infected primary macrophages with *S. enteritidis* for 4 hours, using a MOI of 10. The gene expression studies resulted in the inductions of interleukins (IL1 $\beta$ , IL6, IL12p40, IL18), of chemokines (CCL1, CCL4 (K203), CCL20, CXCL8 (IL8), CXCL13), of some members of the tumor-necrose-factor-superfamily (TNFSF), and of some toll-like receptors (TLR). Hence the cells have an inflammatory reaction. Particularly prominent were the expression changes of K60 (IL8 homolog), K203 (chCCLi2, MIP-1 $\beta$ ), CCL20, and TL1a (TNFSF15). Finally, infected macrophages expressed a group of typical Th1-cytokines, including IL12p40, IL18, and IFN- $\gamma$ .

In further analysis of our data, we focused on cytokines, chemokines, and members of the TNF-superfamily. In the ceca we found similar expression patterns within these three groups as was previously found for them in the macrophages study.

In our *in vivo* studies, we infected chickens that were 8 weeks old and already had a well developed immune system. They were infected in the crop using a dose of  $10^7$  salmonella. At 5, 12, 24, and 48 hours of infection, we sampled the ceca and cecal tonsils for the bacterial, histological, and gene expression analyses. Already at 5

hours p.i., we were (for all but one animal) able to isolate bacteria from the cecal-tissue. The bacterial load reached its maximum at 12 hours p.i.. The infection of the cecal-tissues was confirmed in the histology, both by the detection of bacteria and by the occurrence of inflammatory cells. However, using histology, we could not detect any bacteria in cecal tonsils, which suggests that no infection was present in these organs. This suggestion was confirmed in gene expression analyses. When comparing the gene expression studies of cecal tonsils and ceca, the former showed lower counts of differential regulated genes (Tab. 11). Both their count maxima occurred at 12 hour p.i though. Moreover, at this time 41 significant regulated pathways had been identified..

In summary, the *in vitro* and the *in vivo* experiment both resulted in an initial inflammatory reaction, as well as in a typical Th1-cytokines reaction. To investigate functional characterisation of named candidate genes, in the first instance CCL20, CXCL8, K60, K203, and TL1a, future analyses of the innate immune response should involve them. This may contribute to a better understanding of the successful defense mechanisms against *S. enteritidis* in chicken, which may help to contain the amount of salmonellosis in humans.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Berndt, A., et al., *Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5993-6007.
2. Gantois, I., et al., *Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(4): p. 718-38.
3. <http://www.efsa.europa.eu/de>.
4. Wallis, J.W., et al., *A physical map of the chicken genome*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 761-4.
5. Vaughn, L.E., et al., *Crop immune response post-Salmonella enteritidis challenge in eight commercial egg-layer strains and specific-pathogen-free White Leghorn chickens*. Avian Dis, 2008. **52**(1): p. 79-87.
6. Kapperud, G., et al., *Outbreak of Salmonella typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(12): p. 2597-601.
7. Clothier, K.A., J.M. Kinyon, and T.S. Frana, *Comparison of Salmonella serovar isolation and antimicrobial resistance patterns from porcine samples between 2003 and 2008*. J Vet Diagn Invest. **22**(4): p. 578-82.
8. *Multistate outbreaks of Salmonella infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants--United States, 2005-2006*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2007. **56**(35): p. 909-11.
9. Nygard, K., et al., *Outbreak of Salmonella Thompson infections linked to imported rucola lettuce*. Foodborne Pathog Dis, 2008. **5**(2): p. 165-73.
10. Pezzoli, L., et al., *Packed with Salmonella--investigation of an international outbreak of Salmonella Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007*. Foodborne Pathog Dis, 2008. **5**(5): p. 661-8.
11. Pote, J., et al., *Origin and spatial-temporal distribution of faecal bacteria in a bay of Lake Geneva, Switzerland*. Environ Monit Assess, 2009. **154**(1-4): p. 337-48.
12. Jain, S., et al., *Multistate outbreak of Salmonella Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice--United States, 2005*. Clin Infect Dis, 2009. **48**(8): p. 1065-71.
13. Van Duynhoven, Y.T., et al., *A prolonged outbreak of Salmonella Typhimurium*

- infection related to an uncommon vehicle: hard cheese made from raw milk.* Epidemiol Infect, 2009. **137**(11): p. 1548-57.
14. Cahill, S.M., et al., *Powdered infant formula as a source of Salmonella infection in infants.* Clin Infect Dis, 2008. **46**(2): p. 268-73.
  15. <http://www.bfr.bund.de/>.
  16. <http://www.pei.de/>.
  17. Garvis, S.G., C.R. Beuzon, and D.W. Holden, *A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and Salmonella-containing vacuoles in macrophages.* Cell Microbiol, 2001. **3**(11): p. 731-44.
  18. Cason, J.A., N.A. Cox, and J.S. Bailey, *Transmission of Salmonella typhimurium during hatching of broiler chicks.* Avian Dis, 1994. **38**(3): p. 583-8.
  19. Fanelli, M.J., et al., *Localization of salmonellae within the intestinal tract of chickens.* Avian Dis, 1971. **15**(2): p. 366-75.
  20. Davies, R.H. and M. Breslin, *Persistence of Salmonella enteritidis phage type 4 in the environment and arthropod vectors on an empty free-range chicken farm.* Environ Microbiol, 2003. **5**(2): p. 79-84.
  21. Poppe, C., et al., *The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella sp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks.* Epidemiol Infect, 1991. **107**(1): p. 201-11.
  22. Renwick, S.A., et al., *Epidemiological associations between characteristics of registered broiler chicken flocks in Canada and the Salmonella culture status of floor litter and drinking water.* Can Vet J, 1992. **33**(7): p. 449-58.
  23. Holt, P.S., *Horizontal transmission of Salmonella enteritidis in molted and unmolted laying chickens.* Avian Dis, 1995. **39**(2): p. 239-49.
  24. Nakamura, M., et al., *Horizontal transmission of Salmonella enteritidis and effect of stress on shedding in laying hens.* Avian Dis, 1994. **38**(2): p. 282-8.
  25. Kinde, H., et al., *Salmonella enteritidis, phase type 4 infection in a commercial layer flock in southern California: bacteriologic and epidemiologic findings.* Avian Dis, 1996. **40**(3): p. 665-71.
  26. Kinde, H., et al., *Sewage effluent: likely source of Salmonella enteritidis, phage type 4 infection in a commercial chicken layer flock in southern California.* Avian Dis, 1996. **40**(3): p. 672-6.
  27. Timoney, J.F., et al., *Egg transmission after infection of hens with Salmonella*

- enteritidis* phage type 4. Vet Rec, 1989. **125**(24): p. 600-1.
28. Keller, L.H., et al., *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2443-9.
  29. Hincke, M.T., et al., *Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix*. Matrix Biol, 2000. **19**(5): p. 443-53.
  30. Gautron, J., et al., *Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer*. Connect Tissue Res, 2001. **42**(4): p. 255-67.
  31. Gautron, J., et al., *Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5273-86.
  32. Miyamoto, T., et al., *Salmonella penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration*. J Food Prot, 1998. **61**(3): p. 350-3.
  33. Humphrey, T.J., et al., *Numbers of Salmonella enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs*. Epidemiol Infect, 1991. **106**(3): p. 489-96.
  34. Methner, U., S. al-Shabibi, and H. Meyer, *Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with Salmonella enteritidis strains*. Zentralbl Veterinarmed B, 1995. **42**(8): p. 459-69.
  35. Gast, R.K. and P.S. Holt, *Deposition of phage type 4 and 13a Salmonella enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens*. Avian Dis, 2000. **44**(3): p. 706-10.
  36. Blaser, M.J. and L.S. Newman, *A review of human salmonellosis: I. Infective dose*. Rev Infect Dis, 1982. **4**(6): p. 1096-106.
  37. Formal, S.B., et al., *Experimental Shigella infections: characteristics of a fatal infection produced in guinea pigs*. J Bacteriol, 1958. **75**(5): p. 604-10.
  38. Hentges, D.J. and R. Freter, *In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against Shigella flexneri. I. Correlation between various tests*. J Infect Dis, 1962. **110**: p. 30-7.
  39. Sadler, W.W., J.R. Brownell, and M.J. Fanelli, *Influence of age and inoculum level on shed pattern of Salmonella typhimurium in chickens*. Avian Dis, 1969. **13**(4): p. 793-803.
  40. Gast, R.K. and C.W. Beard, *Production of Salmonella enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens*. Avian Dis, 1990. **34**(2): p. 438-46.

41. Hopper, S.A. and S. Mawer, *Salmonella enteritidis* in a commercial layer flock. *Vet Rec*, 1988. **123**(13): p. 351.
42. Befus, A.D., et al., *Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches*. *J Immunol*, 1980. **125**(6): p. 2626-32.
43. Burns, R.B. and M.H. Maxwell, *Ultrastructure of Peyer's patches in the domestic fowl and turkey*. *J Anat*, 1986. **147**: p. 235-43.
44. Rescigno, M., et al., *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(4): p. 361-7.
45. Chadfield, M.S., et al., *Comparison of intestinal invasion and macrophage response of Salmonella Gallinarum and other host-adapted Salmonella enterica serovars in the avian host*. *Vet Microbiol*, 2003. **92**(1-2): p. 49-64.
46. Aabo, S., et al., *Quantitative comparison of intestinal invasion of zoonotic serotypes of Salmonella enterica in poultry*. *Avian Pathol*, 2002. **31**(1): p. 41-7.
47. Foster, T.J., *Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion*. *Vet Dermatol*, 2009. **20**(5-6): p. 456-70.
48. Van Immerseel, F., et al., *The effect of vaccination with a Salmonella enteritidis aroA mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens*. *Vaccine*, 2002. **20**(23-24): p. 3034-41.
49. Qureshi, M.A., C.L. Heggen, and I. Hussain, *Avian macrophage: effector functions in health and disease*. *Dev Comp Immunol*, 2000. **24**(2-3): p. 103-19.
50. Inman, R.D., *Innate immunity of spondyloarthritis: the role of toll-like receptors*. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **649**: p. 300-9.
51. Peri, F., et al., *Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules*. *Biochem Soc Trans*. **38**(5): p. 1390-5.
52. Schumann, R.R., *Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review*. *Res Immunol*, 1992. **143**(1): p. 11-5.
53. Vicente-Suarez, I., et al., *TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses*. *Immunol Lett*, 2009. **125**(2): p. 114-8.
54. Gewirtz, A.T., et al., *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1882-5.

55. Gewirtz, A.T., et al., *Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 99-109.
56. Ramasamy, K.T., et al., *Differential expression of Toll-like receptor mRNA in White Leghorn and indigenous chicken of India*. Vet Res Commun. **34**(7): p. 633-9.
57. Okamura, M., et al., *Differential responses of macrophages to Salmonella enterica serovars Enteritidis and Typhimurium*. Vet Immunol Immunopathol, 2005. **107**(3-4): p. 327-35.
58. Wick, M.J., *Living in the danger zone: innate immunity to Salmonella*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(1): p. 51-7.
59. Galan, J.E., *Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells*. Mol Microbiol, 1996. **20**(2): p. 263-71.
60. Galan, J.E. and R. Curtiss, 3rd, *Cloning and molecular characterization of genes whose products allow Salmonella typhimurium to penetrate tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6383-7.
61. Ochman, H., et al., *Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7800-4.
62. Shea, J.E., et al., *Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2593-7.
63. Fields, P.I., et al., *Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): p. 5189-93.
64. Kramer, J., et al., *Entry and survival of Salmonella enterica serotype Enteritidis PT4 in chicken macrophage and lymphocyte cell lines*. Vet Microbiol, 2003. **91**(2-3): p. 147-55.
65. Main-Hester, K.L., et al., *Coordinate regulation of Salmonella pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2008. **76**(3): p. 1024-35.
66. Yashroy, R.C., *Mechanism of infection of a human isolate Salmonella (3,10:r:-) in chicken ileum: ultrastructural study*. Indian J Med Res, 2007. **126**(6): p. 558-66.
67. Li, S., et al., *Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during Salmonella enterica serovar Enteritidis invasion into and*

- survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages*. Avian Pathol, 2009. **38**(2): p. 97-106.
68. Kogut, M.H., et al., *Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to Salmonella enteritidis infections*. Microb Pathog, 1994. **16**(2): p. 141-51.
69. Portnoy, D.A., *Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen*. Curr Opin Immunol, 1992. **4**(1): p. 20-4.
70. McGhee, J.R., et al., *The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development*. Vaccine, 1992. **10**(2): p. 75-88.
71. Johnson, E.H., S. Hietala, and B.P. Smith, *Chemiluminescence of bovine alveolar macrophages as an indicator of developing immunity in calves vaccinated with aromatic-dependent Salmonella*. Vet Microbiol, 1985. **10**(5): p. 451-64.
72. Lillehoj, H.S., *Avian gut-associated immune system: implication in coccidial vaccine development*. Poult Sci, 1993. **72**(7): p. 1306-11.
73. Schat, K.A., *Cell-mediated immune effector functions in chickens*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 1077-81.
74. Mastroeni, P., B. Villarreal-Ramos, and C.E. Hormaeche, *Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells*. Infect Immun, 1993. **61**(9): p. 3981-4.
75. Cantor, H. and E.A. Boyse, *Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen*. J Exp Med, 1975. **141**(6): p. 1376-89.
76. Dialynas, D.P., et al., *Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity*. Immunol Rev, 1983. **74**: p. 29-56.
77. Swain, S.L., *T cell subsets and the recognition of MHC class*. Immunol Rev, 1983. **74**: p. 129-42.
78. Chen, C.L., R.P. Bucy, and M.D. Cooper, *T cell differentiation in birds*. Semin Immunol, 1990. **2**(1): p. 79-86.
79. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.

80. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.* J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
81. Hong, Y.H., et al., *Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following Eimeria maxima infection of chickens.* Vet Immunol Immunopathol, 2006. **114**(3-4): p. 259-72.
82. Okamura, M., et al., *Cell-mediated immune responses to a killed Salmonella enteritidis vaccine: lymphocyte proliferation, T-cell changes and interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-2, and IFN-gamma production.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2004. **27**(4): p. 255-72.
83. Hassan, J.O. and R. Curtiss, 3rd, *Virulent Salmonella typhimurium-induced lymphocyte depletion and immunosuppression in chickens.* Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 2027-36.
84. Beal, R.K., et al., *Clearance of enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function.* Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1442-4.
85. Kaiser, P., et al., *Integrated immunogenomics in the chicken: deciphering the immune response to identify disease resistance genes.* Dev Biol (Basel), 2008. **132**: p. 57-66.
86. Cohen, S., P.E. Bigazzi, and T. Yoshida, *Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production.* Cell Immunol, 1974. **12**(1): p. 150-9.
87. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
88. Avery, S., et al., *Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34.* J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(10): p. 600-10.
89. Cherwinski, H.M., et al., *Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies.* J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1229-44.
90. Mosmann, T.R. and S. Sad, *The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.* Immunol Today, 1996. **17**(3): p. 138-46.
91. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines.* J

- Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
92. Withanage, G.S., et al., *Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with Salmonella enterica serovar typhimurium*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2152-9.
  93. Salazar-Gonzalez, R.M. and S.J. McSorley, *Salmonella flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system*. Immunol Lett, 2005. **101**(2): p. 117-22.
  94. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. Dev Biol, 1976. **53**(2): p. 250-64.
  95. Davison, T.F., *The immunologists' debt to the chicken*. Br Poult Sci, 2003. **44**(1): p. 6-21.
  96. Kaufman, J., H. Volk, and H.J. Wallny, *A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism*. Immunol Rev, 1995. **143**: p. 63-88.
  97. Cooper, M.D., et al., *Avian T cell ontogeny*. Adv Immunol, 1991. **50**: p. 87-117.
  98. Chan, M.M., et al., *Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens*. J Immunol, 1988. **140**(7): p. 2133-8.
  99. Barrett, J.C. and E.S. Kawasaki, *Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression*. Drug Discov Today, 2003. **8**(3): p. 134-41.
  100. Hardiman, G., *Microarray platforms--comparisons and contrasts*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(5): p. 487-502.
  101. Cheng, H.H. and L.B. Crittenden, *Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(4): p. 539-46.
  102. <http://www.chick.manchester.ac.uk/>.
  103. Wong, G.K., et al., *A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 717-22.
  104. *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
  105. Jacobsson, L., et al., *Many QTLs with minor additive effects are associated with a large difference in growth between two selection lines in chickens*. Genet Res, 2005. **86**(2): p. 115-25.

106. Park, H.B., et al., *QTL analysis of body composition and metabolic traits in an intercross between chicken lines divergently selected for growth*. *Physiol Genomics*, 2006. **25**(2): p. 216-23.
107. Hughes, T.R., et al., *Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer*. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(4): p. 342-7.
108. Religio, A., et al., *Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(11): p. e51.
109. Shippy, R., et al., *Performance evaluation of commercial short-oligonucleotide microarrays and the impact of noise in making cross-platform correlations*. *BMC Genomics*, 2004. **5**(1): p. 61.
110. <http://www.genomics.agilent.com/>.
111. Wang, Y., et al., *Isolation, culture and biological characteristics of primordial germ cells from Beijing fatty chicken*. *J Reprod Dev*. **56**(3): p. 303-8.
112. Kong, L.L., et al., *Development of SYBR green I based one-step real-time RT-PCR assay for the detection and differentiation of very virulent and classical strains of infectious bursal disease virus*. *J Virol Methods*, 2009. **161**(2): p. 271-9.
113. Ong, W.T., et al., *Development of a multiplex real-time PCR assay using SYBR Green 1 chemistry for simultaneous detection and subtyping of H9N2 influenza virus type A*. *J Virol Methods*, 2007. **144**(1-2): p. 57-64.
114. Wang, L. and A. Mustapha, *EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable Salmonella in chicken and eggs*. *J Food Sci*. **75**(3): p. M134-9.
115. Schnider, A., et al., *Comparison of real-time PCR assays for detection, quantification, and differentiation of campylobacter jejuni and campylobacter coli in broiler neck skin samples*. *J Food Prot*. **73**(6): p. 1057-63.
116. Sprygin, A.V., et al., *Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in clinical samples from commercial and backyard poultry*. *Avian Pathol*. **39**(2): p. 99-109.
117. Meir, R., et al., *Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation*. *J Virol Methods*. **163**(2): p. 190-4.
118. <http://www.home.agilent.com>.
119. <http://www.appliedbiosystems.com>.

120. <http://www.ensembl.org/index.html>.
121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>.
122. <http://www.genescan.de>.
123. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>.
124. <http://david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>.
125. Al-Shahrour, F., et al., *BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Web Server issue): p. W472-6.
126. Reimand, J., et al., *g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Web Server issue): p. W193-200.
127. Tsolis, R.M., et al., *Of mice, calves, and men. Comparison of the mouse typhoid model with other Salmonella infections*. *Adv Exp Med Biol*, 1999. **473**: p. 261-74.
128. Song, J., et al., *A mouse model for the human pathogen Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe*. **8**(4): p. 369-76.
129. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio, *Early separation of B and T lymphocyte precursors in chick embryo*. *J Exp Med*, 1991. **174**(2): p. 397-406.
130. Langman, R.E. and M. Cohn, *A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system: the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit*. *Res Immunol*, 1993. **144**(6-7): p. 422-46.
131. Zhang, S., et al., *Transcriptional response of chicken macrophages to Salmonella enterica serovar enteritidis infection*. *Dev Biol (Basel)*, 2008. **132**: p. 141-51.
132. He, H., et al., *Involvement of phosphatidylinositol-phospholipase C in immune response to Salmonella lipopolysaccharide in chicken macrophage cells (HD11)*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(12): p. 1780-7.
133. Xie, H., et al., *CpG-induced immunomodulation and intracellular bacterial killing in a chicken macrophage cell line*. *Dev Comp Immunol*, 2003. **27**(9): p. 823-34.
134. Beug, H., et al., *Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation*. *Cell*, 1979. **18**(2): p. 375-90.

135. Chadfield, M. and J. Olsen, *Determination of the oxidative burst chemiluminescent response of avian and murine-derived macrophages versus corresponding cell lines in relation to stimulation with Salmonella serotypes*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001. **80**(3-4): p. 289-308.
136. Forest, C.G., et al., *Intracellular survival of Salmonella enterica serovar Typhi in human macrophages is SPI-2 independent*. *Microbiology*.
137. Silva-Herzog, E. and C.S. Detweiler, *Salmonella enterica replication in hemophagocytic macrophages requires two type three secretion systems*. *Infect Immun*. **78**(8): p. 3369-77.
138. Eswarappa, S.M., et al., *Division of the Salmonella-containing vacuole and depletion of acidic lysosomes in Salmonella-infected host cells are novel strategies of Salmonella enterica to avoid lysosomes*. *Infect Immun*. **78**(1): p. 68-79.
139. Ibarra, J.A. and O. Steele-Mortimer, *Salmonella--the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival*. *Cell Microbiol*, 2009. **11**(11): p. 1579-86.
140. Chackerian, A.A., T.V. Perera, and S.M. Behar, *Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2001. **69**(4): p. 2666-74.
141. Durbin, J.E., et al., *Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity*. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 4220-8.
142. Bergeron, M. and M. Olivier, *Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 6271-80.
143. Totemeyer, S., et al., *IFN-gamma enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2*. *J Immunol*, 2006. **176**(8): p. 4804-10.
144. Takimoto, T., et al., *Molecular cloning and functional characterizations of chicken TL1A*. *Dev Comp Immunol*, 2005. **29**(10): p. 895-905.
145. Ehlers, S., *Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii37-42.
146. Awasthi, G., et al., *Genetic characterization and evolutionary inference of TNF-alpha through computational analysis*. *Braz J Infect Dis*, 2008. **12**(5): p. 374-9.
147. Tessema, T.S., et al., *Dynamics of gut mucosal and systemic Th1/Th2 cytokine responses in interferon-gamma and interleukin-12p40 knock out mice during*

- primary and challenge Cryptosporidium parvum* infection. *Immunobiology*, 2009. **214**(6): p. 454-66.
148. Sreter, T., I. Varga, and L. Bekesi, *Effects of bursectomy and thymectomy on the development of resistance to Cryptosporidium baileyi in chickens*. *Parasitol Res*, 1996. **82**(2): p. 174-7.
149. Mohammed, J., et al., *Chemokine and cytokine gene expression profiles in chickens inoculated with Mycoplasma gallisepticum strains Rlow or GT5*. *Vaccine*, 2007. **25**(51): p. 8611-21.
150. De Klerck, B., et al., *Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(6): p. R1208-20.
151. Chappell, L., et al., *The immunobiology of avian systemic salmonellosis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009. **128**(1-3): p. 53-9.
152. van Dijk, A., et al., *Chicken heterophils are recruited to the site of Salmonella infection and release antibacterial mature Cathelicidin-2 upon stimulation with LPS*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(7): p. 1517-26.
153. Kogut, M.H., *Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by Salmonella enteritidis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2002. **25**(3): p. 159-72.
154. Berndt, A., et al., *Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon Salmonella infection--relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes*. *Vet Microbiol*, 2009. **133**(1-2): p. 123-37.
155. *Avian Immunology*. 2008.
156. Beeckman, D.S., et al., *Differential cytokine expression in Chlamydomphila psittaci genotype A-, B- or D-infected chicken macrophages after exposure to Escherichia coli O2:K1 LPS*. *Dev Comp Immunol*. **34**(8): p. 812-20.
157. Tsai, H.J., et al., *A time-course study of gene responses of chicken granulosa cells to Salmonella Enteritidis infection*. *Vet Microbiol*. **144**(3-4): p. 325-33.
158. Gobel, T.W., et al., *IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species*. *J Immunol*, 2003. **171**(4): p. 1809-15.
159. Berndt, A., J. Pieper, and U. Methner, *Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens*. *Infect Immun*, 2006. **74**(7): p. 3967-78.

160. Kim, D.K., et al., *Differential immune-related gene expression in two genetically disparate chicken lines during infection by Eimeria maxima*. Dev Biol (Basel), 2008. **132**: p. 131-40.
161. Plachy, J., et al., *Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens*. Virology, 1999. **256**(1): p. 85-91.
162. Munoz, I., et al., *Cloning, expression and functional characterization of chicken CCR6 and its ligand CCL20*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 551-9.
163. Sick, C., et al., *Novel chicken CXC and CC chemokines*. Cytokine, 2000. **12**(3): p. 181-6.
164. Poh, T.Y., et al., *Re-evaluation of chicken CXCR1 determines the true gene structure: CXCLi1 (K60) and CXCLi2 (CAF/interleukin-8) are ligands for this receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16408-15.
165. Arciniegas, E., et al., *CD40 and CD40L expression in the chicken embryo aorta: possible role in the endothelial-mesenchymal transdifferentiation process*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003. **274**(2): p. 942-51.
166. Takimoto, T., et al., *Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 8327-32.
167. Abdalla, S.A., et al., *Molecular cloning and characterization of chicken tumor necrosis factor (TNF)-superfamily ligands, CD30L and TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)*. J Vet Med Sci, 2004. **66**(6): p. 643-50.
168. Li, Y.P., et al., *Transcriptional profiles of chicken embryo cell cultures following infection with infectious bursal disease virus*. Arch Virol, 2007. **152**(3): p. 463-78.
169. Glenney, G.W. and G.D. Wiens, *Early diversification of the TNF superfamily in teleosts: genomic characterization and expression analysis*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7955-73.
170. Chang, M.X., et al., *Characterization and expression analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in grass carp Ctenopharyngodon idella*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **110**(1-2): p. 51-63.
171. Jenkins, K.A., A.G. Bean, and J.W. Lowenthal, *Avian genomics and the innate immune response to viruses*. Cytogenet Genome Res, 2007. **117**(1-4): p. 207-12.
172. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Mol Immunol. **47**(7-8): p. 1619-28.

- 
173. Asquith, M.J., et al., *Pathogenic and protective roles of MyD88 in leukocytes and epithelial cells in mouse models of inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*. **139**(2): p. 519-29, 529 e1-2.

## 10. ANHANG

### 10.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden, integriert.

1	Agilent, Böblingen
2	Applichem, Darmstadt
3	Becman Coulter, Krefeld
4	Biontex, München
5	Becton Dickinson, Heidelberg
6	Biochrom, Berlin
7	Dianova, Hamburg
8	Fermentas, St. Leon-Rot
9	GE Healthcare, München
10	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
11	Invitrogen, Karlsruhe
12	Linaris, Wertheim-Bettingen
13	Medite, Burgdorf
14	Merck, Darmstadt
15	Promega, Mannheim
16	Qiagen, Düsseldorf
17	peqlab, Erlangen
18	Roth, Karlsruhe
19	Sigma, Deisenhofen

## 10.2. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Homogenisator	peqlab, precellys 24	Peqlab, Erlangen
Absaugpumpe	HLC, AF204	Heaep Labor Consult, Bovenden
Array Scanner	G2505C Microarray Scanner System	Agilent, Böblingen
Bakterienbrutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Bakterienschüttler	C24 incubator shaker	New Brunswick Scietific, Nürtingen
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer Software: Bioanalyzer 2100 Expert	Agilent, Böblingen
Gel-Dokumentation	Image Quant 300 Software: Image Quant Capture 300	GE Healthcare, Garching
Gelkammer	Sub Cell GT	BioRad München
Hybridisierungssofen	ICES/NMB-001	Agilent, Böblingen
Mikroskop	Leica DMIL	Leica, Bensheim
Mikroskop	Leica 202081	Leica, Bensheim
Mikroskop	Zeiss Axioskop	Zeiss, Göttingen
Mikroskop-Kamera	DFC340FX	Leica, Bensheim
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc5 Software: Axiovision 4.8	Zeiss, Göttingen
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
Plattenschüttler	WT17	Biometra, Göttingen
Power-Supply	Power Pac 300	Biorad, München
qRT-PCR-System	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sicherheitswerkbank	Hera Safe HS12	Heraeus Instruments, München
PCR workstation	Ultraviolett sterilizing workstation	Peqlab, Erlangen
Spectrophotometer	NanoDrop ND-100	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	MJ Mini	Biorad, München
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge	Avanti J-25	Beckman Coulter, Krefeld
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Köln

### **10.3. Expressionsdaten**

Alle wie unter 5.4.4 (*in vitro* Infektionsversuch) und 5.5.5 (*in vivo* Infektionsversuch) beschriebenen generierten Expressionsdaten, befinden sich auf beigefügter CD.

### **10.4. Ergebnisse der Software „Pathway Express“**

Alle wie unter 5.4.4 (*in vitro* Infektionsversuch) und 5.5.5 (*in vivo* Infektionsversuch) beschriebenen durch die Software Pathway Express generierten Graphiken der signifikant regulierten Signalwegen befinden sich auf beigefügter CD.

### **10.5. Annotationsliste**

Die aktuelle Annotationsliste zum Stand von Oktober 2010 befindet sich auf beigefügter CD: Zu diesem Zeitpunkte umfasste sie 13 353 Gene, wobei die Gesamtheit des gesamten Hühnergenoms ca. 22 000 Gene umfasst. Diese Liste wurde bei der Auswertung der Microarrays in vorliegender Arbeit verwendet.

### **10.6. Genlisten der in der Software generierten Cluster**

Die sich in den einzelnen MEV (*multiple experiment viewer*) –Cluster befindlichen Gene sind sich auf beigefügter CD. Dies umfasst beim Caecum neun und bei Caecaltonsille sechs charakteristische Cluster.

### **10.7. RNA-Qualität der Infektionsversuche**

Sowohl die Proben des *in vitro* Infektionsversuches (5.4) als auch die Proben des *in vivo* (5.5) Infektionsversuches wurden auf ihre Qualität geprüft. Die Ergebnisse der photometrischen Messung sowie der Bioanalyser-Technik befinden sich auf beigefügter CD.

### **10.8. Spezifische Aktivität der cRNA**

In die cRNA eingebaute Cyanin-Moleküle wurden in einem Quotienten ausgedrückt, der spezifischen Aktivität. Die Ergebnisse des *in vitro* sowie des *in vivo* Versuches sind auf beigefügter CD zu finden.

## 11. DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Überlassung dieses Themas. Ich danke ihm sowie Dr. Susanne Schwarz und Dr. Sonja Härtle für die gute Betreuung. Sie halfen mir stets bei Problemen jeglicher Art und hatten immer ein offenes Ohr, selbst wenn dies über die normale Arbeitszeit hinausging.

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger bedanke ich mich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, das Stellen der Salmonellen und die reibungslose Durchführung *des in vivo* Versuches möchte ich mich herzlich bei meinen Verbundpartnern des FBI-Zoos Prof. Dr. Lothar Wieler, Dr. Karsten Tedin und Sven Maurischat bedanken. Sven, vielen Dank für das Lehren der Bakteriologie. Ich war immer gerne bei Euch in Berlin, wa!

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Reinhard Straubinger, dessen Räumlichkeiten ich für die Salmonellen-Arbeiten freundlicherweise nutzen durfte. Zudem mein Dank der Arbeitsgruppe Blum, deren Labor ich für die Durchführung der Arrays und vor allem deren Arrays Scanner ich nutzen durfte.

Ich bedanke mich sehr bei der gesamten AG Kaspers für die nette Atmosphäre im Labor, konstruktive Diskussionen, Input, Thesen und jegliche Unterstützung bei meiner Arbeit und auch für stets bereichernde Kongressabende, Ausflüge, Wies'n-Besuche, Bergtouren uvm. außerhalb der Arbeitszeit.

Vielen Dank an Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl und Marina Kohn – unsere „guten Seelen“ im Labor, die für mich oft die erste Anlaufstelle waren.

Mein Dank geht auch an Susanne Hainke und Ingrid Riehl, die mich bei der Histologie unterstützten.

Für die gute Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Fritz Meggendorfer, Thomas Hoschka und Hedi Opitz.

Ein großer Dank gilt meinen Mitdoktoranden: Susanne Hainke, Julia Korte, Carsten Krohmann, Katharina Lochner, Jana Pürzel, Katharina Schenk-Weibhauser, Magdalena Schuhmacher; Stefan Schmieder, Benjamin Schusser. Ihr wart für mich immer mehr als nur Kollegen!!!

Benni, Carsten, Julia, Kathrin, Stefan und Susi: Es freut mich sehr, dass wir die „VetDocs München e.V“, die Doktorandenvertretung der tierärztlichen Fakultät gemeinsam ins Leben gerufen haben! Vielen Dank dafür. Der große Anklang zeigt mir immer wieder, wie wichtig es ist, dass es nun - durch uns - ein Sprachrohr für die Doktoranden gibt. In diesem Zusammenhang gilt auch Prof. Dr. Bernd Kaspers und Dr. Sonja Härtle meinen Dank, die uns in unserem Vorhaben immer unterstützten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden!!!! Bei „meinen Isländern“, „den Physikern“, den KABU-Gängern, „der Crew“, der Wasserski-Fraktion und der besten WG ever! Ihr bietet mir immer einen schönen Ausgleich zur Wissenschaft.

Aus meiner Studienzeit möchte ich mich bei Sarah Zeller und Stefanie Daub bedanken, welche mir während des ganzen Studiums und bei jeder Prüfung zur Seite standen und mir sehr wichtige Begleiter geworden sind.

Zu dem Kreis der Freunde zählt auch meine Volleyball-Mannschaft. Liebe „Streuner“, vielen Dank für's „Dasein“ – sowohl auf als auch außerhalb des Spielfeldes! ...auf in die nächste Liga!

Jon, tack så mycket för din engelska förbättringen och din hjälp.

Ein großer Dank gilt meinem Vater, meiner Mutter mit Walter und auch meinem Bruder Daniel, welche mir das Studium erst ermöglicht haben. Sie ließen mir immer alle Freiheiten und bestärkten mich bei all meinem Handeln und bei jeder von mir getroffenen Entscheidung bedingungslos.