

**Immunscreening Virulenz-adaptierter Expressionsbibliotheken
aus einem *in vitro* Infektionsmodell mit *Salmonella* Enteritidis**

**vorgelegt von Lena Danckert
geboren in Rostock**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin: Molekularbiologie**

**angefertigt am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie- Institutsteil
Bioanalytik und Bioprozesse, Potsdam (IZI-BB)**

**eingereicht an der an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam
im Juni 2018**

Disputation erfolgte am 04.12.2018

Hauptbetreuung erfolgte durch Prof. Dr. Frank F. Bier

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Frank F. Bier**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Günther**
- 3. Gutachter: Prof. Dr. Katja Hanack**

INHALTSVERZEICHNIS	I
I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
II. TABELLENVERZEICHNIS	VI
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	1
2.1. BAKTERIELLE INVASIVE PATHOGENE	1
2.1.1. Gattung <i>Salmonella</i>	2
2.1.2. Epidemiologie von <i>Salmonella enterica ssp. enterica</i> Infektionen	3
2.2. IMMUNOLOGISCHE GRUNDLAGEN	5
2.2.1. Darmspezifische Barriere- und Immunmechanismen	5
2.2.2. Pathogenerkennung und Aufrechterhaltung der Epithelbarriere	7
2.3. PATHOGEN-WIRTS INTERAKTIONEN	9
2.3.1. Pathogenese von <i>Salmonella</i> - enteritische Salmonellose	9
2.3.2. Aktuelle Forschung	14
2.4. DETEKTION VON PATHOGENEN BAKTERIEN	15
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1. MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	19
3.1.1. Oligonukleotide	20
3.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	21
3.2.1. Kultivierung von Bakterien	21
3.2.2. Herstellung kompetenter <i>S. Enteritidis</i> Zellen	21
3.2.3. Knockout Generierung mittels Lambda Red Rekombination	21
3.2.4. RNA Stabilisierung für Bakterien	22
3.3. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	22
3.3.1. Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	22
3.3.2. Zellfärbungen	23
3.3.3. Gentamicin Invasionstest	23
3.3.4. Eukaryotischer Zellaufschluss für <i>Salmonella</i> - RNA Extraktion.....	24
3.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
3.4.1. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	25
3.4.2. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten und deren Extraktion	25
3.4.3. Klonierung von Einzelgenen und Transformation in <i>E. coli</i>	25
3.4.4. RNA Extraktion und Analyse	26
3.4.5. mRNA Isolierung der RNA Proben aus dem Infektionsmodell	26
3.5. MICROARRAY BASIERTES IMMUNSCREENING EINER cDNA EXPRESSIONSBIBLIOTHEK ..	27
3.5.1. cDNA Generierung	27
3.5.2. Normalisierung der cDNA Bibliothek	28
3.5.3. Klonierung der cDNA Bibliothek und die Herstellung des Vektors	29
3.5.4. Verpackung der cDNA Bibliothek in <i>E. coli</i> zur Proteinexpression	29

3.5.5.	Kontrollproteine für eine Evaluierung der Bindung zum Antikörper	30
3.5.6.	Immunscreening via Microarray Slides	31
3.5.7.	Auswertung der Microarray Slides	31
3.6.	TRANSKRIPTOMANALYSE MITTELS NEXT-GENERATION-SEQUENCING (NGS).....	32
3.7.	BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG	33
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	CHARAKTERISTIKA DES INFEKTIONSMODELLS MIT <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS	34
4.1.1.	Morphologische Auffälligkeiten von J774A.1 und CaCo-2 im Infektionsmodell	34
4.1.2.	Qualitativer Nachweis für <i>S. Enteritidis</i> im Infektionsmodell	38
4.1.3.	Quantifizierung des Invasionsverhaltens von <i>S. Enteritidis</i> im Infektionsmodell	39
4.2.	AUFSCHLUSS DES INFEKTIONSMODELLS ZUR GEWINNUNG VIRULENZ-ADAPTIERTER RNA VON <i>S. ENTERITIDIS</i>	40
4.2.1.	Etablierung eines verbesserten Zellaufschlusses	42
4.2.2.	Voraussetzungen der Virulenz-adaptierten RNA für Downstream Experimente	44
4.3.	HERSTELLUNG VIRULENZ-ADAPTIERTER <i>SALMONELLA</i> EXPRESSIONSBIBLIOTHEKEN FÜR DAS IMMUNSCREENING VIA MICROARRAY	45
4.3.1.	Kriterien zur Identifikation von immundominanten Proteinen	48
4.3.2.	Identifizierung immundominanter Proteine der <i>Salmonella</i> Bibliotheken.....	49
4.4.	DIFFERENTIELLE GENEXPRESSIONSANALYSE DER <i>SALMONELLA</i> RNA	54
4.4.1.	Vergleich der Genregulation zwischen CI-CN-IV und die Zuordnung spezifischer Virulenzfaktoren	56
4.4.2.	Regulation der <i>Salmonella</i> -Pathogenitätsinsel SPI-1, SPI-2 und deren Effektoren.....	62
4.4.3.	Regulation des <i>Salmonella</i> -Virulenzplasmids	64
4.4.4.	Gene mit alleiniger Expression unter Virulenz-adaptierten Bedingungen.....	65
4.5.	VERGLEICH ZWISCHEN VIRULENZ-ADAPTIERTER CI/CN UND IV- EXPRESSIONSBIBLIOTHEK	66
4.6.	RELEVANZ DER GENE <i>SEN1171A/B</i>, <i>SEN1423</i> UND <i>SEN2228</i> IM <i>IN VITRO</i> INFEKTIONSVERHALTEN VON <i>S. ENTERITIDIS</i>	71
5.	DISKUSSION	73
5.1.	INFEKTIONSMODELL: EINE <i>IN VITRO</i> ALTERNATIVE ZU <i>SALMONELLA</i>- WIRTSSTUDIEN..	74
5.1.1.	Morphologische Auffälligkeiten der Zelllinien J774A.1 im Infektionsmodell- Hyperreaktion des Wirts auf das Pathogen <i>Salmonella</i>	75
5.1.2.	Morphologische Auffälligkeiten der Zelllinien CaCo-2 im Infektionsmodell- Dokumentation der <i>Salmonella</i> -containing vacuole (SCV)	77
5.2.	IMMUNSCREENING VIRULENZ-ADAPTIERTER EXPRESSIONSBIBLIOTHEKEN.....	82
5.2.1.	Extraktion der Pathogen-RNA- Heterogenität zwischen Pathogen und Wirt	82
5.2.2.	Generierung von cDNA Bibliotheken- Eine Frage der Größe	84
5.2.3.	Immunscreening der Expressionsbibliotheken- immundominante Kandidaten.....	86
5.2.4.	Vergleich der Virulenz-adaptierter CI/CN und IV-Expressionsbibliothek-Anreicherung spezifischer Virulenz-assoziiierter Gene	89
5.3.	TRANSKRIPTOMANALYSE- <i>IN VITRO</i> PATHOGEN GENEXPRESSIONSPROFIL IN EPITHELZELLEN	91

6. ZUSAMMENFASSUNG	94
7. ABSTRACT.....	96
LITERATURVERZEICHNIS	98
ANHANG.....	112
VERÖFFENTLICHUNGEN	129
DANKSAGUNG.....	131
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	132

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Morphologie der menschlichen Dünndarm-Schleimhaut und die immunologischen Schutzmechanismen.....	6
Abbildung 2.2: Salmonella Invasion und SCV-Reifung und SIF-Biogenese in Epithelzellen	11
Abbildung 4.3: Zellmorphologie von J774A.1 Zellen während der Infektion mit S. Enteritidis	35
Abbildung 4.4: Zellmorphologie von CaCo-2 Zellen während der Infektion mit S. Enteritidis.....	36
Abbildung 4.5: Bewegung der Salmonellen in CaCo-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation	37
Abbildung 4.6: EGFP- exprimierende Salmonellen während der Infektion in J774A.1 Zellen.....	38
Abbildung 4.7: Logarithmische Darstellung der CFUs im CaCo-2 Infektionsmodell zur Quantifizierung des Infektionsverhalten von S. Enteritidis	39
Abbildung 4.8: RNA Extrakte aus den Vorversuchen zum Zellaufschluss in HeLa Zellen (A) und der RNA Qualität nach Oligo (dT) Bead Behandlung (B)	41
Abbildung 4.9: Optimierung des Zellaufschlusses für CaCo-2 Zellen dargestellt am Elektropherogramm und der Gel- ähnlichen Darstellung der RNA	43
Abbildung 4.10: RNA Proben für die vergleichende Analyse von Genexpressionsprofilen zwischen intrazellulären (CI) und extrazellulären (CN) Salmonella-Proben aus dem CaCo-2 Infektionsmodell	44
Abbildung 4.11: Reverse Transkription und Normalisierung für die cDNA Bibliotheksgenerierung ..	45
Abbildung 4.12: Darstellung der Concatamer Sequenz am Beispiel zweier cDNA Sequenzen	46
Abbildung 4.13: Optimierung der Expressionsbibliothek durch Klonierung von cDNA Fragmenten mit einem definierten Größenausschluss.....	47
Abbildung 4.14: Identifizierung immundominanter Klone anhand der Kontrastwerte aller 768 Proteine der Salmonella- in vitro Bibliothek nach dem Immunscreening (n=3)	48
Abbildung 4.15: Prozentuale Darstellung der Sequenzen aus der Top96 der immundominanten Proteine der verschiedenen Expressionsbibliotheken	50
Abbildung 4.16: Darstellung der Ähnlichkeit und Korrelation zwischen den biologischen Replikaten des Infektionsmodells als auch der Transkriptome	54
Abbildung 4.17: Venn-Diagramm zur Identifikation von DEGs, die spezifisch sind für CI oder CN..	56
Abbildung 4.18: Infektionsmodell spezifische DEGs (Schnittmenge aller Kreise) unterteilt in COG-Kategorien mit der entsprechenden Regulation	57
Abbildung 4.19: Heatmap der 114 CI spezifischen Gene für die CI, CN und IV Bedingung	60
Abbildung 4.20: Heatmap der relativen Genexpression von SPI-1 und SPI-2 sowie Virulenz- assoziierten Genen in CI, CN und IV	63
Abbildung 4.21: Heatmap der relativen Genexpression des Virulenzplasmids pSEN in CN, CI & IV	64
Abbildung 4.22: Relative Genexpression der CI und CN Expressionsbibliothek.....	67
Abbildung 4.23: Quantifizierung der Infektionsrate für die Knockout-Mutanten und den WT	72

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Chemikalien mit Angabe zum Hersteller und CAS Nummer.....	19
Tabelle 3.2: Medien und Puffer unter Angabe der Zusammensetzung und der Verwendung	20
Tabelle 3.3: Zelllinien und die dazugehörige Bezugsquelle und Medium	22
Tabelle 3.4: LD-PCR-Ansatz für die Zweitstrangsynthese der cDNA.....	27
Tabelle 3.5: PCR-Ansatz für die Amplifikation nach Normalisierung der cDNA Bibliothek	28
Tabelle 3.6: PCR-Ansatz für die Linearisierung des Klonierungsvektors pFN18A.....	29
Tabelle 3.7: Kontrollproteine für das Microarray-basierte Immunscreening, mit Angabe des Gens, des Ursprungsorganismus und der Literaturquelle zur beschriebenen Immunität	30
Tabelle 4.8: Deklaration der Bibliotheken und Zusammensetzung des RNA Ursprungs	45
Tabelle 4.9: 64 immundominante Proteine der CI, CN und IV Bibliothek.	51
Tabelle 4.10: Immundominante Proteine, welche konserviert sind innerhalb des Phylums Proteobacteria bis hin zu dem Genus Salmonella.	53
Tabelle 4.11: CI-spezifische DEGs aufgegliedert in GO Kategorie biologischen Prozesse.....	58
Tabelle 4.12: CN-spezifisch hochregulierte DEGs untergliedert in ihre COG-Kategorie.....	61
Tabelle 4.13: Transkripte, die nur unter Virulenz-adaptierten Bedingungen exprimiert wurden.	65
Tabelle 4.14: „Angereicherte Gene“ aus der Expressionsbibliothek, die zu der Top 96 der häufigsten und am stärksten reguliertesten Genen der Transkriptomanalyse gehören jeweils für CI, CN und IV	69
Tabelle 4.15: Mehrfach identifizierte Gene in den Expressionsbibliotheken (CI/CN/IV)	70
Tabelle 4.16: Spezifische Proteine die mehrfach identifiziert wurden in CI und CN.....	70
Tabelle 4.17: Genexpressionsdaten der Gene SEN2228, SEN1423, SEN1171A und SEN1171B.....	71

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a. u.	<i>arbitrary unit</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding-DNA sequence</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
CI	intrazelluläre Salmonellen im CaCo-2 Infektionsmodell
CN	nicht-intrazelluläre Salmonellen im CaCo-2 Infektionsmodell
COG	<i>clusters of orthologous groups</i>
CP	<i>crossing point</i>
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
FDR	<i>false discovery rate</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FPKM	Fragmente pro Kilobase pro Million gemappter Fragmente
IV	<i>in vitro</i>
LB	Luria-Bertani broth
Log ₂ FC	Logarithmus mit Basis 2 von <i>fold change</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	mukosaassoziierte lymphatische Gewebe
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nt	Nukleotid
NTS	nicht-typhöse Salmonellen
NTS	nicht-typhöse Salmonellen
OD	Optische Dichte
p. i.	<i>post infection</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
p-Wert	<i>probability value</i> , Wahrscheinlichkeitswert
RIN	RNA-Integritätsnummer
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Mikroorganismen wurden bereits im 19. Jahrhundert von Robert Koch in gesundheitsschädliche Bakterien und „andere Arten“ von Bakterien unterteilt. Pathogene wurden als eine statische und unveränderliche Größe angesehen, wobei ihr Infektionsverlauf immer gleich ist und sie eine inhärente Fähigkeit (Virulenz) besitzen, um Krankheiten im Wirt auszulösen. Mit der Zeit wurde erkannt, dass der Wirt selbst, primär sein Immunsystem und seine Umgebung, Mikroorganismen befähigt eine Infektion auszulösen. Die Forschung der letzten Jahre hat einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung von Virulenzfaktoren und besseren Differenzierung von Pathogenen und nicht-Pathogenen geleistet, wobei insbesondere die Genomsequenzierung eine zentrale Rolle spielte. Dabei ist die Trennung zwischen Pathogen und nicht-Pathogen nicht immer eindeutig. Pathogenität ist kein einzelnes Kriterium, wenngleich typische Virulenzfaktoren existieren. Stattdessen ist eine Erkrankung im Wirt in den meisten Fällen das Ergebnis mehrerer ineinandergreifender Faktoren [148].

Die Infektionswege von Bakterien auf den Menschen können indirekt über die Umwelt erfolgen, bspw. durch eine Schmierinfektion über Hände, verunreinigtes Wasser und Nahrungsmittel oder als Tröpfchen über die Luft. Hierbei sind die häufigsten Eintrittspforten die Schleimhaut des Atemtrakts und das Verdauungssystem als auch die Bindehaut des Auges. Weltweit gehören Lungenentzündungen, Durchfallerkrankungen, AIDS, Tuberkulose und Malaria zu den häufigsten Infektionskrankheiten mit tödlichem Verlauf. Diarrhoe ist ein häufiges Symptom gastrointestinaler Infektionen, die durch eine Vielzahl von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Protozoen verursacht werden. *E. coli*, *Shigella*, *Campylobacter* und *Salmonella* gehören weltweit zu den wichtigsten bakteriellen Erregern dieser Erkrankungen. Salmonellen kommen in warm- und kaltblütigen Organismen als auch in der Umwelt vor und sind durch ihre fakultativ-anaerobe Lebensweise intra- und extrazellulär lebensfähig. Es wurden bislang über 2500 *Salmonella* Serovare identifiziert, die unterschiedlichste Lebensräume besiedeln und je nach Wirtsorganismus zu einer variablen Symptomatik führen können. Im Menschen führt eine Infektion zu einer lokalen Gastroenteritis mit milden Symptomen bis hin zu einer systemischen Erkrankung mit tödlichen Folgen. Der Verlauf ist abhängig von dem *Salmonella* Serovar und dem Wirt, insbesondere dessen Alter, Immunstatus oder Vorerkrankungen. Typhus-Erkrankungen treten in den Industriestaaten nur noch selten auf, durch strenge gesetzliche Vorschriften insbesondere in der Trinkwasseraufbereitung. Im Gegensatz dazu, ist die Prävention nicht-typhöser Salmonellen erschwert. Trotz wirksamer Antibiotika-Therapien gehört *Salmonella*, gefolgt von *Campylobacter* und EHEC, immer noch zu den weltweit häufigsten lebensmittelbedingten Krankheitserregern. Insbesondere die Zunahme resistenter Bakterien ist ein Problem, was vor allem durch einen unsachgemäßen Gebrauch in der Human- und Veterinärmedizin zur Entstehung und Verbreitung von Resistenzen beiträgt. *Salmonella* Enteritidis, ein Serovar mit breitem Wirtsspektrum, ist ein zoonotischer Erreger, dessen Übertragung über Tiere in die Nahrungskette des Menschen erfolgt, bspw. über Hühnerprodukte [213]. In Tieren verläuft die Infektion oftmals asymptomatisch und bleibt

unentdeckt, wodurch das Risiko einer Ausbreitung des Erregers steigt. Zur Vorbeugung und Bekämpfung von Salmonellen-Infektionen in der Geflügelproduktion wurden verschiedene prophylaktische Maßnahmen ergriffen, zu denen auch Impfungen gehören. Diese Maßnahmen erzielen dennoch keine vollständige Lösung, weshalb in den letzten Jahren eine Stagnation der Zahlen an Salmonellen- Infektionen berichtet wurde. Für den Menschen existieren bislang nur Impfstoffe gegen *S. Typhi*, aber nicht gegen nicht-typhöse Serovare. Dies stellt eine erhebliche Einschränkung der bestehenden Präventionsstrategien dar. Die Verfügbarkeit einer zuverlässigeren und spezifischen Diagnostik ist somit wichtig für eine Prävention von Infektionen. Hierbei sind bereits unterschiedliche Ansätze vorhanden, allerdings ist die Sensitivität und Spezifität verfügbaren Nachweismethoden bislang nicht ausreichend. Durch ein besseres Verständnis der wirtsspezifischen Faktoren von *S. enterica* Serovaren wird die Entwicklung von Therapien, Impfstoffen und Diagnostika begünstigt.

Folglich ist das Ziel der aktuellen Arbeit ein wirtsspezifisches Modell für *S. Enteritidis* zu entwickeln und anhand dessen neue Zielstrukturen für den Erreger zu identifizieren, die sich für diagnostische und therapeutische Anwendungen eignen. Das wirtsspezifische Modell wird anhand des Infektionsweges von *S. Enteritidis* in einem *in vitro* Modell unter Zellkulturbedingungen nachgestellt. Der Gentamicin-Invasionsassay ermöglicht Pathogen-Wirt-Studien, da Salmonellen, nachdem sie die Wirtszellen penetriert haben, intrazellulär durch die eukaryotische Zellmembran vor Gentamicin geschützt vorliegen. Nach der Invasion in die Wirtszelle, beginnt eine schnelle Adaption, um das Überleben und die Vermehrung intrazellulär voranzutreiben. Hierfür werden spezifische Virulenzfaktoren exprimiert, die zum Teil charakteristisch für den Erreger sind. Für die Pathogen-Wirt-Studie wurde das Transkriptom der Salmonellen im infektionsähnlichen Modell untersucht und die Regulation von Virulenzfaktoren und assoziierten Proteinen charakterisiert. Durch den Einsatz Virulenz-adaptierter Salmonellen soll eine Anreicherung von Proteinen erzielt werden, deren Exposition im Wirt gewährleistet ist. Somit soll eine Erhöhung an potentiellen Antigenen erzielt werden. Die Identifizierung von neuen potentiell immunogenen Proteinen wird über ein cDNA-basiertes Protein- Microarray Screening verfolgt. Dabei wird die Pathogen-RNA aus einem Wirts-adaptierten Modell verwendet und eine cDNA Bibliothek generiert. Der cDNA-basierte Ansatz hat den Vorteil gegenüber genomischen Bibliotheken, dass vorrangig protein-kodierende Sequenzen berücksichtigt werden. Weiterhin werden, durch die Verwendung von RNA aus einem Wirts-adaptierten Modell, Proteine berücksichtigt, die primär während des Infektionsgeschehens relevant sind. Mithilfe des Microarray-basierten Screenings von rekombinant exprimierten Proteinen kann ein Hochdurchsatz bei der Untersuchung auf potentielle Binder erzielt werden. Die Ziel-Proteine werden mit einem N-terminaler Fusionspartner, dem spezifischen HaloTag®, exprimiert, der eine kovalente Bindung zum synthetischen HaloTag Liganden auf der Oberfläche der Microarrays eingeht. Hierbei wird die Notwendigkeit einer zusätzlichen Proteinaufreinigung erspart und ein hoher Durchsatz an Proben gewährleistet. Auf diese Weise wird die Erkennung spezifischer Zielstrukturen, in erster Linie neue Virulenzfaktoren und immunogene Proteine, angestrebt, die in ihrer Gesamtheit neuartige Therapieansätze eröffnen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Bakterielle invasive Pathogene

Pathogene unterscheiden sich unter anderem durch chromosomal kodierte Virulenzfaktoren von anderen Bakterien. So sind z. B. kommensale Bakterien, wie sie im Darm oder auf der Haut vorkommen, meist apathogen oder fakultativ pathogen. Krankheitserregende, obligat pathogene Bakterien sind befähigt in einen Wirt einzudringen und ihn zu infizieren. Dafür exprimieren sie eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Häufig befinden sich diese Gene in räumlicher Nähe und werden deshalb als Pathogenitätsinseln (PAI) bezeichnet oder sie befinden sich auf einem Plasmid. Die PAIs sind gekennzeichnet durch einen abweichenden G+C-Gehalt und Codon-Usage im Vergleich zum Rest des Chromosoms und werden oft in tRNA-Gene eingefügt. Daher wird vermutet, dass PAIs durch horizontalen Transfer von Phagen oder Plasmiden unbekannter Herkunft erworben wurden. Die Adaption von Bakterien an einen spezifischen Wirt ist verbunden mit Erwerb und Verlust von Genen, wodurch eine Anpassung an eine Nische erfolgt [118]. Der horizontale Gentransfer wird durch Selektionsdruck stimuliert und stellt eine Möglichkeit zur Anpassung im Laufe der Evolution dar [99, 123]. Ein ähnlicher Vorteil entsteht beim Erwerb von Resistenzgenen oder Genen wie *stx* (Shiga-Toxin). Diese sind genetisch kodiert, können sich vertikal wie horizontal in Bakterien ausbreiten und werden evolutionär betrachtet besonders häufig identifiziert [162]. Dies lässt sich auf eine Fitnesserhöhung in ihrer Umwelt zurückführen, wobei bspw. der Erwerb von ESBL-Plasmiden sogar die chromosomale Genexpression beeinflusst und das bakterielle Virulenzpotential steigert [184].

Infizieren Bakterien ihren Wirt, so kann man diesen Prozess in mehrere Schritte untergliedern: Anhaften (Adhäsion), Eindringen (Invasion), Anpassung (Adaption) und Ausweichen (Evasion) [219]. Zu jedem Schritt der bakteriellen Infektion sind Virulenzfaktoren bekannt, die es dem Pathogen ermöglicht den Wirt zu besiedeln. Adhäsine wie Fimbrien, Lipopolysachharide (LPS) und Lektine sind Moleküle auf der Oberfläche des Pathogens, die für die Erkennung und Anheftung mit Rezeptoren der Wirtszelle interagieren. Ihre biologische Funktion besteht in der Biofilmbildung und der bakteriellen Signalverstärkung wie der Induktion von Eisen-Aufnahme und Invasionsvorgängen. Invasine sind meist Proteine, die das Eindringen in die Zelle unterstützen. Sobald das Pathogen intrazellulär vorliegt, ist es vor Angriffen des Immunsystems als auch vor Antibiotika geschützt und befindet sich in einem nährstoffreichen Habitat. Diese intrazelluläre Nische ist obligatorisch, wenn die Bakterien auf Nährstoffe innerhalb der Wirtszelle angewiesen sind und alleinig intrazellulär befähigt sind zu wachsen, bspw. *Chlamydia*. Wohingegen fakultativ intrazelluläre Bakterien wie *Salmonella* unabhängig von der Wirtszelle vermehrungsfähig sind. Für eine Etablierung müssen sich sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Pathogene vor Abwehrmechanismen des Wirts schützen bzw. sie unterwandern. Dabei existieren verschiedene Strategien, z. B. die Ausbildung einer Bakterien-beinhaltenden Vakuole (Phagosom-ähnlich), wodurch die Fusion des antibakteriell wirksamen Phagolysosoms verhindert wird. Alternativ kann die Membran

der Bakterien-beinhaltende Vakuole lysiert werden und die Vermehrung im Cytoplasma erfolgen. Sobald die intrazelluläre Nische verlassen wird, werden Bakterien vom Komplementsystem und Phagozyten erkannt. Zum Schutz bilden Bakterien wie Streptokokken eine Kapsel aus Polysacchariden, andere wie *Staphylococcus aureus* maskieren ihre Oberfläche mit wirtsähnlichen Molekülen, wodurch sie nicht als fremd erkannt werden [189]. Ebenfalls den Virulenzfaktoren zugehörig sind Toxine wie das Exotoxin aus *Clostridium botulinum* und- *tetani* (Botulismus und Tetanus) oder das Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* und Shiga-Toxin-produzierenden *E. coli* (STEC). Exotoxine wirken immer wirtsschädigend und weisen ein hohes toxisches Potenzial auf, besonders häufig vertreten sind sie bei grampositiven Pathogenen. Gramnegative Pathogene besitzen in ihrer Zellwand Lipopolysaccharide (LPS) mit einer endotoxischen Wirkung, bei Lyse der Zellen werden diese frei und führen zu einer Hyperreaktion im Wirt.

2.1.1. Gattung *Salmonella*

Salmonellen sind gram-negative Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören und dem Phylum *Proteobacteria* zuzuordnen sind. Zu der Familie gehören weitere wichtige Gattungen wie *Escherichia*, *Yersinia*, *Klebsiella*, und *Shigella*. Ihre Gemeinsamkeiten sind ein fakultativ anaerober Stoffwechsel und die gemischte Säuregärung. Die Einteilung von *Salmonella* erfolgte anhand von serologischen Merkmalen (Serovar), erstmals klassifiziert im Kauffmann- White-Schema [110]. Die Oberflächenantigene werden serologisch (Agglutinationstest) identifiziert und in einer Antigen Formel bestehend aus dem O- (somatische Lipopolysaccharide), H- (Geißel) und, falls vorhanden, Vi-Antigen (Kapselpolysaccharid) angegeben. Mittlerweile wurden mehr als 2500 Serotypen identifiziert. Für eine vereinfachte Nomenklatur wurde 2015 vom Internationalen Komitee für Systematik von Prokaryoten (ICSP) entschieden, dass sich das Genus in zwei Spezies unterteilt, *S. bongori* und *S. enterica*, letztere untergliedert sich nochmals in sechs Subspezies (ssp.), *S. enterica* ssp. *enterica* (I), *S. enterica* ssp. *salamae* (II), *S. enterica* ssp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssp. *houtenae* (IV) und *S. enterica* ssp. *indica* (VI) [215]. Der Spezies *enterica* werden 99 % der Salmonellen zugeordnet, wobei nur die Subspezies I, IIIa und IIIb klinisch Relevant sind. *S. enterica* ssp. *enterica* umfasst die meisten Serovare mit klinischer und epidemiologischer Bedeutung beim Menschen wie *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* und *S. Infantis*.

Salmonellen sind stäbchenförmig mit einer Größe von 0,7- 1,5 µm x 2- 5 µm. Sie sind meist peritrich begeißelt und dadurch zur aktiven Bewegung befähigt. Ihr Vorkommen ist divers und reicht von der Umwelt (Wasser, Boden, Pflanzen), hin zu Lebewesen (Menschen, warm- und kaltblütige Tiere) bis zu tierischen Lebensmitteln.

2.1.2. Epidemiologie von *Salmonella enterica ssp. enterica* Infektionen

Bei einer Salmonellen Infektion können zwei unterschiedliche Krankheitsbilder auftreten, typhös und enteritisch (nicht-typhös). Die typhöse Form wird von *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C ausgelöst und führt zu Typhus und typhusähnlichen Erkrankungen. Sie ist eine schwere Allgemeininfektion, die über 1 bis 6 Wochen andauert und bei fehlender Therapie in 15% der Fälle tödlich verläuft. Die Erreger lösen eine generalisierte Infektion aus, charakteristisch nach einer zweiwöchigen Inkubationszeit im Körper mit einem stufenförmigen Fieberanstieg und grippeähnlichen Symptomen. Es treten Pneumonien, Myokarditiden und Nekrosen im Darmtrakt auf, die zum Tode führen können [89]. Typhus und Paratyphus sind relativ seltene Krankheiten in der Europäischen Union (EU). Hauptsächlich werden diese Krankheiten auf Reisen in Länder außerhalb der EU, in tropischen Regionen (insbesondere Südasien) oder bei Naturkatastrophen erworben. Vor allem mangelnde Hygiene und ein Mangel an sauberem Trinkwasser befördern die Verbreitung dieser Krankheiten. Durch die Verfügbarkeit von bisher zwei Impfstoffen ist ein präventiver Schutz und eine Krankheitsvermeidung möglich. 2014 wurden dennoch 934 Fälle von Typhus in der EU dokumentiert, mit abnehmenden Trend seit 5 Jahren [62].

Zu den enteritischen Salmonellen zählen alle Serovare außer typhöse (Non-typhoidal *Salmonella*, NTS). Sie sind durch eine hohe minimale-Infektionsdosis ($>10^5$ Bakterien) und eine mildere Symptomatik gekennzeichnet. Sie führen zu Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Bauchschmerzen und Durchfall. Die Infektion ist lokal auf den Darm beschränkt und heilt in der Regel spontan innerhalb von 2 bis 7 Tagen ab. Dennoch kommt es nicht selten bei Kindern, älteren und abwehrgeschwächten Menschen zu einer generalisierten Infektion (typhusähnlich), bei der eine Antibiotikatherapie indiziert ist [89]. 2016 wurde berichtet, dass für Salmonellen Resistenzen gegen Ampicillin, Sulfonamide und Tetracycline häufig, während die Resistenz gegen Cephalosporine der dritten Generation gering auftreten [212]. Resistente und multiresistente Salmonellen verbreiten sich seit Jahren in ganz Europa. Salmonellen sind in Nutztieren wie Geflügel, Schweinen und Rindern sowie in Haustieren wie Katzen, Hunden, Vögeln und Reptilien weit verbreitet. Salmonellose beim Menschen wird im Allgemeinen durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs, hauptsächlich Hähnchen- und Schweinefleisch und deren Folgeprodukte, verursacht. Zusätzlich sind Kreuzkontaminationen ein großes Problem. Es kommen nicht-kontaminierte Lebensmittel in den Kontakt mit durch Salmonellen-infizierte Menschen oder Oberflächen und werden dadurch zu einem Infektionsrisiko. Die häufigsten Serovare, die bei menschlicher Salmonellose identifiziert werden, sind *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*. Beide Serovare sind nicht-wirtsadaptiert und können Tier als auch Mensch infizieren (Zoonosen), wobei *S. Enteritidis* primär an Geflügel und *S. Typhimurium* an Geflügel, Schwein und Rind adaptiert ist. 2016 wurden 94530 Fälle von Salmonellose in der EU gemeldet, wobei eine geringfügige Zunahme in den letzten 5 Jahren erfasst wurde [213]. Durchfallerkrankungen gehören weltweit zu der häufigsten Erkrankung durch kontaminierte Lebensmittel, 550 Millionen Menschen davon 220 Millionen Kinder unter 5 Jahren erkranken jährlich. Hierbei zählt *Salmonella* zu einem der vier wichtigsten globalen Auslöser von Durchfallerkrankungen.

Insbesondere hat die hohe Anpassungsfähigkeit der Salmonellen an verschiedene Milieubedingungen, ihre Widerstandsfähigkeit und ihre hohe Vermehrungsrate dazu beigetragen, dass *Salmonella* das häufigste Pathogen bei lebensmittelbedingten Krankheiten ist. Maßnahmen zur Prävention können die Gefahr einer Infektion deutlich verringern, so dass folgende 5 Aspekte für einen sicheren Umgang mit Lebensmitteln im privaten Haushalt zu berücksichtigen sind: Hygiene (Hände waschen), Trennung von Rohem und Gekochtem, vollständiges Garen, Lagerung von Lebensmittel bei niedrigen Temperaturen und die Verwendung von sauberem/sicherem Wasser und Rohstoffen (*Five keys to safer food – World Health Organisation (WHO)*). Dieses Konzept der WHO folgt dem Leitsatz „Wissen ist gleich Prävention“. Eine weitere Maßnahme zum Schutz der Verbraucher ist die Kontrolle von Lebensmitteln, welche in Umlauf gelangen. Hierfür hat die EU 2003 ein umfassendes Monitoring Programm ins Leben gerufen, welches die Lebensmittelsicherheit vom Erzeuger bis zum Verbraucher gewährleistet und dabei vorrangig die Bekämpfung von Salmonellen in Geflügelbeständen wie Legehennen, Masthähnchen, Puten und Schweinen beinhaltet. Da die Infektion bei Tieren oft asymptomatisch verläuft und Dauerausscheider über viele Jahre unerkannt bleiben können. Hierbei ist eine umfassende Überwachung notwendig, um die positiven Bestände zu identifizieren und ggf. Maßnahmen zur *Salmonella*-Bekämpfung einzuleiten. Bei Salmonellen-positiven Beständen erfolgt zwischenzeitlich kein Verkauf von Eiern, was für Betriebe zum Teil erhebliche wirtschaftliche Auswirkungen hat. *Salmonella* Enteritidis ist der Serovar, der am häufigsten für lebensmittelbedingte Ausbrüche verantwortlich ist, vornehmlich verbreitet über Legehennen und Eierprodukte. In Legehennen-Großbetrieben sind besondere Risikofaktoren von *S. Enteritidis* Infektionen die Herdengröße, das Haltungssystem, die Reinigung und Desinfektion als auch das Auftreten von Nagetieren [51]. In den Jahren 2008-2012 war die Zahl der Salmonellosen in Europa kontinuierlich rückläufig, ein Indiz für den Erfolg des Monitoring Programms. Neben den strengeren gesetzlichen Regelungen und Hygienevorschriften ist dafür vor allem die weitreichende Impfkampagne zur Reduktion der Infektionsrate bei Nutztieren verantwortlich. Dennoch wurde seit 2012 in den jährlichen Meldungen zu Zoonosen eine Stagnation bzw. nicht-signifikante leichte Zunahme an Salmonellosen dokumentiert.

In Afrika wurden in den letzten Jahren häufig invasive nicht-typhöse Salmonellen (iNTS) als Ursache für eine generelle Blutbahninfektion, mit einer Todesrate von 20- 25 % in Verbindung gebracht. Hiervon waren vor allem Menschen betroffen, die mit HIV oder Malaria infiziert sind. Der *Salmonella*-Erreger könnte sich daher an eine ökologische und immunologische Nische angepasst haben, die durch Immunsuppression entsteht [64]. Hierbei scheint die Auswirkung der Virusinfektion auf die Phagozytose von Makrophagen und die Entstehung opportunistischer Krankheitserreger eine prominente Rolle einzunehmen [129]. Dieses Beispiel zeigt wie entscheidend die Rolle des Wirts ist und ermöglicht durch Studien ein tiefer gehendes Verständnis zu erlangen, wie *Salmonella* die Wirtsabwehr unterwandert bzw. den immunsupprimierten Zustand für sich nutzt. Diese Erkenntnisse sind wichtige Schritte, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln und bislang unbekannte Zielstrukturen zu identifizieren.

2.2. Immunologische Grundlagen

2.2.1. Darmspezifische Barriere- und Immunmechanismen

Die zentrale Funktion des Darms besteht darin Nährstoffe und Wasser aus der Nahrung aufzunehmen, bei gleichzeitiger Funktion als Barriere gegen hochmolekulare Strukturen und Mikroorganismen. Hierfür ist eine selektive Permeabilität notwendig.

Die Anatomie der Darmschleimhaut ist durch Falten, Villi (Zotten) und Mikrovilli auf ein Vielfaches vergrößert und gewährleistet so die hocheffiziente Aufnahme von Nährstoffen. Auf einer Falte sind zahlreiche Zotten angeordnet, deren zelluläre Barriere aus intestinalen Epithelzellen besteht. Die Epithelzellen entstehen aus Stammzellen, die am Kryptengrund liegen und zu absorbierenden Enterozyten, Paneth-Zellen, M-Zellen, schleimproduzierende Goblet Zellen und enterochromaffin Zellen ausdifferenzieren (Abbildung 2.1). Die Polarität der Zellen gibt den Stofftransport vor, der von der apikalen Seite, dem Darmlumen zugewandt, zur basolateralen Seite, einer Gewebsschicht (Lamina Propria) zugewandt in der Blut- und Lymphgefäße verläuft. Die Zellschicht ist überzogen mit einem Schleimfilm (Mucus), gebildet von den Goblet-Zellen, der eine erste mechanische Barriere darstellt.

Charakteristisch für den Gastrointestinaltrakt ist die Kolonisation von Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Archaeen, Viren), die Mikrobiota. Sie besteht vorrangig aus kommensalen Bakterien, deren Koexistenz als vorteilhaft für den Wirt definiert wird, weshalb die Interaktion als Mutualismus angesehen wird [14, 187]. Die Darmmikrobiota spielt eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der normalen Verdauung, da sie für den Wirt unverdauliche Polysaccharide abbauen kann und somit die Energiegewinnung aus der Nahrung und die Energiespeicherung begünstigt [52]. Ebenso trägt eine dichte Besiedlung der äußeren Mukusschicht dazu bei, dass potentielle Pathogene direkt gehemmt und verdrängt werden. Der Mucus besteht aus hochmolekularen vernetzten Glykoproteinen, dessen äußere Schicht eher lose gepackt ist und einen idealen Lebensraum für die Mikrobiota bildet [101]. Hingegen ist die innere Schicht sehr dicht gepackt, hat potentiell antimikrobielle Eigenschaften und schließt im Normalfall den Kontakt und das Eindringen von Mikroorganismen zur Epithelschicht aus. Zusätzlich produzieren Paneth-Zellen vom Krypten-Grund stetig α -Defensine und eine Vielzahl antimikrobieller Proteine. Die Regulation dieser spezialisierten sekretorischen Zelle erfolgt über bakterielle Signale, direkt durch *Toll-like receptor* (TLR) Aktivierung [217]. Die darmspezifischen immunologischen Mechanismen unterstützen die Aufrechterhaltung der Darmbarriere und stellen ein umfangreiches und komplexes System dar.

Das mukosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT) ist ein sekundäres lymphatisches Organ und beinhaltet weit mehr als der Hälfte aller Immunzellen. Die Schleimhaut ist eine permeable Barriere und stellt eine sensible Eintrittsstelle für Mikroorganismen dar. Weshalb die Immunfunktion an diesen Grenzflächen wesentlich der Aufrechterhaltung der Gesundheit des Menschen dient. Ein Mikrokompartiment stellt hierbei das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) dar, zudem die Peyer'schen Plaques (PP) gehören.

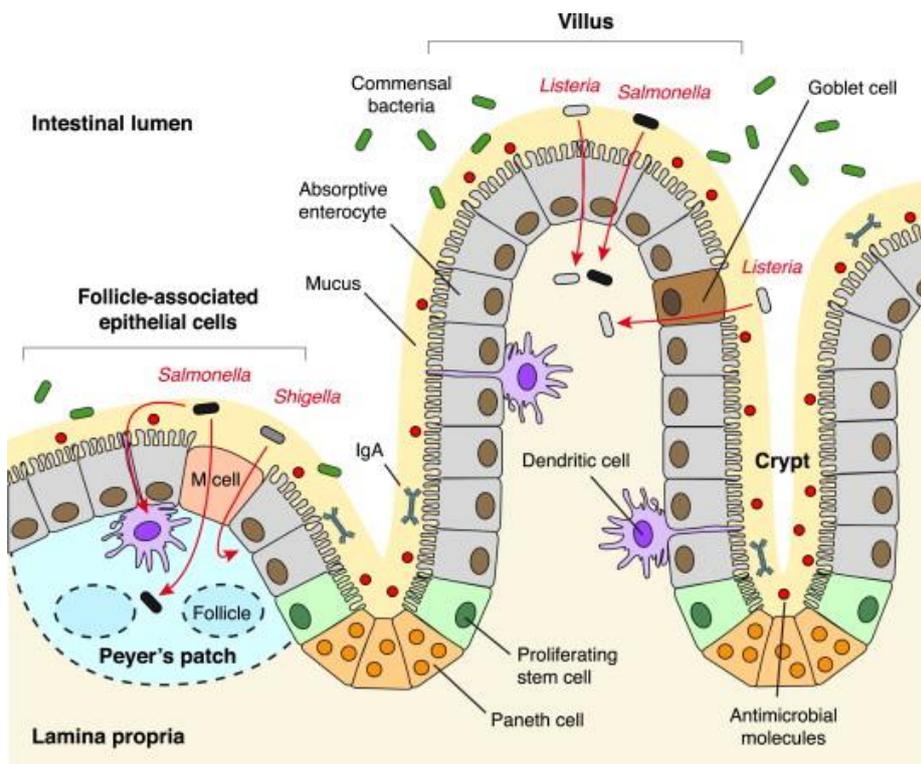


Abbildung 2.1: Morphologie der menschlichen Dünndarm-Schleimhaut und die immunologischen Schutzmechanismen

Die intestinalen Epithelzellen gliedern sich in absorbierende Enterozyten, schleimproduzierende Becherzellen (Goblet-Zellen), M-Zellen sowie proliferierenden Stammzellen und Paneth-Zellen in Darmkrypten. Ein Schleimfilm (Mucus) schützt das Epithel und sezerniert IgA und antimikrobielle Peptide, um die Besiedlung durch kommensale Bakterien oder Pathogene zu begrenzen. Die Peyer-Plaques gehören zum lymphatischen Gewebe und bestehen aus Lymphfollikel, M-Zellen und dendritischen Zellen, die kontinuierlich den Darminhalt prüfen. Paneth-Zellen am Boden von Krypten produzieren Lysozyme, Peptidasen, Laktoferrin und Defensine. Enteropathogene, wie *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* und *Salmonella* haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt um intestinale Barriere des Wirts zu überwinden. Abbildung ohne Änderung entnommen [172].

Die Peyer'schen Plaques erheben sich neben den Zotten aus den Schleimhäuten und nehmen aus dem Darmlumen Mikroorganismen und Antigene auf. Die Aufnahme aus dem Lumen erfolgt durch phagozytierende M-Zellen. Die potentiellen Antigene werden an die darunterliegenden Dendritischen Zellen (DCs) weitergegeben und den T-Zellen präsentiert. Eine Antigenaufnahme erfolgt ebenso direkt von DC, deren Fortsätze zwischen Epithelzellen ins Lumen ragen, ohne dabei die engen *tight junction* Verbindungen und die Barrierefunktion der Epithelzellen zu stören. Aktivierte T- und Antigen-präsentierende Zellen (APC) erreichen über Lymphgefäße die Lymphknoten und wandern von dort ins Blut zurück zu den Schleimhäuten. Bei einer lokalen Infektion wird so garantiert, dass alle Schleimhäute einen generalisierten Schutz erhalten. Das GALT fungiert als eine immunologische Kontrollstation, die zwischen effektiver Abwehrreaktion und einer Toleranzentwicklung je nach Vorhandensein von proentzündlichen versus antientzündlichen Signalen entscheidet. Besonders wichtig ist eine mukosale Toleranz gegenüber der Mikrobiota, andernfalls kommt

es zur Entstehung chronischer Entzündungen wie Morbus Crohn [171]. Im Normalfall erfolgt die Aufnahme von ungefährlichen Antigenen, die nicht in der Aktivierung proentzündlicher Immunmechanismen münden. So werden in einem antientzündlichen Milieu Toleranzmechanismen induziert wie das Differenzieren von antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen (Treg), die in Blut, Lymphe und Gewebe zirkulieren. Bei erneuter Bindung der Treg an ihr spezifisches Antigen, kommt es zur Aktivierung und führt zur Sekretion von entzündungshemmenden Zytokinen. Nicht nur die zelluläre auch die humorale Immunantwort im Darm ist stark regulierend und neutralisierend. So differenzieren B-Zellen, vorrangig in den PP, zu IgA sekretierenden Plasmazellen. Das sekretorische IgA (sIgA) kommt auf den äußeren Oberflächen des Menschen wie der Schleimhaut und apikal im Darmlumen vor. Die IgA-Bildung erfolgt in Plasmazellen und wird durch die Epithelzellen hindurch nach außen ins Lumen geschleust. Die Bindung an Antigene verläuft nicht komplementaktivierend. Mögliche Mechanismen sind die Bindung und Verhinderung der Aufnahme von mikrobiellen Antigenen sowie deren Zerstörung und Agglutination als auch die Neutralisierung von pathogenen bakteriellen Toxinen [238]. Die Gesamtheit der defensiven Mechanismen zeigt, dass primär die Aufrechterhaltung einer geschlossenen Epithelbarriere gewährleistet werden muss, was durch eine Entzündungsreaktion im Gewebe gefährdet ist.

2.2.2. Pathogenerkennung und Aufrechterhaltung der Epithelbarriere

Die Immunantwort auf Mikroorganismen oder Antigene entlang der Schleimhaut stellt entweder eine effektive Abwehrreaktion oder eine Toleranzentwicklung dar. Ausschlaggebend dabei ist das Vorhandensein von proinflammatorischen oder antiinflammatorischen Signalen. Doch wie werden Pathogene als Gefahr erkannt?

Eine Erkennung erfolgt anhand von Oberflächenmolekülen der Mikroorganismen, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), welche hoch konserviert und relativ breit exprimiert sind. Das angeborene Immunsystem erkennt diese evolutionär konservierten Strukturen mithilfe von *pattern recognition receptors* (PRR). Bei Bakterien dienen bspw. Zellwandbestandteile als PAMP, welche von membranständigen PRRs gebunden werden und eine proinflammatorische Reaktion auslösen. In der Wirtszelle werden Signalkaskaden aktiviert, welche letztlich zur Genexpression und Synthese zahlreicher Moleküle führen, darunter Zytokine, Chemokine, Zelladhäsionsmoleküle und Immunrezeptoren, die zusammen die frühe Wirtsantwort auf eine Infektion darstellen [1]. Je nach Mustererkennungsrezeptor können unterschiedliche PAMPs, sowohl extra- als auch intrazellulär gebunden werden. Ihre Bindung ist nicht auf eine Art von Mikroorganismen beschränkt, vielmehr werden verschiedene PAMPs eines bestimmten Erregers erkannt, wodurch eine schnelle und verstärkte Entzündungsreaktion gewährleistet werden kann. Zu den PRRs gehören membranständige *Toll-like receptors* (TLR), die auf der Zelloberfläche zur extrazellulären Detektion als auch intrazellulär auf dem Endosomen (ins Cytosol gerichtet) exprimiert werden. Ihre Erkennungsstrukturen sind primär Lipide, wie LPS (gramnegative Bakterien), Lipoteichonsäuren (grampositive Bakterien) und Peptidoglykane als auch Nukleinsäuren wie

dsRNA, ssRNA und CpG DNA [1]. Die Bindung von Nucleinsäuren wurde erst später TLRs zugeschrieben, so erkennt TLR9 unmethylierte CpG DNA freigesetzt aus Bakterien und Viren [88]. In nachfolgenden Studien wurde ebenso eine TLR-unabhängige Detektion von PAMPs durch cytosolische PRRs aufgedeckt, über NOD (*nucleotide binding and oligomerization domain*)-ähnliche Rezeptoren (NLRs) und RIG (*retinoid acid-inducible gene 1*)-ähnliche Rezeptoren (RLRs) [107]. Cytosolische PRRs zeigen, dass intrazelluläre Erreger, die sich der extrazellulären Überwachung durch TLRs entziehen, auf eine zweite cytosolische Erkennung im Wirt stoßen. PRRs kommen besonders häufig auf Zellen des angeborenen Immunsystems vor, hierzu zählen Makrophagen, DCs und B-Zellen. Wobei ihr Vorkommen auf nicht-hämatopoetischen Zellen weniger verbreitet ist. Insbesondere für die Schleimhäute wurde eine gewebespezifische veränderte TLR-Expression auf Zelltypen festgestellt, induzierbar und regulierbar, als Reaktion auf Entzündungsmediatoren, wobei viele Aspekte bislang wenig charakterisiert wurden [116, 155].

Der Darm wird als assoziiertes Immunsystem beschrieben, an dem sich immunregulatorische Mechanismen sowohl gegen Krankheitserreger verteidigen als auch Toleranz gegenüber aufgenommenen Antigenen vermitteln, um die Homöostase des Gewebes zu erhalten. Die Epithelzellen übernehmen hierbei eine wichtige Funktion, bei der Kommunikation zwischen Immunzellen, Darmepithelzellen und Mikrobiota [105]. Sie besitzen ähnlich wie Makrophagen eine Reihe von PRRs, die bei Bindung bakterieller Strukturen Signalkaskaden aktivieren. So wird durch konstitutive Expression von TLRs an der basolateralen Epithelzellschicht eine Erkennung von invasiven Pathogenen oder Bakterien, die durch einen Bruch in der Zellbarriere eingedrungen sind, gewährleistet. Allerdings werden Bakterien auf der luminalen Seite der Epithelzellschicht nicht ignoriert, auch hier befinden sich spezifische TLRs. So bewirkt die luminal Detektion von kommensalen Bakterien eine IgA Produktion und Freisetzung ins Lumen, wo sIgA die erste Verteidigungslinie darstellt, indem das Anhaften von Bakterien an der Schleimschicht unterbunden wird [29, 139]. Dennoch führen die Signale von apikalen TLRs nicht zu einer proinflammatorischen Antwort. Begründet ist diese ungewöhnliche Antwort in der speziellen Funktion des intestinalen Gewebes, dass der Aufrechterhaltung von Homöostase dient. Daher ist es sinnvoll, dass es mehrere Mechanismen gibt, um die TLR-Aktivierung zu verhindern oder zu unterdrücken. Der TLR9 bindet bakterielle DNA und löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung des Nuklearfaktors κ B (NF- κ B) führt, der sich in den Zellkern verlagert und dort die Transkription von proinflammatorischen Genen fördert [72]. Allerdings wurde nachgewiesen, dass kommensale Darmbakterien diese Entzündungsreaktion dämpfen. Hierbei wird der Transport von NF- κ B hin zum Nucleus verhindert indem es ins Cytoplasma umgeleitet wird, was direkt durch nicht-pathogene Bakterien erfolgt und eine antagonistische Wirkung erzielt [113]. Bei einem Überwachsen der Epithelzellschicht von pathogenen Bakterien ist kein Antagonist in der Zelle vorhanden und es wird die NF- κ B Aktivierung ausgelöst.

Die Kommunikation zwischen Epithelzellen und den darunterliegenden DCs erfolgt kontinuierlich, um zu gewährleisten das Mikrobiota und Epithelzelle korrekt interagieren.

Nehmen DCs Antigene auf, entscheidet das Mikromilieu, ob eine Reaktion erfolgt oder nicht. Das Mikromilieu beschreibt eine Sammlung an Mikroorganismen und Antigenen aus dem Darmlumen auf, die einen Normalzustand definieren. So werden von kommensalen Bakterien konstitutiv biologische Signale aufgenommen, die ein normales Mikromilieu darstellen. Dabei bleibt die Aktivierung der mukosalen Immunzellen auf einem niedrigen, aber nicht unempfindlichen Niveau, welches als physiologische Entzündung bezeichnet wird [73]. Im Falle einer bakteriellen Invasion sind intestinale DCs nicht in der Lage entzündlich zu reagieren. Stattdessen bedarf es einer effizienten Entzündungsreaktion durch Monozyten, die aus dem lymphatischen Gewebe einwandern und in einem proinflammatorischen Mikromilieu zu aktiven DCs ausdifferenzieren [59]. Diese doppelte Absicherung gewährleistet, dass keine unnötige Entzündungsreaktion ausgelöst wird, die einhergeht mit Zellzerstörung und einer Unterbrechung der Barriere für Mikroorganismen.

Darmepithelzellen bilden die erste physikalische und immunologische Verteidigungslinie gegen invasive Krankheitserreger, wobei die physiologisch verträglichen Stimulationssignale durch die kommensale Mikrobiota unerlässlich sind [187]

2.3. Pathogen-Wirts Interaktionen

2.3.1. Pathogenese von *Salmonella*- enteritische Salmonellose

Salmonellen gelangen meistens durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln in den Menschen, passieren den Magen und gelangen in den Dünndarm. Wie zuvor beschrieben stellt der Dünndarm ein nährstoffreiches Habitat dar, in dem Bakterien sich ansiedeln können. Dennoch müssen sie sich hier gegen die unspezifische Wirtsabwehr (Mucus, sIgA, antimikrobielle Peptide) und die Mikrobiota schützen. Daher gelangt normalerweise nur ein kleiner Teil der Salmonellen zur Epithelschicht, wohingegen der Großteil wieder ausgeschieden wird. Um die Mukusschicht zu überwinden, muss das hochmolekulare Netz aus Glykoproteinen abgebaut werden. Da Epithelzellen von einer Glykokalyxschicht geschützt sind, worunter die Rezeptoren verborgen liegen, bedarf es spezieller Mechanismen, um diese für die Bakterien zugänglich zu machen. Hierfür werden Glykosidasen von einer Vielzahl der Darmbakterien eingesetzt wie auch von Salmonellen [9, 196]. Dadurch wird eine erste Adhärenz an die Zellschicht gewährleistet und weitere direkte Rezeptorbindung eingeleitet. Die Adhäsion wird dabei über nicht-Fimbrien Adhäsine wie SiiE und Bap, Autotransporter Adhäsine wie ShdA, MisL und SadA (SEN3513) oder Fimbrien (Fim, Lpf, Saf, Pef etc.) vermittelt [79, 127].

Salmonella nutzt mehrere Strategien für die aktive Invasion in nicht-phagozytierende Zellen, die eine Umlagerungen von Wirts-Aktin auslöst und dadurch ihren Eintritt in die Wirtszellen ermöglichen. Die prominenteste Rolle übernimmt der *trigger-like* Mechanismus. Die Bakterien umgehen die Interaktion mit einem Membranrezeptor, indem das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS)-1 aktiviert wird [69, 136, 164]. Kodiert ist dieser Bereich auf der *Salmonella pathogenicity island 1* (SPI-1), welche neben dem T3SS, Effektoren, regulierende

Komponenten und ein Eisen-Aufnahmesystem (*sit*) beinhaltet. SPIs sind definiert als große Genkassetten innerhalb des *Salmonella*-Chromosoms, die Faktoren kodieren, die für spezifische Interaktionen mit dem Wirt verantwortlich sind und die spezifische Virulenz-Merkmale verleihen [78]. Der Aufbau des T3SS erinnert an eine molekulare Nadel, welche in der Bakterienmembran verankert ist und in die Wirtsmembran eindringen kann [41, 94]. Daraufhin werden zahlreiche Effektoren intrazelluläre in den Wirt injiziert, die zu einer großflächigen Cytoskelett Umlagerung, dem *membrane ruffling* führen und die Invasion in den Wirt ermöglichen. Effektoren sind sowohl die Aktin-Binder *sipA-D*, dessen Abkürzung für *Salmonella invasion protein* steht als auch GTPase-Binder *sopB/E2* (*Salmonella outer protein*), die in der Gesamtheit zu einer Cytoskelett-Reorganisation führen, so dass folglich das Bakterium mit Hilfe von Makropinozytose aufgenommen wird [117, 231]. Der Knockout des T3SS Systems führt dabei nicht zu einem vollständigen Verlust der Invasivität von *Salmonella*, da es weitere Mechanismen gibt, die dem Pathogen ermöglichen den Wirt zu infiltrieren. Hierzu zählt der Rezeptor-vermittelte *Zipper-like* Mechanismus, welcher hauptsächlich für die Invasion durch Yersinien und Listerien verantwortlich ist [42, 170]. Über die Bindung eines zellulären Transmembranrezeptors erfolgt wie beim Trigger-Mechanismus eine Reorganisation des Wirts-Aktin Cytoskeletts was zu einer stimulierten Internalisierung führt. In Salmonellen wurde ähnlich zum Invasin von *Yersinia spp.* das Membranprotein Rck identifiziert, welches auf einem Virulenzplasmid kodiert ist [82, 176]. Wiederrum ist Rck in *Salmonella* schlecht exprimiert und die Deletion von *rck* hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Invasion von Wildtyp oder SPI-1 Mutanten [176]. Es wurde kürzlich herausgefunden, dass der Rezeptor für Rck der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ist, welcher meist basolateral auf Darmepithelzellen vorkommt, weshalb vermutet wird, dass der Rck-Signalweg relevant ist, wenn Salmonellen das Epithel durchquert haben [229]. Es gibt noch weitere Gene, deren Deletion einen Defekt bei der Invasion verursachen, bei denen aber eine direkte Rolle im Invasionsgeschehen fehlt oder unzureichend belegt ist. Hierzu zählt das Adhäsin SiiE, welches auf der SPI-4 kodiert ist, durch die SPI-1 Expression reguliert wird und an Sialinsäure von Glykoproteinen bindet [151, 223]. Obwohl es für eine effiziente Invasion erforderlich ist, reicht SiiE nicht aus und benötigt stattdessen SPI1-vermittelte *membrane rufflings*. SiiE wirkt wahrscheinlich unterstützend, fördert die Bindung von Salmonellen an die apikale Oberfläche polarisierter Zellen und verbessert die Translokation des SPI1-T3SS. Ein weiteres Beispiel ist TolC, ein äußerer Membrankanal, der am Export von Toxinen und Multidrug-Efflux beteiligt ist. Die Deletion von *tolC* führt zu einer Verringerung der Invasionseffizienz, allerdings ist dies begründet in einer abgeschwächten Expression von SPI-1 im *tolC*-Mutant [226], was das Invasionsdefizit erklärt.

Zusammenfassend für nicht-phagozytierenden Zellen wie intestinale Epithelzellen ist SPI-1 entscheidend für die Aufnahme in den Wirt, wobei das Expressionslevel der SPI1-assoziierten Gene eng mit der Invasivität in Verbindung steht. Im Gegensatz dazu sind phagozytierende Zellen wie M-Zellen und Dendritische Zellen der apikalen Schleimhaut für Bakterien ein besonders attraktives Ziel, da sie einen erleichterten Eintritt in die Schleimhaut zulassen [100, 182]. Nachdem die Schleimhaut-Barriere passiert wurde, können Salmonellen auch die

Immunzellen der Lamina Propria als eine intrazelluläre Nische nutzen. Für phagozytierende Zellen ist SPI-1 und insbesondere T3SS-1 nicht relevant und führt bei Deletion zu einer verzögerten Entzündungsreaktion mit gleicher systemischer Ausbreitung [154, 180].

Für das fakultative intrazelluläre Überleben bilden Salmonellen ein einzigartiges membranumschlossenes Kompartiment, die sogenannte *Salmonella containing vacuole* (SCV), aus (Abbildung 2.2). Solch eine bakterien-assoziierte Vakuole wird auch von anderen intrazellulären Pathogenen wie *Legionella pneumophila*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Chlamydia trachomatis* genutzt, um mindestens eine kurze Zeit darin zu verbleiben [19, 45].

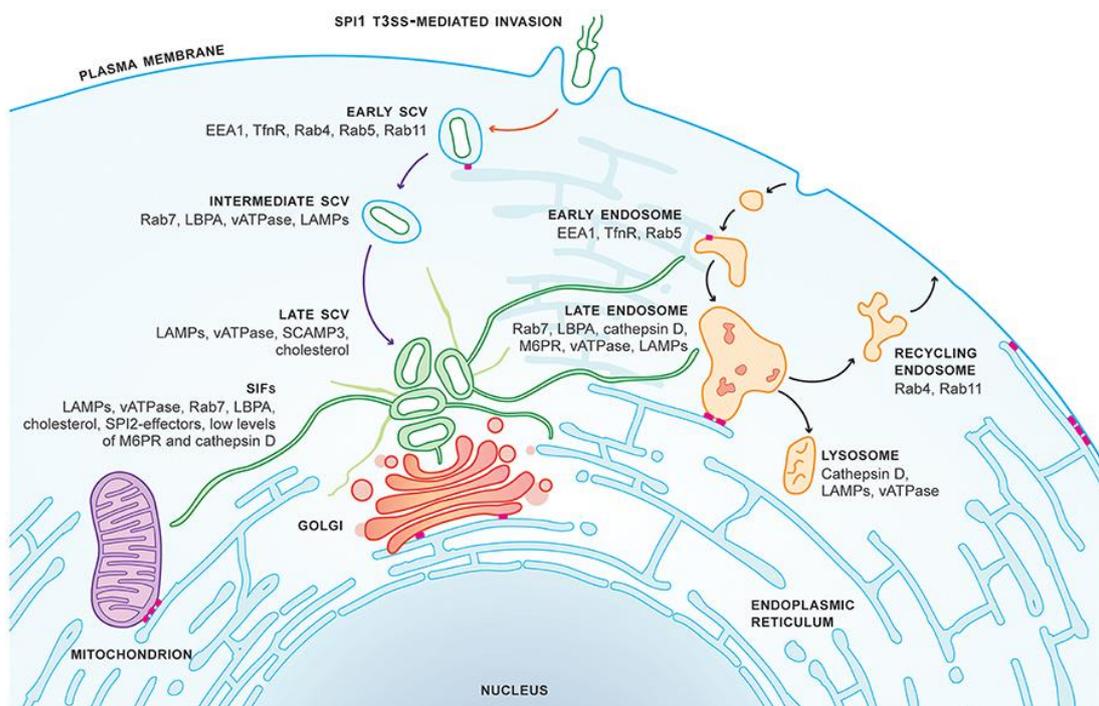


Abbildung 2.2: Salmonella Invasion und SCV-Reifung und SIF-Biogenese in Epithelzellen

Salmonella spp. dringt in Epithelzellen SPI-1-T3SS-abhängig ein und bleibt spezifisch in der *Salmonella*-containing vacuole (SCV) innerhalb der Wirtszelle. Die Bildung des frühen SCV ist von SPI1-T3SS-sekretierten Effektoren abhängig (roter Pfeil) und erfolgt innerhalb von 30 min p. i. Die SCV-Reifung ist abhängig von SPI2-T3SS-sekretierten Effektoren (violette Pfeile) und ist abgeschlossen im späten SCV 4-5 h p.i. Die Endosomenreifung (schwarze Pfeile) wurde parallel dazu aufgezeigt, da *Salmonella* bestimmte Marker des Endosomalen System ausnutzt aber Lysosomale Marker unterdrückt. Das SCV befindet sich im späten SCV Stadium in Nucleus- bzw. Golgi-nähe und ist begleitet von der Bildung von *Salmonellen*-induzierten Filamenten (SIFs, grüne Tubuli). SIFs bilden ein ausgedehntes Netzwerk in der gesamten Wirtszelle, das die Interaktion mit den Wirtsorganellen erleichtert. Das tubuläre endoplasmatische Retikulum-Netzwerk (blaue Tubuli) bildet multiple contact sites (MCSs, rosa Balken) mit Organellen, der Plasmamembran und dem frühen SCV. Abbildung ohne Änderung entnommen [120].

Nach Abschluss der *Salmonella*-induzierten Endozytose werden die ersten 30 min *post infection* (p. i.) als Frühstadium der SCV Biogenese bezeichnet. Der intrazelluläre Stimulus führt zu einer positiven Regulation von SPI-2 und einer negativen Regulation von SPI-1 und assoziierten Genen [23]. Es erfolgt die Umwandlung von Endosomen zu SCV, die über ein SPI-2 kodiertes Typ-III-Sekretionssystem (T3SS-2) und translozierte Effektoren vermittelt wird, indem sie aktiv in den endozytischen Transportweg eingreifen [203, 204]. Hauptsächlich durch das Wechselspiel zwischen SPI-1- und SPI-2- Effektoren wird die Wirtszell-Invasion und die Aufrechterhaltung der intrazellulären Nische ermöglicht [145]. Die Biogenese des SCV kann in drei Abschnitte p. i. gegliedert werden Früh- (< 0,5 h), Zwischen- (0,5-5 h) und Spätstadium (> 5 h) [203, 204]. Das SCV der Frühphase ähnelt einem frühen Endosomen, welches typische Marker trägt, wie dem Transferrin-Rezeptor und GTPasen Rab4, 5 und 11, welche an Sortierungsprozessen und Umlagerungen mit anderen endosomalen Membrankompartimenten beteiligt sind [204]. Allerdings werden diese Marker schnell wieder durch die Reifung des SCV und dem Erwerb von Markern wie Rab7, *lysosomal associated membrane proteins* (LAMPs) 1, 2 und 3 und vATPase ersetzt [204]. Nach ungefähr 5 h p. i. ist die Reifung zum Spätstadium der SCV abgeschlossen und Salmonellen beginnen sich im SCV zu vermehren begleitet von der Ausbildung von *Salmonella-induced filaments* (Sifs) [97]. Mehrere T3SS-2-Effektoren wie SifA, SseJ, SopD2, PipB2, SseF, SseG, SpvB, and SteA regulieren die Ausbildung des Sif-Phänotypen. Alle acht dieser Effektoren tragen gemeinsam zu mindestens einer oder mehreren der folgenden Rollen innerhalb der Wirtszelle bei: SCV-Reifung und Stabilität, perinukleare Positionierung des SCV, Vakuolen-Integrität, SIF-Bildung und Regulierung der Mikrotubuli-Motoraktivität an der SCV-Membran, die für die Verlängerung von SIFs entlang von Mikrotubuli erforderlich ist [120, 239]. Diese selektiven Wechselwirkungen verändern den Transport der SCV so, dass die toxischen Effekte der Lysosomen- Verschmelzung vermieden und gleichzeitig eine konstante Wechselwirkung mit dem endosomalen System der Wirtszelle aufrechterhalten wird, die eine Ausdehnung und Nährstoffaufnahme ermöglichen [132, 197]. Bildlich stellen SIFs ein miteinander verbundenes röhrenförmiges Netzwerk dar, welches vom Wirt endozytotisch aufgenommene Stoffe in das Rohrnetz leitet und somit den Salmonellen innerhalb des SCV zur Verfügung stellen. Die Ausprägung von SIFs wurde vorrangig in HeLa Zellen beschrieben, aber eine Ausbeutung des endosomalen Systems erfolgt ebenso bei phagozytierenden Zellen. Daher wurde die Hypothese gestellt, das SCV-Salmonellen Wirtsnährstoffe durch eine Ausbeutung bzw. *endosomal remodeling* gewinnen indem die Fusion mit Endosomen/Lysosomen erfolgt, die degradierte Makromoleküle enthalten [132].

Die intrazelluläre Bewegung der SCVs und die Ausbreitung der SIFs wird über das Wirt-Cytoskelett vermittelt, hierfür interagieren Salmonellen mit den Motorproteinen des Cytoskeletts. So erfolgt im SCV Früh-Stadium die Bewegung hin zum Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC), welches sich Nucleus-nah befindet ebenso wie Golgi-Apparat und Endoplasmatische Retikulum (ER). Vom MTOC, indem die Minusenden der Mikrotubuli verankert sind, strahlen Mikrotubuli in die Zelle aus, um die Grundorganisation des Cytoplasmas einschließlich der Positionierung der Organellen zu gewährleisten. Das

Cytoskelettfilament, Aktin, bildet primär ein engmaschiges Netzwerk am zellulären Cortex, wodurch es die Plasmamembran unterstützt und stärkt. Beispielsweise werden neu gebildete endozytische Vesikel von der kortikalen Region zum Endosomen transportiert. Dabei wechseln sie von der Aktin- zur Mikrotubuli-basierten Bewegung. Das primäre Motorprotein der Mikrotubuli, dieser zum Minus-Ende gerichteten Bewegung, ist Dynein [75]. Die Bewegung des frühen SCV in Richtung Nukleus erfolgt über Myosin II entlang der Aktinfilamente und wird durch SopB (SPI-1 Effektor) vermittelt [225]. Die Aufrechterhaltung der SCV-Positionierung im perinuklearen Bereich wird durch verschiedene SPI-2 T3SS-Effektoren vermittelt, die die motorische Aktivität der Mikrotubuli am SCV beeinflussen. Hierzu wurde beschrieben, dass SseF und SseG Dynein rekrutieren und PipB2 und SifA Kinesin. Die Bewegung zur Plasmamembran wird mittels PipB2 über Kinesin-1 vermittelt [203] wofür SifA einen Komplex mit dem Wirtspotein SKIP (SifA- und Kinesin-interagierendes Protein) eingeht. Diese Bindung der SCV-Oberfläche mit Mikrotubuli-Filamenten initiiert die Sif-Ausläufer [83, 207, 239]. Das Gleichgewicht sowohl der Plus- als auch Minus-Ende gerichteten Mikrotubuli-Motoren am SCV ist essentiell, um dessen Positionierung und Stabilität zu kontrollieren [225]. Auch SifA ist essentiell zur Aufrechterhaltung der SCV Membran und Sif-Biogenese, so wurde gezeigt, dass SifA exprimierende Bakterien nicht in das Cytosol entweichen und von einer LAMP1-positiven SCV umgeben bleiben [239].

Ebenso gibt es Salmonellen, die der ursprünglichen intravakuolären Population entfliehen und ins Cytosol übergehen, wobei diese sich mit deutlich erhöhter Geschwindigkeit im Vergleich zur SCV-Population vermehren [33]. Die sogenannte Hyperreplikation im Cytosol wurde alleinig in polarisierten Epithelzellen berichtet, in denen sie mit Zellextrusion und dem entzündlichen Zelltod (Pyroptose) korrelierte [119]. Es scheint ein vom Wirtszelltyp abhängiges Merkmal darzustellen. Diese Form des induzierten Zelltods ist vom Pathogen gewollt, da zum Beispiel in enteritischen Infektionen, es primär zu einer Infektionsausbreitung über einen größeren Bereich im Darmlumen kommt. Salmonellen induzieren eine verstärkte Entzündungsreaktion im Wirtsgewebe wodurch die Zellen platzen und das Pathogen, welches sich intrazellulär vermehrt hat, sekundäre Zellen infizieren kann. Die lokale Inflammation kennzeichnet sich durch eine Störung des Wasser-, Elektrolyt- und Proteinhaushaltes durch permanenten Ausfluss, was zu Durchfall mit Fieber und Erbrechen führt. Allerdings bleibt der Infektionsverlauf meist aufgrund erfolgreicher Abwehrmaßnahmen des Wirtsimmunsystems (GALT) auf den Darm beschränkt. Wiederrum geht die erfolgreiche Besiedlung phagozytierender Zellen in der Lamina Propria mit einem schnellen Fortschreiten der *Salmonella*-Infektion einher. In den professionellen Immunzellen wird die SPI-1 und SPI-2-vermittelt Apoptose aktiv durch Salmonellen eingeleitet, wodurch eine systemische Ausbreitung erfolgen kann.

2.3.2. Aktuelle Forschung

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen die Pathogene befähigen Krankheiten in Menschen und Tieren auszulösen wurden zahlreiche Studien sowohl *in vivo* als *in vitro* durchgeführt. *In vitro* Zellkulturmethoden ermöglichen zusätzlich zu komplexen Tiermodellen eine Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Wirt zu untersuchen. Hierbei erlauben die fortschreitenden Techniken in Genomik, Transkriptomik und Proteomik zunehmend mehr Möglichkeiten, um die potentielle Rolle verschiedener Gene und Wechselwirkungen in der Pathogenese aufzuklären. Es wurden zahlreiche Modelle etabliert, die unterschiedliche Aspekte während der Pathogenese beleuchten. Zum einen können die Reaktionen der Wirtszelle, zum anderen die Reaktion des Pathogenes auf seinen Wirt oder vielmehr seine Anpassungsfähigkeit und Spezifität gegenüber Zellen, untersucht werden. Im Wirt sind zum Beispiel besonders Zellsignalwege interessant, die anhand von *Kinase Profiling*, Aufschluss über phosphorylierungsvermittelten Wirtssignale bei Wirts-Pathogen Interaktionen mittels Massenspektrometrie (MS) geben. Hierbei ist das Verständnis der molekularen Mechanismen spezifischer Wirts-Pathogen-Wechselwirkungen nützlich, um deren Potenzial für die Entdeckung von neuen Zielstrukturen für präventive oder therapeutische Anwendungen zu untersuchen [28, 173].

Besonders der erste Kontakt zur Körperoberfläche, meist die Epithelbarriere, stellt ein interessantes Modell für neue Therapieoptionen dar. Hierfür wurden auch weitere wichtige Faktoren, wie die Mikrobiota aufgenommen, die einen Einfluss auf die Adhäsion von pathogenen Bakterien haben [115, 238]. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Mikrobiota-Metabolit Indol zu einer Hemmung der Salmonellenvirulenz und Kolonisation führte und eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Anfälligkeit des Wirtes für pathogene Infektionen im Gastrointestinaltrakt spielen könnte [121]. Ebenso werden immer häufiger duale Analysen durchgeführt, die simultan Wirt- und Pathogen-Genexpression untersuchen. Hierbei wurden small RNAs von *Salmonella* identifiziert, die zu einer Veränderung in der Kodierung von Transkripten des Wirts führten [228]. Eine weitere Analyse zeigte, dass der Abbau der Wirts-Glykokalyx bei einer Salmonellen-Infektion zu einer *de novo* Produktion von Polysacchariden und folglich zu einem anderen Glykosylierungsmuster der Wirtszelle führt [9]. Weiterhin wurde für Flagellin von *S. Enteritidis* eine unterschiedliche Reaktion des TLR5 aus der Maus, dem Menschen und dem Huhn berichtet [112]. Dies zeigt Spezies-spezifische Unterschiede bei der Verarbeitung zellulärer Signale auf Flagellin eines identischen Erregers. Ebenso wurde kürzlich gezeigt, dass zur Untersuchung von intrazellulären Mechanismen, wie dem *Salmonella*-Übergang von SCV zum Cytosol, die Untersuchung einzelner Zellen entscheidend ist, da auch die Entwicklung intrazellulärer Salmonellenpopulationen unterschiedlich verlaufen kann und sich Subpopulationen ausbilden, die in globalen Untersuchungen nicht aufgefallen sind [33]. Bei der Bildung von Subpopulationen und Pathogen-Nachkommen im Wirt spielt eine schnelle Adaption eine wichtige Rolle [33, 118].

Unabhängig von naturgemäßen Wirts-Pathogen Interaktionen werden Salmonellen auch in der Krebs-Therapie eingesetzt, als *Bacteria-mediated cancer therapy* (BCT). Dabei sollen

Bakterien ins Tumorgewebe einwandern und sich dort vermehren, wodurch eine Infektionsreaktion ausgelöst und das Immunsystem gegen die stillen Tumore aktiviert wird. Solide Tumore haben universelle Eigenschaften einschließlich abnormaler Blutgefäße, hypoxischer und nekrotischer Regionen. Diese Mikroumgebungen eignen sich zur Besiedlung und Vermehrung fakultativ anaerober Bakterien wie *Salmonella* [241]. Die anaeroben Tumorkerne sind gegenüber Chemotherapie und Strahlung resistenter. Da Salmonellen sich dort bevorzugt vermehren, stellt dies einen Vorteil für die gezielte Immuntherapie dar. Die Bakterien sind einerseits virulenz-beinträchtigt, um die bakterielle Toxizität zu reduzieren andererseits ausreichend funktionell, um eine Tumorrückbildung zu induzieren. Bislang werden diese Modelle in Mäusen getestet und befinden sich in der präklinischen Studie, in der ein Eindringen von Salmonellen in Tumorkerne bestätigt werden konnte, was zu einem verlängerten Überleben führte [18].

2.4. Detektion von pathogenen Bakterien

In den letzten Jahren ist das Interesse an Open-Air Food-Markets und –Trucks immer größer geworden ebenso wie der Trend vorrangig rohe oder halbgegartete Speisen zu verzehren. Das Risiko einer Infektion durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel steigt hierbei erheblich aufgrund mangelhafter Kühlung, geringem Platz, simultaner Handhabung von Tierprodukten und Gemüse sowie nicht ausreichender Temperatur beim Garen. Um eine Verbreitung von lebensmittel-assoziierten Bakterien einzuschränken, ist die Analyse und Detektion ein essentieller Schritt. In Lebensmitteln erfolgt der Nachweis von Bakterien konventionell mikrobiologisch über Wachstum auf Agar-Platten und biochemische Tests. Die Kultivierung erfolgt in der Reihenfolge: Voranreicherung, Anreicherung, Nachweis und Bestätigung. Das Testergebnis liegt erst innerhalb von 72 Stunden vor [188]. Diese herkömmliche Methode ist zeitaufwändig und mühsam. Dennoch ist die Spezifität meist exzellent, wohingegen die Sensibilität ein großes Hindernis ist. Mittlerweile wurden elektrizitäts-unabhängige Inkubationssysteme und kalorimetrische Auslesesysteme entwickelt, damit auch in limitierten Laboren dieser Nachweis umgesetzt werden kann [6]. Die Notwendigkeit von schnelleren Nachweismethoden mit erhöhter Sensibilität führte zur Entwicklung Nukleinsäure-basierter, Biosensor-basierter und immunologischer Methoden.

Zu den Nukleinsäure-basierten Methoden zählen PCR-Methoden. Sie basieren auf der Vervielfältigung einer bakterien-spezifischen Zielsequenz über Primer und eine eindeutige Zuordnung trotz Mischpopulationen gewährleisten. Mit Hilfe von Multiplex-PCR können mehrere Zielgene gleichzeitig detektiert werden, was einen spezifischeren Nachweis als zur herkömmlichen PCR erlaubt. Nach der PCR werden die Amplifikate durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Kapillar-Elektrophorese kann eine erhöhte Sensitivität und Zeitersparnis gegenüber der konventionellen Visualisierung erreicht werden [221]. Heutzutage können fünf oder mehr Pathogene simultan detektiert werden [34]. Dies ist von Vorteil, da oftmals mehrere Erreger gleichartige Nährboden besiedeln können. Anhand der Lebensmittel oder Ursprungsorte können potentielle pathogene Erreger eingegrenzt werden. Die amerikanische

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) zählt *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* zu den häufigsten lebensmittel-assoziierten Bakterien.

Mithilfe der quantitativen PCR (qPCR) wird die Bildung von PCR-Produkten während der Reaktion kontinuierlich verfolgt, indem das Fluoreszenzsignal gemessen wird, das mittels spezifisch markierter Sonden oder interkalierender Farbstoffe erzeugt wird. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Menge der PCR-Amplifikate. Durch den Einsatz unterschiedlicher Fluorophore wird eine Untersuchung mehrerer Proben gleichzeitig ermöglicht. Die multiplex qPCR-Assays haben durch die fehlende post-PCR Aufbereitung ein weiteres Zeit- und Geld-Ersparnis, wodurch insgesamt eine bessere Automatisierung erfolgt und folglich viele kommerzielle Kits auf dem Markt verfügbar sind. Das DuPont™ Salmonella BAX® System erlaubt die Untersuchung von Lebensmitteln und Umweltproben auch für Laien. Das Fluoreszenzsignal, erzeugt durch amplifizierte DNA, wird vom BAX® System analysiert und auf dem Bildschirm für den Anwender als leichtverständliche Piktogramme mit positiv oder negativ dargestellt. Ein weiteres sehr einfacheres qPCR Kit ist foodproof® Salmonella Detection Kit (Biotecon Diagnostics). Beide Nachweisverfahren benötigen einen vorherigen Anreicherungsschritt, der die Dauer bis zum Ergebnis verlängert. Dennoch wird normalerweise innerhalb von 24 Stunden ein Nachweis erbracht, der bis zu 49 Salmonella Serovare unterscheiden kann [141].

Des Weiteren wurden isotherme Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden entwickelt, die sich nur geringfügig in der Sensitivität und Spezifität gegenüber herkömmlichen PCR-Methoden unterscheiden [236]. Ein großer Vorteil isothermer Methoden ist die Unabhängigkeit von kostenintensiven und unhandlichen Thermocyclern, welche bei der klassischen PCR Anwendung finden. Stattdessen genügt es bei einer isothermen Amplifikation, die Temperatur annähernd konstant zu halten. NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) ist ein einstufiger isothermer Prozess zur Amplifikation von RNA und kann zum Nachweis von viraler und bakterieller RNA eingesetzt werden. Ebenso ist eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Bakterien denkbar. Heutzutage wird es vorrangig als real-time NASBA eingesetzt, was eine Detektion nochmal beschleunigt wie im Nuclisense® EasyQ® (bioMérieux) [240]. LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) ist eine Methode, die eine DNA-Polymerase mit Strangverdrängungsaktivität und vier bis sechs spezifischen Primern erfordert. Die Amplifikate sind Stem-Loop-DNA-Strukturen mit mehreren invertierten Wiederholungen des Targets und *cauliflower*-ähnlicher Struktur mit mehreren Loops [157]. Die Handhabung ist, abgesehen vom einmaligen Primerdesign, relativ einfach wie beim Loopamp™ Salmonella Detection Kit (Eiken Chemical).

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Biosensoren, wobei SPR (surface plasmon resonance) und MALDI-TOF am weitesten verbreitet sind. Letzteres wird vorrangig für klinische Zwecke eingesetzt, anstelle von Lebensmittelproben werden mikrobielle Zielkolonien aus Blut, Biopsien, Wunden und Stuhlproben gewonnen [190]. SPR und MS bieten beide sehr hohe Sensitivitäten, sind aber mit erheblichen Anschaffungskosten verbunden und auf eine Laborumgebung angewiesen. Insbesondere tragbaren Biosensoren für den Erregernachweis in

Lebensmittelproben sind eine interessante Alternative [38]. So wurde ein hoch amplifizierter, auf Nanokristallen basierender, bio-barcodierter elektrochemischer Immunsensor für den gleichzeitigen Multiplex-Nachweis von Lebensmittelpathogenen entwickelt [222]. Weiterhin existiert ein voltametrischer Sandwich-Immunsensor mit Meerrettich-Peroxidase-Nanosilica-bestäubten mehrwandigen Kohlenstoff-Nanoröhrchen zur Signalverstärkung [209]. Diese Immunsensoren korrelieren gut mit Ergebnissen des konventionellen ELISA, wobei spezifische Antikörper als Biorezeptoren häufig in Biosensoren eingesetzt werden. Die Kommerzialisierung von Biosensoren erfolgt langsamer als andere schnelle Methoden, was auf verschiedene Faktoren wie Kostenbetrachtung, Qualitätssicherung, Stabilitätsprobleme, Sensitivitätsprobleme und Instrumentierung zurückzuführen ist.

Die immunologischen Methoden kennzeichnen sich durch eine einfache Handhabung und geringer Probenaufbereitung. Der Nachweis lebensmittelbedingter Krankheitserreger und Toxinen erfolgt meist mit dem *Enzym-linked Immunosorbent assay* (ELISA) und Lateral Flow Immunoassay (LFI). Hierbei repräsentiert der ELISA die häufigste verwendete immunologische Methode, insbesondere der Sandwich-ELISA. Aufgebaut aus zwei Antikörpern ist es sehr effektiv und kommerziell z. B. von Biotec Salmonella ELISA Test [24] bzw. BacSpec™ (Eurofins) erhältlich. Durch die Entwicklung eines automatisierten Hochdurchsatzsystems wie das VIDAS (bioMérieux) und EIA (BioControl), wurde dem vergleichsweise hohen Arbeitsaufwand und der Durchführung von geschultem Laborpersonal entgegengewirkt. Deren Bedienung ist für Laien geeignet und die Interpretation der Ergebnisse erfolgt durch das System und wird für den Anwender als leichtverständliche Piktogramme mit positiv oder negativ dargestellt. Darüber hinaus gibt es Ansätze die zur Optimierung beitragen, beispielsweise durch Erhöhen der Antikörperdichte, um einen sensitiveren Nachweis zu ermöglichen sowie die Entwicklung neuer Antikörper. Die Probenaufbereitung zur initiale Anreicherung der Bakterien vor allem bei festen Lebensmitteln ist für alle ELISA Verfahren notwendig. Dementsprechend ist die Kopplung von ELISA mit immunmagnetischen Separations- oder Konzentrationsmethoden nützlich [224].

Der Lateral Flow Test (LFT) ist ein einfach zu bedienendes Hilfsmittel, mit dem das Vorhandensein oder Fehlen eines Analyten (Krankheitserreger oder Biomarker) nachgewiesen werden kann. Der bekannteste Typ des Lateral Flow Schnelltests ist der Schwangerschaftstest [32]. Das Prinzip eines LFT basiert auf der kapillaren Bewegung einer flüssigen Probe durch einen polymeren Streifen mit anhaftenden Molekülen, die mit dem Analyten interagieren und ein Signal liefern, das visuell erfasst werden kann. Die LFTs zeichnen sich durch geringe Kosten, Langzeitstabilität, Anwenderfreundlichkeit und kurze Nachweiszeiten aus. Kommerzielle LFT-Tests sind für Pathogene aber auch für Allergiker erhältlich wie Reveal® (Neogen) oder Duopath® (Merck) und viele weitere. Ebenso ist die Detektion von DNA möglich, indem ein Nachweis von Amplikons, die während der Polymerase-Kettenreaktion gebildet werden, visualisiert werden [114]. LFIs sind vorrangig für Stichproben oder Einzelpersonen (Point-of-care) gedacht und weniger für ein Hochdurchsatzsystem.

Jede der genannten Methoden hat seine Vor- und Nachteile. Selten kombiniert eine Methode sämtliche positiven Aspekte wie Schnelligkeit, geringe Kosten, einfache Handhabung und hohe Sensitivität und Spezifität. Daher finden alle diese Methoden, je nach Fragestellung, Anwendung. Allen Gemeinsam ist die Notwendigkeit von spezifischen Zielstrukturen wie Gene, DNA, RNA, Proteine, Antigene oder Antikörpern. Dies gewährleistet eine eindeutige Identifikation sowie intra- und interspezifische Differenzierung.

Nicht allein in Lebensmitteln ist die Detektion von Pathogenen relevant, auch im Körper, wenn eine Infektion erfolgte, spielt sie eine entscheidende Rolle. Dabei existieren ähnliche Herausforderungen wie Sensitivität und Spezifität. So sind reale Proben wie Blut, Urin oder Stuhl, häufig mit großen Mengen humaner DNA durchsetzt oder andere, nicht pathogene, kommensale Bakterien, insbesondere im Stuhl, enthalten. Daher ist auch heute noch die konventionelle Kultivierung der Goldstandard in diagnostischen Laboren, da diese eine exzellente Spezifität aufweist und neben der Spezies-Bestimmung auch zur Untersuchung bestehender Wirkstoffresistenzen dient. Letzteres ist besonders relevant, da Patienten, die mit Verdacht auf Typhus in ein Krankenhaus eingeliefert werden, meistens bereits ambulant eine empirische orale Therapie erhalten haben, so dass die Beurteilung der Wirkstoffresistenz für den weiteren Therapieerfolg entscheidend ist. Je schneller ein entsprechender Nachweis erbracht werden kann, desto eher lassen sich geeignete Therapien einleiten. Jedoch kann die Kultivierung in der Regel nicht schneller als in 48 h Ergebnisse liefern. Um diese Zeit zu reduzieren und früher angemessene Therapien einzuleiten, bedarf es einer Analyse am Point-of-Care. Hierfür wurden Lab-on-a-Chip Modelle wie ivD-plattform [185], Nukleinsäurebasierte Methoden, wie LAMP [67], PCR [26] und *microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence* (MAMEF) [210] entwickelt. Hierbei hat sich gezeigt, dass eine Reduktion des humanen Hintergrunds während der Anreicherung die Sensitivität erhöht. Es wurde Medium (*ox bile tryptone soy broth*) eingesetzt, welches eine vollständige Lyse der Blutzellen ermöglicht, dabei intrazelluläre Bakterien freizusetzen, ohne das Wachstum von Salmonellen zu hemmen [242]. Ein neuartiger Ansatz ist die metabolische Anwendung, bei der Metabolite mittels kombinierter Gaschromatographie/ Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht werden, die bei infektiösen Erkrankungen entstehen. Es ermöglicht eine Unterscheidung von *E.coli* und *S. aureus* als auch die Antworten auf verschiedene Antibiotika-Behandlungen [8]. Die Etablierung neuer Diagnostika ist erschwert, da immer noch der Einsatz von Antibiotika überwiegt und die Preise von Antibiotika deutlich geringer sind, als die Entwicklung eines Schnell-Test. Ein Gewinn bringender Markt ist nicht vorhanden, weshalb kaum kommerzielle Produkte auf den Markt kommen. Dabei ist die Überschwemmung und Missbrauch von Antibiotika ein Auslöser für das Aufkommen von zahlreichen resistenten Bakterien. Ein Umdenken und bessere Voruntersuchungen sind notwendig um eine bessere bzw. spezifische Therapien zu ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen mindestens molekularbiologische Reinheit auf (Tabelle 3.1). Die verwendeten Puffer und Medien wurden mit der entsprechenden Bezeichnung der Anwendung deklariert (Tabelle 3.2). Eine Auflistung aller Geräte befindet sich im Anhang (Anhang L).

Tabelle 3.1: Chemikalien mit Angabe zum Hersteller und CAS Nummer

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller
SYBR Green I	163795-75-3	Sigma
Propidiumiodid	25535-16-4	Sigma
Acrylamid 2X	79-06-1	Serva
Ammoniumacetat	631-61-8	Sigma
Ampicillin-Natriumsalz	69-52-3	Appllichem
Bovine Serum Albumin (BSA)	90604-29-8	Roth
Chloroform-Isoamylalkohol 24:1	A1935,0500	Appllichem
D(+)-Glukose	50-99-7	Sigma
DMSO für die Molekularbiologie	67-68-5	Roth
DNaseI (RNase-frei)	79254	Qiagen
Ethanol (100% ACS)	64-17-5	Sigma
Gentamicinsulfat [10 mg/ml]	1405-41-0	Th. Geyer
Glycerin wasserfrei	56-81-5	Roth
Glycogen	9005-79-2	ThermoFisher
Igepal CA-630 für die Molekularbiologie	9002-93-1	Sigma
Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG)	367-93-1	Roth
Mineralöl	8042-47-5	Sigma
Natrium Desoxycholsäure	302-95-4	Merck
Natriumacetat Puffer	126-96-5	Sigma
Phenol-Lösung (gesättigt mit 0.1 M Citratpuffer)	108-95-2	Sigma
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	A0889,0500	Appllichem
Rhamnose Monohydrat	10030-85-0	Promega
SDS-Lösung 10%	151-21-3	Sigma
TRIS	77-86-1	Roth

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.2: Medien und Puffer unter Angabe der Zusammensetzung und der Verwendung

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
hypotonischer Puffer	10 mM HEPES 60 mM KCl (pH 7,5)	Eukaryotische Lyse
hypotonischer Puffer	10 mM HEPES 60 mM KCl (pH 7,5) 0,1 mM EDTA	RNA-Extraktion/ Eukaryotische Lyse
LB- Medium	10 g L ⁻¹ Trypton, 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L ⁻¹ Natriumchlorid	Universal Medium
Nutrient Broth No. 2 (NB)	4,3 g L ⁻¹ Caseinpepton, 4,3 g L ⁻¹ Fleischextrakt, 6,4 g L ⁻¹ Natriumchlorid Sigma (Art.nr.:70123)	Salmonella Medium
NBS	NB + 0,3 M Natriumchlorid	Vorkultivierung für Infektion
TAE- Puffer	48,4 g L ⁻¹ Tris; 11,42 mL L ⁻¹ Essigsäure 100 %; 20 mL L ⁻¹ EDTA 0,5 M	Gelelektrophorese
TE Puffer	10 mM Tris pH 7,6 0,1 mM EDTA	DNA basierte Methoden
SOB	5 g L ⁻¹ Hefeextrakt, 20 g L ⁻¹ Trypton 10 mM Natriumchlorid 2,5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat	Vorrats- Medium
SOC	SOB + 20 mM Glucose	Transformation
Blocking Puffer	1X PBS + 5-10 mg mL ⁻¹ BSA	Immunscreening
Waschpuffer (PBST)	1X PBS + 0,1 % Tween	via Microarray

3.1.1. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Biomers.net synthetisiert und wurden gereinigt, Kartusche oder HPLC Standard, entsprechend ihrer Verwendung. PCR Primer wurden als Vorratslösung (10 µM) bei -20 °C gelagert (Anhang M).

3.2. Mikrobiologische Methoden

Im weiteren Abschnitt wurden die klassischen Methoden der Mikrobiologie beschrieben, die Arbeiten erfolgten weitgehend unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2.

3.2.1. Kultivierung von Bakterien

Es wurde mit dem Pathogen *Salmonella* Enteritidis (Stamm P125109) gearbeitet. Die Kultivierung erfolgte in Nutrient Broth 2 Medium und auf Agar Platten. Für Versuche zur rekombinanten Proteinexpression wurden *E. coli* Stämme verwendet, welche in LB-Medium unter Zusatz von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin kultiviert wurden.

Für eine dauerhafte Stammhaltung wurden Klone in entsprechendem Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 bis 0,8 kultiviert. Die Flüssigkultur wurde zentrifugiert und das Pellet in 1 mL Medium resuspendiert. In einem Kryoröhrchen wurde steril filtriertes Glycerin (80 %) und Bakteriensuspension im Verhältnis 1:4 homogenisiert und bei -80°C gelagert. Die Kultivierung in Flüssigkultur erfolgte bei 37°C und wurde immer aus einer Übernachtskultur frisch 1:100 überimpft und bis zu der gewünschten OD_{600} inkubiert. Für die Bestimmung einer Wachstumskurve wurde die OD_{600} zu definierten Zeitpunkten bestimmt.

3.2.2. Herstellung kompetenter *S. Enteritidis* Zellen

Die Herstellung der kompetenten Zellen wurde nach dem Protokoll von Gerlach et al. 2009 [71] durchgeführt. Die wesentlichen Schritte sind kurz aufgeführt. Es wurde *S. Enteritidis* P125109 in LB Medium über Nacht kultiviert, ein Inokulum von 1:100 in LB Medium (10 mL) eingesetzt und bis zu einer OD_{600} von 0,8 inkubiert. Die Bakterien wurden für 20 min auf Eis gelagert, zentrifugiert und das Pellet in 10 mL eiskaltem dest. Wasser resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zyklus, in dem das Volumen auf 5 mL mit eiskaltem dest. Wasser reduziert wurde. Die letzten beiden Zyklen erfolgten mit eiskaltem 10 %igen Glykogen, wobei das Endvolumen $125 \mu\text{L}$ beträgt. Die kompetenten Zellen wurden sofort für die Elektroporation verwendet. Der Elektropuls erfolgte bei 2500 V in einer Küvette mit 1 mm Spalt. Nach einstündiger Inkubation in SOC Medium wurde der Transformationsansatz auf LB- Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Herstellung einer fluoreszierenden *S. Enteritidis* Variante wurde der Vektor pFN6A-eGFP in *S. Enteritidis* transformiert, welcher eine Ampicillin Resistenz (Amp^{R}) trägt.

3.2.3. Knockout Generierung mittels Lambda Red Rekombination

Der Knockout von Genen erfolgte nach dem Protokoll von Wanner und Datsenko [49] und wird im Folgenden kurz erläutert. Das Genprodukt, welches deletiert wurde, und somit der DNA-Bereich der transformiert wurde, setzt sich zusammen aus einem 39 bp up- und downstream Bereich des zu deletierenden Gens, den FRT-sites und der Antibiotikaresistenz-Kassette.

Es wurden elektrokompente *S. Enteritidis* hergestellt, mit 100 ng pKD46 Plasmid DNA transformiert und anschließend bei 30°C und 180 rpm für 60 min in 1 mL frischem SOC

Medium inkubiert und 50 µL des Elektroporationsansatzes auf Ampicillin-haltigem Agar ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Ein *S. Enteritidis* pKD46 haltiger Klon wurde zur Herstellung kompetenter Zellen verwendet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,1 erfolgte die Zugabe von 1 mmol L⁻¹ Arabinose. Die elektrokompenten Zellen wurden mit 100 ng gereinigter Ziel-DNA-Sequenz versetzt, elektroporiert und anschließend 60 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Es wurden 100 µL der Suspension auf Chloramphenicol-haltigem Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Eliminierung der Antibiotikaresistenz wurden die Deletionsmutanten mit dem Plasmid pCP20, wie zuvor beschrieben, transformiert und bei 30 °C inkubiert. Kolonien wurden auf nichtselektivem Nutrient-Broth Agar bei 43 °C kultiviert und auf den Verlust der Ampicillin und Chloramphenicol Resistenzkassette getestet. Die finale Kontrolle der Deletion erfolgte mittels PCR und DNA-Sequenzierung durch die Firma LGC Genomics GmbH.

Die Knockouts wurden auf LB-Agar auf ein verändertes Wachstumsverhalten und Schwärmverhalten kontrolliert.

3.2.4. RNA Stabilisierung für Bakterien

Nach erfolgreicher Kultivierung der Salmonellen wurden die Bakterien bei 3000 x g pelletiert und in PBS resuspendiert. Es wurden 500 µL Bakteriensuspension mit 1 mL RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) versetzt, für 5 s gemischt, 5 min inkubiert und für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -80 °C gelagert oder direkt für die RNA Extraktion weiterverwendet.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet: HeLa (human), J774A.1 (murin) und CaCo-2 (human). Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium (Tabelle 3.3) und bei 37 °C mit 5 % CO₂ angezogen.

Tabelle 3.3: Zelllinien und die dazugehörige Bezugsquelle und Medium

Zelllinie	Bezugsquelle	Zusammensetzung
CaCo-2	DSMZ ACC 169	80 % MEM, 20 % FKS, 1 X Nicht-essentielle-Aminosäuren
J774A.1	DSMZ ACC 170	90 %DMEM, 10 % FKS
HeLa	DSMZ ACC 57	90 %DMEM, 10 % FKS

Das Passagieren der Zellen erfolgte für die HeLa und CaCo-2 Zellen mit Trypsin (0,25 %), wohingegen die J774A.1 Zellen mit einem Schaber von der Oberfläche abgelöst wurden. Für die CaCo-2 Zellen wurde zusätzlich ein Schritt zur Separation der Zellen durchgeführt, hierfür wurden sie in einer Kanüle geschert. Für eine definierte Zellzahl wurden die Zellen in der

Thoma Zählkammer mikroskopiert und die Konzentration bestimmt. Zum Einfrieren wurden die Zellen in 10 % DMSO überführt und bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Zellfärbungen

Für eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden Farbstoffe verwendet, die aufgrund von Permeabilität oder Impermeabilität bei intakten Zellmembranen Auskunft über die Vitalität der Zellen geben. Hierfür wurden die Zellen in Mikroskopie-Kammern (Nunc, LabTek, Chambered Coverglass) ausgesät und während der Untersuchung Medium ohne Zusatz von Phenolrot und Serum verwendet. Der Tot-Farbstoff Propidiumiodid (1 mg mL⁻¹) wurde 1:60 verdünnt eingesetzt, für 15 min inkubiert und abschließend entfernt und die Zellen mit PBS gespült. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Bandbreitenfilter von 620 nm durchgeführt.

3.3.3. Gentamicin Invasionstest

Die Vorbereitungen für das Infektionsmodell beinhalten die Kultivierung der Pro- und Eukaryoten. Letztere wurden ohne Antibiotikum auf eine Zelldichte von 90 % herangezogen. Bei dieser Zelldichte berechnet sich die Zellzahl von CaCo-2 Zellen auf 3×10^4 Zellen (cm²)⁻¹ und von J774A.1 Zellen auf $1,3 \times 10^5$ Zellen (cm²)⁻¹. Die Bakterien wurden über Nacht in NB-Medium angezogen und 1:100 in frisches NBS-Medium überführt. Das Wachstum erfolgte bis OD₆₀₀ ~ 0,8, danach wurden das Medium durch Zellkulturmedium ohne Serum ersetzt. Die Zellzahl beträgt bei einer OD₆₀₀ von 1,0 von 8×10^8 Zellen mL⁻¹.

Der Start der Infektion (t=0) ist definiert als Zeitpunkt der Zugabe von Bakterien zur Zellkultur. Die Inkubation erfolgte für 30 min mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1: 100 (Zellen: Bakterien). Das Medium wurde entfernt und die Zellkultur zweimal mit PBS gewaschen. Für die weitere Inkubation von 30 min wurde dem Medium 100 µg mL⁻¹ Gentamicin hinzugesetzt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und für die restliche Zeit in Medium mit 20 µg mL⁻¹ Gentamicin inkubiert. Die Lyse der eukaryotischen Zellen wurde zum Zeitpunkt (t=x) mit PBS und 0,1 % SDS durchgeführt. Hierfür wurde zuvor das Medium abgesaugt und die Zellschicht zweimal mit PBS gewaschen. Das Lysat wurde entsprechend verdünnt und auf LB-Agar Platten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden die Koloniezahl bestimmt und nach der folgenden Formel die *Colony Forming Units* (CFU) pro mL berechnet:

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{Kolonienanzahl/Probenvolumen [mL]}}{\text{Verdünnungsfaktor}}$$

Für eine statistische Auswertung wurden je drei biologische Replikate mitgeführt und der Gentamicin Invasionstest mindestens zweimal unabhängig durchgeführt. Zur Identifizierung von signifikanten Unterschieden in der Invasivität in unterschiedlichen Zellen oder der Mutanten wurde die Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Mittels OriginPro 2015G

(OriginLab Corporation) wurde die einfache ANOVA angewendet und Werte $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3.3.4. Eukaryotischer Zellaufschluss für *Salmonella*- RNA Extraktion

Der Zellaufschluss für nachfolgende Analysen zur Genexpression von *Salmonella* erfordert andere Bedingungen, hierbei steht die RNA Qualität im Fokus. Die folgenden vier Methoden wurden getestet. Jeweils nach der Lyse erfolgte eine Zentrifugation 600 x g für 5 min.

- a. Der Zellaufschluss wurde nach dem Protokoll von Eriksson et al. 2003 [61] in PBS unter Zusatz von 0,1 % SDS, 1 % Phenollösung (gesättigt mit Citratpuffer) und 19 % Ethanol durchgeführt. Nach 30 min auf Eis wurde das Lysat bei 3000 x g zentrifugiert und das Pellet wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, stabilisiert. Die Zugabe von 0,5 % Natrium Desoxycholsäure und eines hypotonischen Puffers anstelle von PBS wurden zur Verstärkung der eukaryotischen Lyse zugesetzt.
- b. Der Zellaufschluss mittels Cytosol/ Nucleus Fraktionierung wurde mit dem Nuclear/Cytosol Fractionation Kit (BioVision Inc.) durchgeführt, wobei dem Protokoll des Herstellers bis zur Cytosol Extraktion gefolgt wurde. Hierfür wurden die Zellen abgeschabt bzw. trypsiniert und bei 600 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in *Cytosol Extraction Buffer* (CEB) -A (+ DTT) homogenisiert, für 15 s gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt die Zugabe von CEB- B, danach 5 s mischen, 1 min auf Eis inkubieren, erneut 5 s mischen und statt 16000 x g bei 2000 x g zentrifugieren. Das Pellet wurde stabilisiert wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben.
- c. Für die zweistufige Lyse wurde ein hypotonischer Lysepuffer (A) mit 0,1 % EDTA versetzt und ein zweiter Puffer (B) zur Lyse der Zellmembran beinhaltet Puffer A und 2 % Igepal CA-630. Die Zellen wurden abgeschabt bzw. trypsiniert und bei 600 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer -A homogenisiert, für 15 s gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Lysepuffer- B hinzugefügt, 5 s gemischt, 1 min auf Eis inkubiert, erneut 5 s gemischt und der Ansatz bei 2000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, stabilisiert.
- d. Für die *all-in-one* Lyse erfolgte eine ähnliche Durchführung wie der zweistufigen Lyse. Allein der Puffer zur Lyse unterschied sich und setzte sich aus Igepal CA-630 (0,5 %) und dem hypotonischen Lysepuffer zusammen. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis lysiert und im Anschluss das Lysat zentrifugiert. Alle anderen Schritte sind identisch zur zweistufigen Lyse.

Abschließend erfolgte die RNA-Extraktion mit den pelletierten Bakterien (S. 22).

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Für die DNA Reinigung wurde entweder das Säulen-basierte Kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet oder die DNA mittels Ethanolfällung präzipitiert. Hierfür wurde 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M) und 2,5 Volumen Ethanol (98%) mit DNA vereinigt und bei -20 °C oder -70 °C (bei geringer Konzentration) von 30 min bis über Nacht gelagert. Zusätzlich wurde Glykogen (10 µg) zum Reaktionsansatz (500 µL) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (16000 x g) und der Überstand entfernt. Das Präzipitat wurde entweder luftgetrocknet oder mit 200 µL Ethanol (70 %) gewaschen, zentrifugiert und luftgetrocknet. Das Präzipitat wurde in Nuklease-freiem Wasser gelöst. Die RNA Reinigung erfolgte mit GeneJET RNA Purification (Fermentas) oder mittels Ethanolfällung, wie zuvor beschrieben

3.4.2. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten und deren Extraktion

Es wurden 1 % Agarosegele unter Zusatz von 0,5 µg mL⁻¹ Roti-Safe GelStain hergestellt, wenn nicht anders beschrieben. Als Größenstandard diente der Marker HyperLadder™ (Bioline) und als Laufpuffer wurde 1X TAE Puffer verwendet.

Die Aufreinigung eines DNA Fragmentes aus dem Gel erfolgte mit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Machery & Nagel). Es wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Hierfür wurde das DNA Gemisch bei 60 V aufgetrennt.

3.4.3. Klonierung von Einzelgenen und Transformation in *E. coli*

Für die Klonierung von DNA Abschnitten in den Zielvektor wurden Sequenz-unabhängige Methoden verwendet. Sie beruhen vorrangig auf der homologen Rekombination und erfolgen ohne Ligation und Ligase. Die Klonierung von Einzelgenen erfolgt mit der *Circular Polymerase Extension Cloning* (CPEC) Methode [167] oder der *Fast Cloning* Methode [130].

Für die CPEC Methode wurden Primer für die Linearisierung des Vektors und die Amplifikation des Inserts entwickelt, welche überlappende Überhänge von 15 bp beinhalten. Nach PCR-Amplifikation wurden die Konstrukte aufgereinigt und im CPEC Ansatz äquimolar eingesetzt. Die CPEC Klonierung erfolgte wie eine Zyklus-PCR mit einer *high fidelity* Polymerase. Der 25 µL Ansatz bestand aus: 100 ng Vektor pFN18A (~4 kb), 25 ng Insert (1 kb), 5 µL 5X Phusion Buffer, 1 µL dNTPs (10 mM), 0,75 µL DMSO, 1 µL Phusion Polymerase und Wasser (aufgefüllt auf 25 µL). Die PCR erfolgte mit 98 °C initiale Denaturierung, eine Anzahl von x Zyklen bestehend aus 10 s 98 °C, 30 s 55 °C, y s 72 °C und abschließend nochmal 5 min 72 °C. Die Anzahl der Zyklen (x) kann variiert werden, aber am Beispiel eines Einzelgenes sind 5 Zyklen ausreichend. Die Zeit für die Amplifikation (y) ist abhängig von der Größe des gesamten Konstrukts, hierbei gilt

Länge [kb] * 15 s, somit ergibt sich für 5 kb 75 s. Die Probe wurde mit QuickClean Resin von Enzymen befreit und mittels Ethanolpräzipitation gereinigt.

Für die Transformation von rekombinanten Plasmiden mit Einzelgenen wurden chemisch kompetente KRX Zellen (Promega) und BL21(Agilent-gold) Zellen verwendet. Es wurde dem Standardprotokoll des Herstellers gefolgt. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-amp Agar ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) ausplattiert und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anhand einer Kolonie-PCR wurden die Klone mit vektor-spezifischen Primern amplifiziert, bei entsprechender Insertgröße wurden die Klone über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) extrahiert und zur Sequenzanalyse versendet (LGC Genomics).

3.4.4. RNA Extraktion und Analyse

Für die Extraktion von RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zur Herstellung des Bakterienlysats wurde eine enzymatische Lyse mit Lysozym (Sigma) und Proteinase K Verdau durchgeführt. Die Analyse der isolierten RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser durchgeführt und laut Hersteller dem Agilent RNA 6000 Pico Assay Protokoll gefolgt.

Die RNA wurde auf genomischer DNA getestet, wofür real time-PCR Versuche mit den RNA-Extrakten durchgeführt wurden. Es wurde Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten genomische DNA und Wasser. Die Analysen wurden auf das *Salmonella* Gen *SEN3772* (Transkriptionsfaktor) durchgeführt.

3.4.5. mRNA Isolierung der RNA Proben aus dem Infektionsmodell

Die Infektionsproben wurden nach der RNA Extraktion zusätzlich von mRNA des Wirts befreit, unter Verwendung von $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$ mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec), entsprechend der Herstellerangaben. Zur Vorbereitung wurden die RNA Proben bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 min erhitzt, um die Sekundärstrukturen aufzubrechen. Danach erfolgte die Markierung mit magnetischen Beads, $25 \mu\text{L}$ Oligo(dT) MicroBeads pro $100 \mu\text{g}$ RNA. Die MACS® Säulen wurden mit Lysis/ Binding Puffer vorbereitet und in einen magnetsichen Separator eingesetzt. Das Oligo(dT)- RNA Gemisch wurde aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen, auf Eis gestellt. Der Durchfluss wird im Weiteren als erste Fraktion bezeichnet. Es folgt der erste Waschschritt mit $200 \mu\text{L}$ Lysis/ Binding Puffer. Auch dieser Durchfluss (Fraktion 2) wurde aufgefangen und zur Analyse verwendet. Die Fraktionen 1 und 2 wurden mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) gereinigt und nachträglich mittels Ethanolpräzipitation konzentriert.

3.5. Microarray basiertes Immunscreening einer cDNA Expressionsbibliothek

Die Methode beruht auf der von Hoppe et al. [91, 92] entwickelten Vorgehensweise mit einigen Modifikationen bezüglich der Primer und Zyklenzahlen. Im folgenden Abschnitt werden die chronologischen Arbeitsschritte von der cDNA Generierung bis hin zur Auswertung der Microarray Slides beschrieben.

3.5.1. cDNA Generierung

Zur Herstellung einer cDNA Bibliothek wurde das In-Fusion® SMARTer® directional cDNA Library Construction Kit von Clontech verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte anhand eines poly(T) Primer, hierfür wurde die bakterielle RNA eingangs mit dem Poly(A) Polymerase Tailing Kit von Epicentre modifiziert. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 20 min inkubiert und mit 25 mM EDTA abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz mittels GeneJET RNA Purification (Fermentas) gereinigt.

Die cDNA Synthese beginnt mit der Erststrangsynthese, hierfür wurden circa 1 µg Poly(A) RNA eingesetzt. Es wurde den Angaben des Herstellers weitgehend gefolgt. Für die Bestimmung der optimalen Anzahl an PCR Zyklen wurde ein Teil des Ansatzes verwendet, um nach 9, 12, 15, 18 und 21 Zyklen jeweils eine Probe zu entnehmen, die mittels DNA Gelelektrophorese untereinander verglichen wurden. Der *long distance* (LD)- PCR-Ansatz wurde doppelt angesetzt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: LD-PCR-Ansatz für die Zweitstrangsynthese der cDNA

Zusammensetzung	Bestandteile
2 µL	Einzelstrang cDNA
80 µL	Deionisiertes Wasser
10 µL	10X Polymerase Buffer
2 µL	50X dNTP Mix (10 mM)
2 µL	5'PCR Primer II A (12 µM)
2 µL	3'CDS In-Fusion Primer (10 µM) (Version intern)
2 µL	50X Advantage-2 Polymerase

Zu Beginn wurden beide Ansätze 9 Zyklen am Stück amplifiziert (Initiale Denaturierung: 95 °C für 1 min, Zyklen: 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 68 °C 6 min) und anschließend auf 4 °C herunter gekühlt. Es wurden 30 µL eines Ansatzes zur Optimierung verwendet, die restlichen Reaktionsansätze wurden bei 4 °C gelagert. Aus dem Optimierungsansatz wurden nach je 3 Zyklusschritten 5 µL entnommen und für die Gelelektrophorese auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der optimalen Zyklenzahl wurde der restliche Ansatz den zusätzlichen Zyklen unterzogen. Im Anschluss wurden die cDNA Proben mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

3.5.2. Normalisierung der cDNA Bibliothek

Die Normalisierung der cDNA Bibliothek umfasst die Reduktion der rRNA-spezifischen cDNA aus der cDNA Bibliothek. DNA Sequenzen in hoher Konzentration wurden mit dem Trimmer-2 cDNA normalization kit (Evrogen) entfernt und nur DNA in niedriger Konzentration, wie mRNA-spezifische cDNA, bleiben erhalten. Hierbei wurde dem Protokoll des Herstellers wie beschrieben gefolgt. Es wurden $\leq 1,2 \mu\text{g}$ cDNA verwendet und die *duplex-specific nuclease* (DSN) wurde in unterschiedlichen Mengen (1-fach, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ und DSN⁽⁻⁾) für die Normalisierung eingesetzt.

Die Amplifikation der normalisierten Proben erfolgte nach Herstellerangaben, mit einigen Anpassungen bezogen auf die Zyklenzahl. Für die Bestimmung der optimalen Anzahl an PCR Zyklen wurde der DSN⁽⁻⁾-PCR- Ansatz verwendet und nach 7, 9, 11 und 13 Zyklen jeweils eine Probe entnommen. Alle Proben wurden anschließend mittels DNA Gelelektrophorese analysiert. Die PCR wurde mit Phusion Polymerase (NEB) durchgeführt und viermal angesetzt (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: PCR-Ansatz für die Amplifikation nach Normalisierung der cDNA Bibliothek

Zusammensetzung	Bestandteile
1 μL	normalisierte cDNA (je DSN Ansatz)
35 μL	Deionisiertes Wasser
10 μL	5X Polymerase Buffer
1 μL	50X dNTP Mix (10 mM)
1 μL	SMARTer V (10 μM) (Version intern)
1 μL	3'CDS In-Fusion Primer (10 μM) (Version intern)
1 μL	Phusion Polymerase

Zu Beginn wurden alle Ansätze für sieben Zyklen amplifiziert (Initiale Denaturierung: 98 °C für 1 min, Zyklen: 98 °C 15 s, 72 °C 3 min), anschließend auf 4 °C herunter gekühlt und die restlichen Reaktionsansätze auf Eis gelagert. Aus dem Optimierungsansatz (DSN⁽⁻⁾) wurden nach je zwei Zyklusschritten 5 μL entnommen und für die Gelelektrophorese auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der optimalen Zyklenzahl wurden die restlichen Ansätze X + 7 PCR- Zyklen unterzogen. X definiert die optimale Amplifikationsstufe und wird ersetzt mit der Anzahl an Zyklen, die zusätzlich zu den vorherigen 7 Zyklen durchgeführt wurden. Im Anschluss wurden die DSN –Proben mit zusätzlicher PCR-Amplifikation über DNA Gelelektrophorese aufgetrennt und der Normalisierungserfolg verglichen. Nur die DSN Konzentration mit einem gleichmäßigen cDNA- Schmier und ohne rRNA-spezifische cDNA Banden wurden vereinigt. Die vereinigte, normalisierte cDNA Probe wurde im Gesamtvolumen auf ein 1 %iges Agarose Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde der Größenbereich von 200 bp- 1500 bp ausgeschnitten und mit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macher & Nagel) aufgereinigt. Die Konzentration der Elution wurde durch DNA-Fällung mit Ethanol erhöht und die Proben anschließend bei -20 °C gelagert.

3.5.3. Klonierung der cDNA Bibliothek und die Herstellung des Vektors

Als Klonierungsvektor diente der pFN18A HaloTag® T7 Flexi® Vektor (Promega). Der HaloTag® ist so kodiert, dass das *gene of interest* N-terminal mit dem HaloTag® koexprimiert wird. Der Vektor wurde nach In-Fusion SMARTer Prinzip angepasst. Hierfür wurde der Vektor linearisiert und die Insert-spezifischen Sequenzen eingefügt. Letztere sind 15 komplementäre Basen des SMARTer V Oligo und des 3'In-Fusion SMARTer CDS Primers, welche die universalen Enden der cDNA-Fragmente darstellen. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt: initiale Denaturierung: 98 °C für 1 min, 25 Zyklen: 98 °C 15 s, 72 °C 4 min und abschließend 72 °C für 5 min (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: PCR-Ansatz für die Linearisierung des Klonierungsvektors pFN18A

Zusammensetzung	Bestandteile
0,05 µL	pFN18A HaloTag® T7 Flexi® Vector (100 ng µL ⁻¹)
2 µL	IFS 18A forward (10 µM)
2 µL	IFS 18 A reverse (10 µM)
10 µL	5X Phusion HF Buffer
1 µL	dNTPs (10 mM)
0,5 µL	MgCl
0,5 µL	Phusion DNA Polymerase
33,9 µL	RNase freies Wasser

Der linearisierte Vektor wurde über Gelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Die Klonierung der cDNA erfolgte mit dem In-Fusion® HD Cloning Plus Kit (Clontech). Der Reaktionsansatz besteht aus 5X In-Fusion HD Enzyme Premix (2 µL), Linearer Vektor (2 µL), cDNA (4,5 µL) und Wasser (1,5 µL). Die Konzentration des linearen Vektors und des Inserts wurde angepasst und beträgt 200 ng µL⁻¹ respektive 100 ng µL⁻¹. Zusätzlich wurde je eine Positivkontrolle (Hersteller Insert und Vektor) und Negativkontrolle (linearisierter Vektor und kein Insert) mitgeführt. Der Reaktionsansatz wurde bei 50 °C für 15 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 90 µL TE Puffer und 10 µL QuickClean Resin (Clontech) zum Reaktionsansatz hinzugegeben, für 1 min gemischt, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die proteinfreien-Proben wurden mit 1,2 µL Glykogen versetzt und mit Ethanol gefällt (Kap. 3.4.1). Das Präzipitat wurde luftgetrocknet und in 10 µL Nuklease freies Wasser aufgenommen.

3.5.4. Verpackung der cDNA Bibliothek in *E. coli* zur Proteinexpression

Der rekombinante Vektor (10 µL) wurde mittels Elektroporation in die *E.coli* Zelllinie Acella (EdgeBio) eingebracht. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen mit jeweils 100 µL auf LB-amp Agarplatten aufgebracht und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es wurden 768 Kolonien pro Bibliothek ausgewählt und jeder Einzelklon in Kavitäten einer

96-Well Platte übertragen. Jeder Klon wurde nach einer fortlaufenden Nummer entsprechend der Position der 96-well Platten bezeichnet. Die Kultivierung erfolgte in LB-amp Medium über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Klone 1:10 in neues LB-amp Medium überführt und das restliche Volumen der Vorkultur mit steril filtriertem DMSO 10 % (v/v) versetzt und bei -80 °C gelagert. Die Proben zur Proteinexpression wurden für 5 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Reduktion der Temperatur auf 20 °C, um die anschließende Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG über Nacht bei 20 °C und 100 rpm durchzuführen. Am folgenden Tag wurde die Kultur bei 2000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 20 min bei -20 °C eingefroren und danach für 5 min bei RT belassen bevor die Lyse mit EasyLyse™ Bacterial Protein Extraction Solution (Epicentre) durchgeführt wurde. Diese enzymatische Lyse wurde optimiert für die Isolation von rekombinanten Proteinen aus *E.coli* mit dem Zusatz von DNase I (10 µg mL⁻¹) und Lysozym (250 µg mL⁻¹). Der EasyLyse Puffer besteht aus 0,5 mL dest. Wasser, 2 µL MgCl₂ (1 M), 0,5 mL LysePuffer und 1 µL Enzymmix. Pro Pellet (800 µL Flüssigkultur) wurden 160 µL EasyLyse Puffer zum Resuspendieren verwendet und 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat zentrifugiert und nur der Überstand weiterverwendet.

Die Lyse der *E. coli* Zellen erfolgte für Immunscreenings unabhängig von den Bibliothekscreenings mit B-Per® II Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific), unter Zusatz von DNase I (100 µg mL⁻¹) und Lysozym (250 µg mL⁻¹). Es wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Das Lysat wurde für das Immunscreening mit HaloBind Slides genutzt.

3.5.5. Kontrollproteine für eine Evaluierung der Bindung zum Antikörper

Die Auswahl an Proteinen (Tabelle 3.7), die als Immunogen oder Nicht-Immunogen beschrieben wurden, erfolgte nach Literaturangaben bzw. aus vorherigen Studien [46]. Hierbei wurden jeweils drei Proteine ausgewählt, zudem wurden zusätzlich die Negativkontrollen Puffer und Expressionssystem ohne Plasmid mitgeführt.

Tabelle 3.7: Kontrollproteine für das Microarray-basierte Immunscreening, mit Angabe des Gens, des Ursprungorganismus und der Literaturquelle zur beschriebenen Immunität

Gen	Organismus	Referenz	Immunität
ompA	<i>Salmonella enterica</i>	Liu et al. 2016 [133], Cho et al. 2015 [39]	Ja
fljB	<i>Salmonella enterica</i>	Liu, Liu et al. 2016 [133]	Ja
fimA	<i>Salmonella enterica</i>	Danckert, Hoppe et al. 2014[46]	Ja
PseB	<i>Campylobacter jejuni</i>		Nein
PyrC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Nein
GapA	<i>Campylobacter jejuni</i>		Nein

3.5.6. Immunscreening via Microarray Slides

Die Analyse der rekombinanten Proteinbibliothek erfolgte über HaloLink™ (Promega) und HaloBind (7BioScience) Microarray Slides. Mit der Verwendung des HaloTag® Systems wurde eine Applikation des unaufgereinigten Lysats auf die Microarray Slides gewährleistet. Die Applikation des Lysats erfolgte mit dem Genetix QArray2 Microarray spotter (Molecular Devices) über ein Kontakt-Verfahren, wodurch eine hohe Probenanzahl auf dem Microarray garantiert wurde. Es wurden pro Slide alle 768 Proben pro Bibliothek in 4-facher Bestimmung und zusätzlich 8 Kontrollen in mehrfacher Bestimmung eingesetzt, wodurch 3600 Spots auf einem Slide angeordnet wurden. Es wurden vier technische Replikate (n=4) angefertigt. Zum Spotten wurden mindestens 20 µL des Lysats benötigt, welche in 384-well Mikrotiter-Platten in festgelegter Anordnung bereitgestellt wurden. Die Proben wurden in einem 10x10 Array über insgesamt 36 Einzelarrays pro Microarray verteilt.

Der QArray2 Printer wurde so programmiert, dass nach einer vorgegebenen Reihenfolge das Lysat aufgenommen und nach einem definierten Schema gespottet wurde. Nach jedem Setzen eines Spots wurde der Pin mittels Ethanol und Wasser gereinigt. Im Printer wurde eine relative Luftfeuchtigkeit von 65 % bei 37 °C eingestellt, um ein Verdunsten der Spots zu verhindern. Nach Abschluss des Spottens verblieben die Slides für 1 h im Printer bei gleicher Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden die Slides mit Waschpuffer (PBST) gespült und mit reinem Stickstoffgas die Flüssigkeit entfernt. Zusätzlich wurden die Slides in eiskaltem Blocking Puffer (PBS + BSA) für 20 min- über Nacht inkubiert und anschließend zweimal mit Waschpuffer gespült. Die Slides wurden für das Immunscreening in ein ProPlate™ 2-well slide module (Grace Bio-Labs, Inc., USA) eingesetzt, um das Arbeitsvolumen gering zu halten.

Das Immunscreening erfolgte mit dem Anti-Salmonella Antikörper (ab35156, Abcam) und dem sekundären Antikörper Anti-Rabbit polyklonaler IgG, der konjugiert ist mit Chromeo™546. Als erstes wurde der Primärantikörper 1:500 in Waschpuffer verdünnt und für drei technische Replikate eingesetzt. Ein weiteres technisches Replikate wurde mit PBS behandelt und diente als Negativkontrolle, zur Identifizierung von unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers an die Proteine. Die Inkubation wurde für 1,5 h bei RT und 25 rpm auf einem Horizontal-Schüttler durchgeführt. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBST für 5 min bei 50 rpm. Als zweites wurde der Sekundärantikörper 1:750 verdünnt in PBST für 1 h bei RT und 25 rpm inkubiert. Abschließend erfolgte ein dreimaliges Spülen mit PBST und das trocknen der Slide-Oberfläche mit Stickstoffgas.

3.5.7. Auswertung der Microarray Slides

Die Messung der Microarrays erfolgte über den Axon Genepix 4200A (Molecular Devices) mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Bei jeder Messung wurde 40 % Laser-Power, ein PMT von 400 und ein Standard Green Filter verwendet. Für die Analyse wurde die Software Axon GenePix Pro 6.1 verwendet. Es wurde mit der Fluoreszenzintensität gearbeitet, wobei der lokale Hintergrund des Einzelspots abgezogen wurde (F_{532} Median- B_{532}).

Unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zur jeweiligen Probe wurde vom Fluoreszenzwert des Einzelspots [a. u.] subtrahiert, woraus sich der FI-Wert [a. u.] pro Probe ergibt. Für eine qualitative Bewertung der Messwerte wurde die Berechnung des Kontrastwertes verwendet:

$$Kontrast = \frac{(\tilde{FI}_{Probe} - \tilde{FI}_{alle})}{(\tilde{FI}_{Probe} + \tilde{FI}_{alle})}$$

Es wurden Kontrastwerte [a. u.] von -1 bis +1 berechnet. Durch den Bezug auf FI-Werte aller Proben eines Microarrays ergibt sich eine Normalisierung für jeden Slide. Dadurch wurde eine Vergleichbarkeit zwischen den drei technischen Replikaten gewährleistet. Um die Ergebnisse besser evaluieren zu können, wurde die Nachweisgrenze als *limit of detection* (LOD) definiert. Es wurde der Median der Negativkontrolle und dessen Standardabweichung (σ) in die Formel aufgenommen und ebenso der LOD-Kontrastwert berechnet:

$$LOD(Kontrast) = \frac{LOD - \tilde{FI}_{alle}}{LOD + \tilde{FI}_{alle}} = \frac{(\tilde{FI}_N + 3 \cdot \sigma_N) - \tilde{FI}_{alle}}{(\tilde{FI}_N + 3 \cdot \sigma_N) + \tilde{FI}_{alle}}$$

Jede Probe wurde als 4-fach Replikat auf dem Microarray aufgebracht und die Standardabweichung berechnet. Hierbei wurden die Intra-Slide als auch die Inter-Slide Standardabweichungen betrachtet. Die höchsten Kontrastwerte mit den geringsten Standardabweichungen wurden als Favoriten ausgewählt. Es wurde eine Auswahl an 96 Proteinen ausgewählt und die isolierten Plasmide wurde von der Firma LGC Genomics sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mittels Geneious® 10.2.3 (<http://www.geneious.com> [111]) bearbeitet. Die Datenauswertung wurde mit OriginPro 2015G (OriginLab Corporation) und Microsoft Excel durchgeführt.

3.6. Transkriptomanalyse mittels Next-Generation-Sequencing (NGS)

Die Sequenzierung der RNA Proben wurden extern von LGC Genomics ausgeführt. Dazu zählte die gesamte Aufbereitung von der RNA bis hin zur Next-Generation-Sequenzierung. Es wurden 400 Millionen *read pairs* mit dem 75 bp *single-read* Typ (NextSeq 500 V2, Illumina) sequenziert. Die bioinformatische Analyse der Rohdaten und die differentielle Expressionsanalyse erfolgte ebenso über LGC Genomics. Die wesentlichen Schritte sind nachfolgend aufgelistet.

Daten-Vorverarbeitung: *Demultiplexing* für alle Bibliotheken und jede *sequencing lane* (bcl2fastq 2.17.1.14 software, Illumina), *Clipping* der restlichen Sequenzier-Adapter (< 20 bp reads wurden verworfen), Filtern der rRNA-Sequenzen mit RiboPicker 0.4.3 (<http://ribopicker.sourceforge.net/>), Generierung von *read_counts* Differentielle Expressionsanalyse: Alignment mit Referenzgenom (S. Enteritidis P125109) mit STAR 2.4. (<https://github.com/alexdobin/STAR/releases>), *Post-alignment* filtern von Alignments zu

rRNA oder tRNA Regionen, Zählen von *aligned reads* mit *htseq-count* (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/>), Differentielle Expressionsanalyse mittels: edgeR 3.2.3 (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), DESeq 1.12.0 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq.html>) cuffdiff 2.1.1 (<http://cufflinks.cbc.umd.edu>)

Für die weitergehende Analyse und Darstellung von DEG wurden Webtools verwendet. Venn Diagramme wurden mittels <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> erstellt. Die Heatmaps wurden mit ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) berechnet, wobei die DESeq Werte mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) in eine Einheitenstabilisierte Varianzskala umgerechnet werden. Je nach Datensatz wurden Cluster hierarchisch oder binär erstellt [149]. Nachträglich wurde ebenso eine Differentielle Expressionsanalyse zu den Genen des Virulenz-Plasmids mithilfe von Geneious® 10.2.3 (<http://www.geneious.com> [111]) und der DESeq-Programmerweiterung durchgeführt.

3.7. Bioinformatische Auswertung

Alle sequenzierten Daten wurden mithilfe von Geneious® 10.2.3 (<http://www.geneious.com> [111]) bearbeitet und zusätzlich Sequenz-Konstrukte exportiert. Die Primer wurden mit Primer3 [177] in Geneious® 10.2.3 entworfen. Die sequenzierte DNA wurde mit BLAST [2] und der Datenbank Nucleotide collection nr/nt identifiziert. Es wurden Daten zum Gen, dem NCBI Locus-Tag und dem Produkt entnommen. Die Überprüfung des Leserasters erfolgte in Geneious® 10.2.3 oder mithilfe ExpASy-Translate (SIB Swiss Institute of Bioinformatics [11]). Die Homologien eines Proteins wurden aus der NCBI Protein Clusters Datenbank übernommen. Hierfür wurde die GenBank-Nummer bzw. die Referenzsequenz-Nummer (NCBI Identical Protein Groups) des Proteins verwendet. Mithilfe von Psortb [235] wurde die subzelluläre Lokalisation (SCL) bestimmt und mittels EggNOG [95] eine orthologische Zuordnung von Sequenzen und funktionaler Annotation. Zudem wurde SmartBLAST verwendet, wenn wenig Information zu dem Protein vorhanden waren. Gen und Protein bezogene Informationen wurden von KEGG [106, 106] und STRING [208] übernommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakteristika des Infektionsmodells mit *Salmonella* Enteritidis

Das Invasionsverhalten von *S. Enteritidis* wurde beschrieben und statistisch ausgewertet mittels Gentamicin- Invasionsstests. Dabei wurden folgende Phasen festgesetzt:

1. Normalzustand: vor der Infektion mit *S. Enteritidis* ($t=0$ h)
2. Start/Invasion: Zugabe der Bakterien ($t=0,5$ h)
3. Infektion: intrazelluläre *S. Enteritidis post infection* ($t>0,5$ h, p. i.)

Der Einsatz von Gentamicin im Medium ($t > 0,5$) gewährleistet, dass das bakterielle Wachstum nur intrazellulär erfolgt. Eine Kultivierung von *S. Enteritidis* in Gentamicin-haltigem Medium zeigte keine Zunahme der Bakterienzahl.

4.1.1. Morphologische Auffälligkeiten von J774A.1 und CaCo-2 im Infektionsmodell

Die Zellmorphologie von J774A.1 Zellen war regelmäßig. Es ließen sich zwei Formen mikroskopisch unterscheiden: rund oder länglich (Abbildung 4., $t=0$). Die längliche Form der Makrophagenzelle war adhärent und Zellkompartimente konnten phasenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die runde Zellform war semi-adhärent und Zellkompartimente waren nur eingeschränkt zu visualisieren. Die Zellen beinhalten eine hohe Anzahl an vakuolären Kompartimenten, wodurch sie strukturiert erscheinen. Zellen mit runder Form bestimmten das Erscheinungsbild in der Kultur.

Der zeitliche Verlauf des Infektionsmodells wurde mikroskopisch beobachtet, um Änderungen der Morphologie der J774A.1 Zellen zu dokumentieren (Abbildung 4.3). Nachdem die Zugabe von *S. Enteritidis* abgeschlossen war ($t > 0,5$ h), hatte sich die Morphologie der Zellen bereits geändert. Der Anteil an adhären Zellen stieg. Sie waren abgeflacht und ihre Morphologie war zunehmend heterogener. Ein Teil der Zellen wies eine Spiegelei-ähnliche Form auf. Zudem waren deutlich mehr Vakuolen zu erkennen, welche zum Teil auch Bakterien beinhalten (Abbildung 4., $t=1/1,5$). Bei $t=3$ war eine Deformation der Zellmembran zu erkennen. Strukturen, wie Stacheln waren auf der Zelloberfläche deutlich zu erkennen (Abbildung 4., $t=3$). Es lösten sich immer mehr Zellen ab und bei $t=4$ wurden Blasen-ähnliche Strukturen sichtbar, die aus der Zellmembran herausragten. Diese Ausstülpung der Zellmembran bezeichnet man als Membranbläschen (*membrane blebs*). Sie waren entweder klar oder mit strukturiertem Inhalt gefüllt (Abbildung 4.3 $t=4$). Nach 3 h waren mehr als 50 % der Zellen abgelöst bzw. leicht abzulösen, wozu die Zellen, die Blasen ausgebildet hatten auch zählten. Das Ablösen der Zellen wurde beim Wechseln des Mediums bemerkt, welches zu einem hohen Verlust an J774A.1 Zellen führte. Daraus resultierend wurde der Infektionsversuch nach $t > 4$ h abgebrochen.

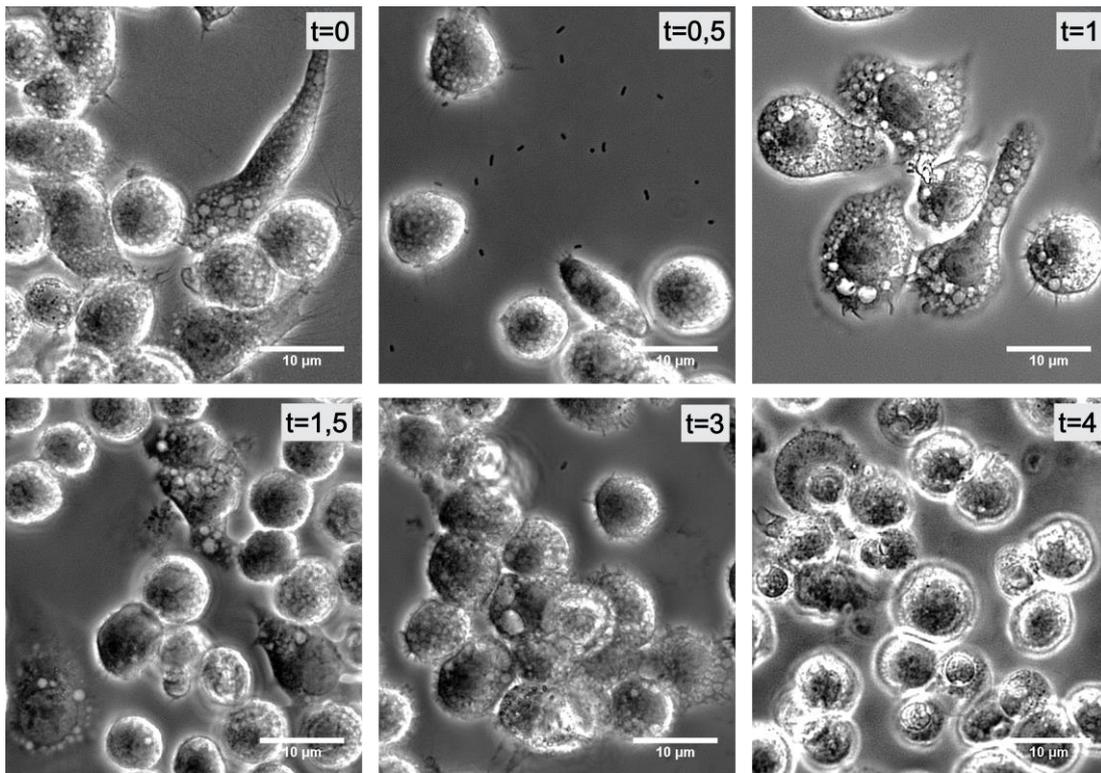


Abbildung 4.3: Zellmorphologie von J774A.1 Zellen während der Infektion mit *S. Enteritidis*

Die Studie zu Auffälligkeiten der Zellmorphologie von J774A.1 Zellen im Infektionsmodells wurde mittels Phasenkontrast-Aufnahmen im zeitlichen Verlauf [h] durchgeführt.

(t=0) Die J774A.1 Zellmorphologie ließ sich unter Normalbedingungen in zwei Zellformen unterscheiden: halb-abgerundet (semi-adhärent) und länglich (adhärent).

(t=0,5) Die Zugabe von *S. Enteritidis* erfolgte für 30 min. Die stäbchenförmigen Salmonellen lassen sich vorrangig im Zellzwischenraum gut erkennen.

(t=1) Es wurden Bakterien in Vakuolen der J774A.1 Zellen identifiziert und der Anteil an adhärenenten Zellen stieg. Diese Zellen zeigten vermehrt eine Spiegelei-ähnliche Form.

(t=1,5) Die Zellmorphologie der adhärenenten Zellen wurde zunehmend heterogener.

(t=3) Nach insgesamt 3 h der Infektion wurde vermehrt ein Ablösen der Zellen beobachten. Zudem wies die Zellmembran Anomalien auf, wie Stachel-ähnliche Strukturen, die aus der Zelloberfläche ragten

(t=4) Es war eine große Anzahl an Zellen zu erkennen, die Blasen um sich herum bildeten. Diese Zellmembranbläschen (membrane blebs) waren klar oder mit strukturierten Inhalt gefüllt. Mehr als 50 % der Zellen waren abgelöst bzw. leicht abzulösen bei Wechsel des Mediums. Die J774A.1 Kultivierung ohne *S. Enteritidis* verlief ohne Veränderungen der Zellmorphologie (nicht dargestellt).

Die Zellmorphologie von CaCo-2 Zellen war im Gegensatz zu den J774A.1 Zellen heterogen. Die Epithelzellen wuchsen in dichten Zellverbände, deren Übergänge zwischen den einzelnen Zellen kaum zu erkennen waren. Sie bildeten eine feste Zellschicht aus.

Für die CaCo-2 Zellen wurde der zeitliche Verlauf des Infektionsmodells ebenso mikroskopisch beobachtet und die Veränderungen der Morphologie während der Invasion von *S. Enteritidis* dokumentiert. Ähnlich zu den J774A.1 Zellen ließen sich nach der Zellinvasion vermehrt Vakuolen erkennen, welche Bakterien beinhalteten (Abbildung 4.4, t=1 weiße Pfeile). Es wurden Vakuolen in räumlicher Nähe zur Zellmembran und im Zellinneren erkannt, die in Anhäufungen auftraten. Es wurden zudem auch Zellstrukturen dokumentiert, wobei es sich um Lysosomen handeln könnte (Abbildung 4.4, t=1 gepunktete Pfeile). Zum Zeitpunkt t=6 h hatte sich die Morphologie der CaCo-2 Zellen kaum verändert. Vereinzelt wurden Zellen identifiziert, in denen Anhäufungen von Bakterien vorhanden waren (Abbildung 4.4, t=6). Die stäbchenförmigen Salmonellen waren überall in der Zelle zu erkennen, einzeln (Pfeile) oder in Anhäufungen (Ellipsen). Innerhalb der Zelle waren Strukturen zu erkennen, welche auf ein membranumschlossenes Kompartiment hinwiesen (markiertes Rechteck). Mithilfe einer Vergrößerung des Ausschnitts wurde das abgegrenzte Kompartiment deutlich sichtbar, in dem sich mehrere Salmonellen befanden.

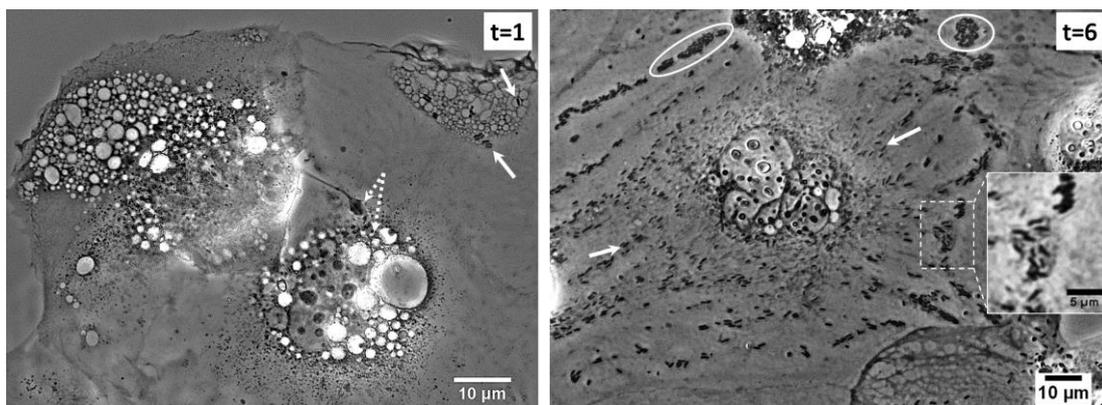


Abbildung 4.4: Zellmorphologie von CaCo-2 Zellen während der Infektion mit *S. Enteritidis*

Es wurden die charakteristischen und morphologischen Auffälligkeiten der CaCo-2 Zellen während der *S. Enteritidis* Infektion untersucht. Die Phasenkontrast-Aufnahmen wurden im zeitlichen Verlauf [h] des Infektionsmodells aufgenommen. Die CaCo-2 Zellformen waren sehr unregelmäßig, alle vitalen Zellen breiteten sich planar aus. Die Epithelzellen wuchsen in dichten Zellverbände, wodurch kaum Übergänge zwischen den einzelnen Zellen zu erkennen waren. Links (t=1) Es sind Salmonellen in Vakuolen der Zelle zu erkennen (Pfeil). Im Zellinneren sind Anhäufungen von Vakuolen und Kompartimente zu erkennen, die auf ein Lysosom hinweisen (gepunkteter Pfeil)

Rechts (t=6) Die Zelle weist eine hohe Anzahl an stäbchenförmigen Salmonellen auf. Die Bakterien treten dabei vereinzelt (Pfeil) als auch in Verbänden (Ellipse) auf. Mehrere Salmonellen waren in einem membranumschlossenen Kompartiment (markiertes Rechteck) vorzufinden. Der Ausschnitt wurde vergrößert dargestellt.

Zudem konnte innerhalb der beschriebenen Zelle eine Bewegung der Salmonellen beobachtet werden. Durch die Umwandlung einer Bildsequenz in eine farbcodierte Abbildung wurde die Bewegung innerhalb der Zelle dargestellt (Abbildung 4.5). Die Richtung der Bewegung wurde durch Farbübergänge von Magenta zu Schwarz sichtbar. In der Nähe des Zellkerns sind Linien zu erkennen (Pfeile), wohingegen am Rand der Zelle in den Anhäufungen (Ellipsen) eine Überlagerung mehrerer Farben entstand und einzelne Bakterien schlecht zu erkennen waren. Die Bewegung dieser Salmonellen war auf den geschlossenen Bereich der Ellipsen begrenzt. In Zellkern-nähe wurden bereits einzelnstehende Bakterien beschrieben, ihre Fortbewegung erfolgte über längere Strecken (Pfeile), die durch die Farbübergänge von Magenta zu Schwarz sichtbar wurden. Die Bewegungen überlagern sich zum Teil, da die Bahnen in zwei Richtungen genutzt wurden, wodurch die Farben aus den Sequenzen 1-75 nicht zu erkennen waren. Die Fortbewegung wurde von der Zelle begrenzt und wurde vorrangig zwischen Zellkern und der neu entstehenden Zelle dokumentiert.

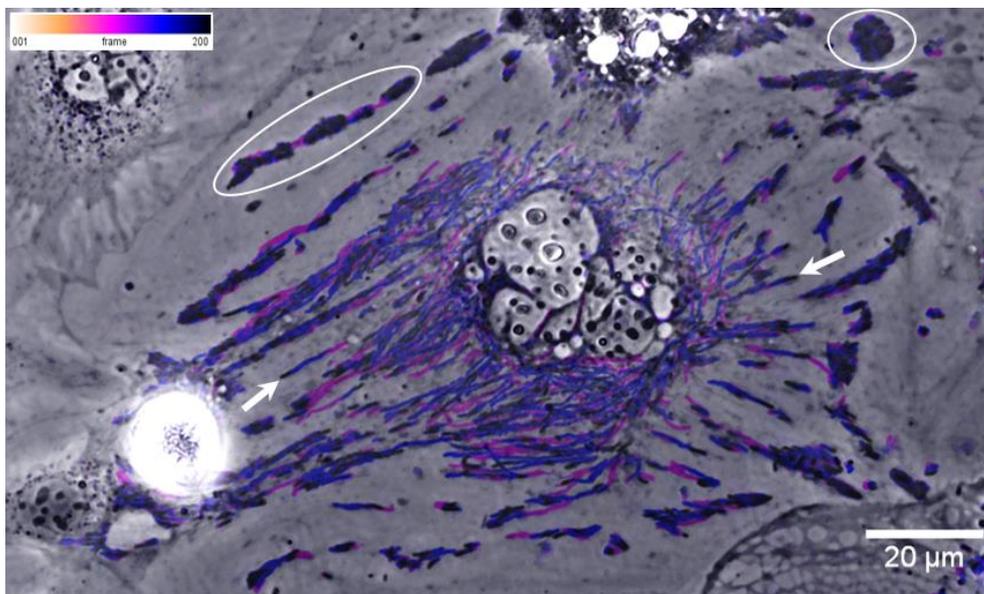


Abbildung 4.5: Bewegung der Salmonellen in CaCo-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation

Zur Darstellung von Bewegung intrazellulärer Salmonellen wurde eine Bildsequenz ($n=200$) mittels einer Funktion zur farblichen Markierung von Fährten in 2D-Bildsequenzen verwendet. Die Farbskala zeigt die Übereinstimmung zwischen Farbe und Einzelbildnummer im farbcodierten Bild.

Es wurden die Fährten der Elemente aufgezeigt, die ihren Ort wechseln. In Zellkern-nähe wurden Linien sichtbar mit Farbübergängen von Magenta bis Schwarz. Die einzelnstehenden Salmonellen befinden sich in diesem Bereich (Pfeile). Die Linien waren ausgerichtet in Richtung Zellkern und der mitotischen Zelle am unteren, linken Rand des Bildes. Am Rand der Zelle, wo vorrangig Anhäufungen von Salmonellen auftraten, wurde eine Überlagerung aller Farben sichtbar. Die Bewegung erfolgte in einem geschlossenen Bereich (Ellipsen). Es wurden wenig Linien wie im Zellinneren sichtbar.

4.1.2. Qualitativer Nachweis für *S. Enteritidis* im Infektionsmodell

Die spezifische Detektion von Salmonellen im Infektionsmodell wurde mithilfe eines eGFP-Plasmides realisiert. Die eGFP Expression zeigte Auffälligkeiten. Es fluoreszierten nur 2/3 der Bakterien, die Wachstumsrate war verlangsamt und einige Salmonellen zeigten eine filamentöse Morphologie auf. Diese Bakterien waren langsamer bezogen auf die Fortbewegung im Medium.

Die Analyse der fluoreszierenden Salmonellen wurde auf ein zeitlich-begrenztes Infektionsmodell ($t_{\max}=2$ h) mit der J774A.1 Zelllinie beschränkt, für die eine höhere Invasionsrate beschrieben wurde. Im ersten Schritt der *Salmonella* Zugabe ($t > 0,5$) bewegten sich die Bakterien frei im Überstand und haften vereinzelt an der J774A.1 Zellmembran. Vereinzelt waren intrazellulär membranumschlossene Strukturen zu erkennen, die fluoreszierten (Abbildung 4.6, $t=0,5$). Im nächsten Schritt wurde das Medium gewechselt und die extrazellulären Bakterien entfernt. Intrazellulär waren stäbchenförmige Salmonellen zu erkennen und fluoreszierende Kompartimente (Abbildung 4.6, $t=1$). Vereinzelte Bakterien lagen extrazellulär vor, diese waren allerdings durch die Gentamicin Behandlung nicht motil. Eine weitere Stunde später ($t=2$) waren immer noch Bakterien intrazellulär zu erkennen, allerdings war die Lokalisation erschwert in den runden J774A.1 Zellen (Abbildung 4.6, $t=2$ h).

Es traten erneut Probleme mit dem frühzeitigen Ablösen vieler Zellen auf. In einem unabhängigen Versuch wurde die Vitalität der J774A.1 Zellen mit Propidiumiodid getestet und mechanischen Beanspruchungen auf ein Minimum reduziert, um ein Abspülen von Zellen zu vermeiden. Es zeigte sich, dass nach 2 h der Infektion 50 % der J774A.1 Zellen angefärbt wurden, nach 3 h mehr als 75 %. Das Eindringen des Farbstoffs erfolgt nur in Zellen mit nicht intakter Membran. Die Vitalität der Zellen ist Voraussetzung, lediglich so ist das intrazelluläre Überleben der Bakterien garantiert.

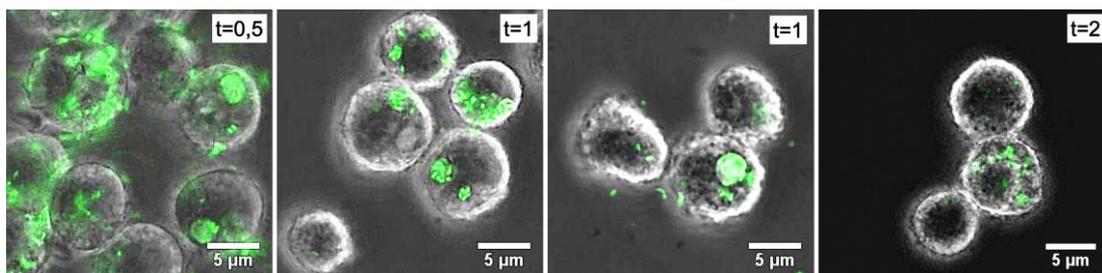


Abbildung 4.6: EGFP- exprimierende Salmonellen während der Infektion in J774A.1 Zellen

Es wurden Salmonellen mit dem Ampicillin tragenden eGFP-Plasmid selektiert und die Analyse der fluoreszierenden Salmonellen im Infektionsmodell in J774A.1 Zellen durchgeführt. Die Infektionszeit wurde in Stunden angegeben. ($t=0,5$) Die Fluoreszenz vom eGFP lässt sich im Überstand, in der Nähe der Zellmembran und intrazellulär detektieren. Intrazellulär sind deutlich membranumschlossene Strukturen zu erkennen, deren gleichmäßiges Fluoreszenzsignal nur innerhalb des Kompartiments erscheint. ($t=1-2$) Die Intensität der Fluoreszenz nimmt im Überstand ab. Intrazellulär sind stäbchenförmige, fluoreszierende Salmonellen zu erkennen und fluoreszierende Kompartimente. Die Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgten in PBS Puffer unter Zusatz von Antibiotikum. Die Phasenkontrast- und Fluoreszenz- Aufnahmen wurden überlagert durch Kombination beider Kanäle.

4.1.3. Quantifizierung des Invasionsverhaltens von *S. Enteritidis* im Infektionsmodell

Die Quantifizierung von *S. Enteritidis* erfolgte mithilfe des Gentamicin-Invasionstests. Hierfür wurde die Anzahl an Salmonellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t= 1, 3$ und 5 h) der Infektion untersucht. Es wurden die Zelllinien CaCo-2 als Wirtszelle getestet. Mit einer definierten Zellzahl von 2×10^4 CaCo-2 Zellen pro Kavität. Das Infektionsverhalten von *S. Enteritidis* in der J774A.1 Zelllinie wurde nicht quantifiziert ($t_{\max}5h$), da kontinuierlich J774A.1 Zellen aus dem System gespült wurden. Doch konnte eine 10-fach erhöhte Invasionsrate bestätigt werden.

Für das CaCo-2 Infektionsmodell wurde zum ersten Zeitpunkt der Untersuchung ($t=1$) 3 % der Bakterien, die zu Beginn zugegeben wurden, in den CaCo-2 Zellen nachgewiesen (Abbildung 4.7). Weitere 2 h später ($t=3$) war die Anzahl intrazellulärer Bakterien verdoppelt. Zum letzten Zeitpunkt der Untersuchung ($t=5$) wurde eine weitere Erhöhung der Bakterienzahl um das 10-fache berechnet. Die Anzahl der Bakterien hat sich von $t=1$ bis $t=5$ um Faktor 25 erhöht.

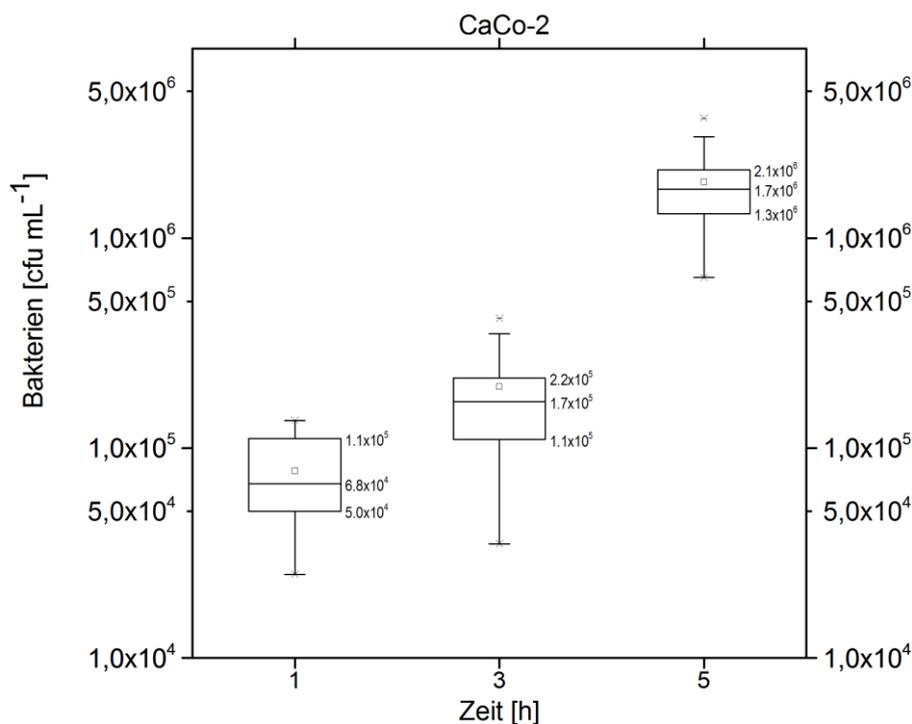


Abbildung 4.7: Logarithmische Darstellung der CFUs im CaCo-2 Infektionsmodell zur Quantifizierung des Infektionsverhalten von *S. Enteritidis*

Quantifizierung der Infektionsrate zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsmodells ($t= 1, 3, 5$). Die Infektion startet mit der Zugabe der Bakterien ($t=0$) mit einer MOI von 1:100. Die Box-Plots haben einen logarithmischen Maßstab und sind definiert mit Maximum und Minimum als Bindestrich, 99 % und 1 % als Kreuz und der Mittelwert als Quadrat. Die Boxen teilen sich mit 25 %, 50 % und 75 % auf, wobei der Strich den Median definiert. Für die CaCo-2 Zellen wurde eine Zunahme der Bakterienzahl von $t=1$ zu $t=3$ um das 2,5-fache und zu $t=5$ um das 10-fache berechnet. Die Versuche erfolgten in 12-well Zellkulturplatten mit je 2×10^5 CaCo-2. Zellen pro Kavität. Je Zeitpunkt wurden 6 biologische Replikate geführt und der Versuch wurde $n=3$ wiederholt.

4.2. Aufschluss des Infektionsmodells zur Gewinnung Virulenz-adaptierter RNA von *S. Enteritidis*

Der Aufschluss der eukaryotischen Zellen erfolgte unter milden Bedingungen mittels Detergenz-basierter Lyse. Die bakterielle Zellwand ist stabiler als die Zellmembran von eukaryotischen Zellen und bleibt intakt. Die Separation von Wirt und Pathogen erfolgt durch eine zweistufige Zentrifugation. In erster wurden grobe eukaryotische Zelltrümmer entfernt (600 x g) und in zweiter erfolgt die Zentrifugation der Bakterien. Für die Untersuchung verschiedener Genexpressionsmuster des Infektionsmodells wurden die Zeitpunkte $t=0,5$ h und $t=6$ h p. i. gewählt. Zum Zeitpunkt $t=0,5$ werden die extrazellulären Bakterien, die nicht in den eukaryotischen Wirt eingedrungen sind entfernt und ohne vorherige Lyse die Bakterien pelletiert.

Die ersten Arbeiten zur Etablierung des Infektionsmodells und des eukaryotischen Zellaufschlusses erfolgten mit der Zelllinie HeLa. Der Zellaufschluss wurde mit der Methode von Eriksson et al. 2003 durchgeführt. Zur Analyse der prokaryotischen RNA wurde die RNA-Integritätsnummer (RIN) bestimmt. Anhand dieses Wertes lässt sich die RNA Degradation ableiten, wobei 1 für degradiert und 10 für intakt steht. Mithilfe der RIN und der graphisch dargestellten rRNA wurde die Reinheit und Qualität der Lysate bewertet (Abbildung 4.8, A). In Reinkultur wurde die RNA aus einer *in vitro* *Salmonella*-Probe und HeLa-Probe aufgezeigt (Abbildung 4.8, *Salmonella* und HeLa). Die Prokaryoten-spezifische Probe weist eine RIN von 6,7 auf und die 16 S und 23 S rRNA erscheinen bei 1500 nt und 2900 nt. Im Vergleich dazu weist die eukaryotische rRNA (18 S und 28 S) eine Größe von 1800 nt und 4700 nt auf. Für die RNA der extrazellulären Salmonellen ($t=0,5$) wurde eine RIN von 5,6 bestimmt (Abbildung 4.8, Extrazellulär) und es lässt sich rein optisch kein Unterschied zu der Reinprobe unter *in vitro* Bedingungen erkennen. Für die RNA, der intrazellulären *Salmonella*-Probe ($t=6$) wurde eine RIN von 3,6 berechnet und die Probe weist Banden oberhalb der Prokaryoten-rRNA auf (Abbildung 4.8, Intrazellulär). Hierbei lassen sich die Bandenmuster der HeLa-rRNA abgeschwächt in der intrazellulären *Salmonella*-Probe wiederfinden. Für die nachfolgenden RNA-Anwendungen ist eine hohe Reinheit erforderlich, daher sollte prokaryotische RNA frei von eukaryotischer RNA sein. Hingegen war die extrazelluläre Probe kaum beeinflusst vom Infektionsmodell.

Die Ergebnisse des Zellaufschlusses haben gezeigt, dass die intrazellulären Proben aus dem Infektions- ähnlichem Modell Spuren eukaryotischer RNA beinhalten. Daher wurde diese Probe mit Oligo (dT) Beads behandelt, um die eukaryotische mRNA via ihres PolyA-Schwanzes zu extrahieren. In Abbildung 4.8, B sind die Ergebnisse nach der Aufreinigung am Beispiel der *in vitro* *Salmonella*-Probe zusammengefasst. Die Fraktion des Durchflusses (Fraktion 1) und des ersten Waschschriffs (Fraktion 2) wurden analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Fraktionen in Bezug auf die RIN und dem Bandenmuster kaum Unterschiede zu der unbehandelten RNA aufweisen. Alle drei RIN-Werte liegen im Bereich von $7,6 \pm 0,3$. Nach Abschluss der Aufreinigung wurde der Verlust des RNA-Gehalts berechnet, dieser beträgt circa 40 %.

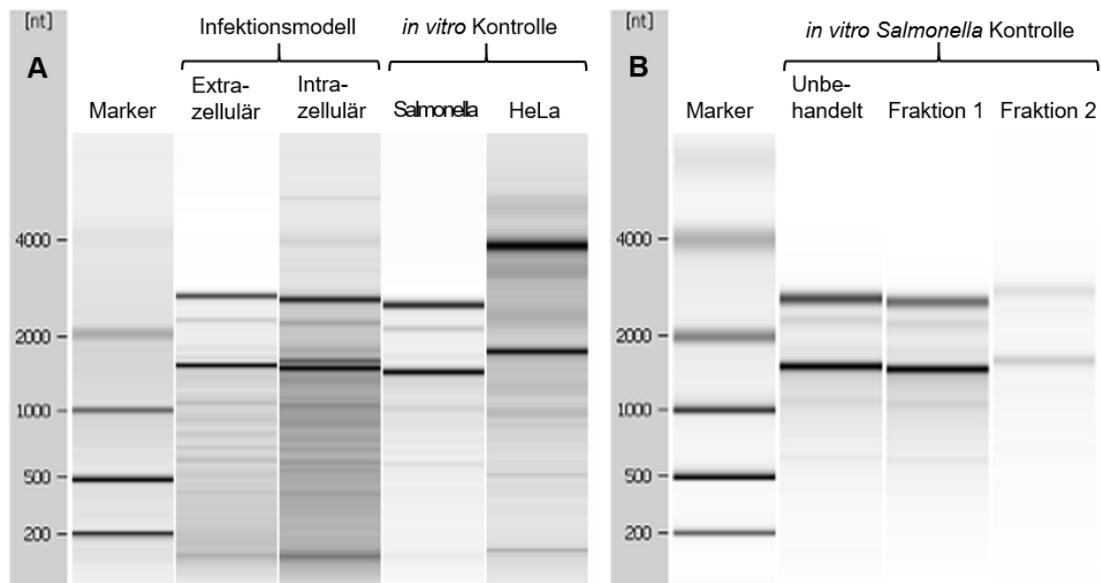


Abbildung 4.8: RNA Extrakte aus den Vorversuchen zum Zellaufschluss in HeLa Zellen (A) und der RNA Qualität nach Oligo (dT) Bead Behandlung (B)

Die RNA-Messung erfolgte mit dem Bioanalytiker (Agilent), der die RNA Integritätsnummer (RIN) berechnet und eine graphische Abbildung erstellt. (A) Das Infektionsmodell wurde mit HeLa Zellen und *S. Enteritidis* durchgeführt und die RNA der extrazellulären ($t=0,5$) und intrazellulären ($t=6$) Bakterien analysiert. Anhand der RIN und dem Bandenmuster der rRNA wurde die Reinheit und Qualität der Lysate bewertet. Die prokaryotische rRNA (16 S und 23 S) ist 1500 nt und 2900 nt groß.

Die Extrazelluläre Salmonella-RNA zeigte das gleiche Bandenmuster wie die *in vitro* Kontrolle (Salmonella). Die RIN beträgt 5,6 und 6,7. Das Bandenmuster der Intrazellulären Salmonella-RNA beinhaltet die Prokaryoten-spezifische rRNA (RIN 3,6) und abgeschwächt auch das Bandenmuster der HeLa rRNA (18 S= 1800 nt und 28 S= 4700 nt). (B) Für die Beseitigung von eukaryotischer mRNA wurden Oligo (dT) Beads eingesetzt, welche am Beispiel von *in vitro* Salmonella RNA getestet wurden. Es wurde unbehandelte RNA gegen die Oligo (dT) Bead Probe des Durchflusses (Fraktion 1 und 2) aufgetragen. Außer einem Konzentrationsunterschied war keine Degradation zu erkennen, die RIN Werte bleiben annähernd gleich bei $7,6 \pm 0,3$.

Für die Entfernung von Resten genomischer DNA nach der RNA Extraktion wurde DNase I eingesetzt. Zum Nachweis geringer Überreste an DNA in den RNA Proben wurden qPCR Messungen durchgeführt. Hierfür wurde das Referenzgen *SEN3772*, Transkriptionsaktivator-RfaH, ausgewählt und die RNA Proben jeweils nach einmaliger und doppelter DNase Behandlung untersucht. Nach einer einmaligen Behandlung wurden CP-Werte von 24 berechnet, was für *S. Enteritidis* $\sim 0,8$ ng genomischer DNA entspricht. Erst die Proben, die doppelten DNase Behandlung erzielten CP-Werte >35 , was einer Probe ohne Nucleinsäuren entspricht. Für die Vermeidung von Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA wurden alle Proben zweimalig mit DNase I behandelt.

4.2.1. Etablierung eines verbesserten Zellaufschlusses

Die CaCo-2 Zellen wurden mittels der Phenol-basierten Methode von Eriksson et al. 2003 durchgeführt. Die extrahierte RNA zeigte eine RIN von 4,6 (Abbildung 4.9, 1). Zudem wies das Lysat eine erhöhte Viskosität auf, die nach der Zentrifugation zu einer erschwerten Phasentrennung führte. Modifikationen wie eine Verkürzung der Inkubationszeit oder ein Wechsel des Puffersystems führten zu keiner Verbesserung.

Alternativ wurden die Zellen mit dem Nuclear/ Cytosol Fractionation- Kit (BioVision) aufgeschlossen, bei dem der cytosolische Anteil vom Nucleus eukaryotischer Zellen getrennt wird. Durch eine Abwandlung des Protokolls (Reduktion der g-Zahl) konnten die Bakterien separat vom Nucleus der eukaryotischen Zelle pelletiert werden. Es wurde beobachtet, dass das Lysat gelartig wurde und nach der Zentrifugation in der ungelösten Fraktion ein Aggregat neben dem bakteriellen Pellet entstand. Die Probe wurde im Gesamten für die bakterielle RNA Extraktion weiterverwendet und erzielte einen erhöhten RIN-Wert von 6,6. Dafür wurden Verunreinigungen mit eukaryotischer RNA im Elektropherogramm sichtbar, die 28 S rRNA (4700 nt) bzw. die degradierte Form bei 4000 nt (Abbildung 4.9, 2).

Bei wiederholter Durchführung wurde das Lysat, das nach Zentrifugation ein Aggregat aufweist, in zwei Fraktionen, Pellet und Aggregat, separiert und analysiert. Die Fraktion des Pellets (Abbildung 4.9, 3) enthält kaum eukaryotische RNA und die RIN beträgt 6,8. Im Vergleich dazu weist die Fraktion des Aggregats (Abbildung 4.9, 4) vorrangig RNA eukaryotischen Ursprungs auf mit einer RIN von 3,5. Mit dem Entfernen des Aggregates wurde eine erfolgreiche Separation der bakteriellen RNA erzielt und dieser Zellaufschluss erzielt deutlich bessere RNA Qualitäten, als die Phenol-basierte Methode.

Für eine Hersteller-unabhängige Anwendung der BioVison Fraktionierung wurde ein selbsthergestellter Lysepuffer eingesetzt. Es sollte einer Verbesserung der Lysat-Konsistenz bewirken, im Besonderen die Aggregatbildung verhindern. Hierfür wurde ein hypotonischer Lysepuffer mit Igepal getestet, welcher dem hypotonischen Extraktionspuffer von BioVison ähnelt. Es wurden zwei Arten der Lyse getestet, *all-in-one* Lyse und die zweistufige Lyse. Vor der Lyse erfolgte die Vorbehandlung der CaCo-2 Zellen mit Trypsin zum Ablösen und nachfolgendem Scheren der Zellen. In beiden Lysaten traten erneut Aggregate auf, welche nicht mit in die bakterielle Extraktion überführt wurden. Die RNA Probe, der *all-in-one* Lyse (Abbildung 4.9, 5), war mit eukaryotischer RNA verunreinigt, aber weist eine RIN von 6,4 auf. Die RNA Probe, der zweistufigen Lyse (Abbildung 4.9, 6) weist keine eukaryotische Verunreinigung auf und die RIN beträgt 6,8. Der zweistufige Zellaufschluss mit Igepal erzielte sehr gute Ergebnisse und wurde als Verfahren zur Cytosol/ Nucleus Fraktionierung eingesetzt.

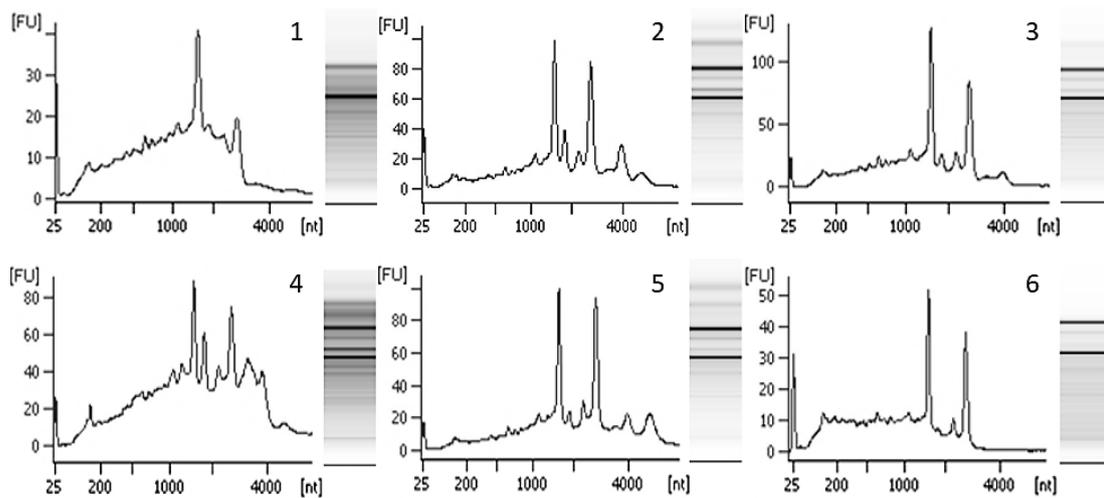


Abbildung 4.9: Optimierung des Zellaufschlusses für CaCo-2 Zellen dargestellt am Elektropherogramm und der Gel-ähnlichen Darstellung der RNA

Das Infektionsmodell wurde mit CaCo-2 Zellen und *S. Enteritidis* durchgeführt ($t=6$) und die RNA, der intrazellulären Bakterien untersucht. Die RNA Messung erfolgte mit dem Bioanalytiker (Agilent) und der Prokaryotischen Analyse.

(1) Phenol-basierte Extraktion: Die RIN beträgt 4,6. Die Degradation wird ersichtlich an der Zunahme an Fragmenten < 1500 nt. (2) Cytosolische Lyse nach BioVision: Die RIN beträgt 6,6; aber es wird eukaryotische 28 S rRNA in degradierter Form bei 4000 nt sichtbar. (3) unlösliche Fraktion der Probe 2. Die RIN beträgt 6,8 und enthält kaum eukaryotische RNA (4) Separation der Probe 2 in die: Fraktion des Aggregates: Die RIN beträgt 3,5 und es ist viel eukaryotische RNA vorhanden (5) Cytosol/ Nucleus Fraktionierung: all-in-one: Die RIN beträgt 6,4 und es sind Spuren eukaryotischer rRNA sichtbar. (6) Cytosol/ Nucleus Fraktionierung: zweistufige Lyse: Die RIN beträgt 6,8 und es ist keine eukaryotische rRNA sichtbar. Das Verfahren zur Cytosol/ Nucleus Fraktionierung wurde zum eukaryotischen Zellaufschluss verwendet.

4.2.2. Voraussetzungen der Virulenz-adaptierten RNA für Downstream Experimente

Für die Untersuchung verschiedener Genexpressionsmuster wurde das *Salmonella* Infektionsmodell untersucht. Das Infektionsmodell stellt die CaCo-2 Zelle und *Salmonella* dar und unterteilt sich in die extrazellulären Bakterien (CN) und die intrazellulären Bakterien (CI). Die *in vitro* (IV) Kontrolle stellt *Salmonella* dar, die in Übernachtskultur in NB-Medium angezogen wurden, 1:100 in NBS-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 gewachsen sind. Unter diesen IV Bedingungen wurden die Salmonellen immer zum CaCo-2 Infektionsmodell gegeben. Es wurde der gleiche Pool an RNA für die Generierung der cDNA Bibliothek verwendet als auch für die RNA-Sequenzierung, da die Daten der Genexpressionsanalyse mit den Daten der Immunscreensings kombiniert wurden. Hierfür wurden 10-15 µg RNA benötigt.

Es wurden drei biologische Replikate (n=3) des Infektionsmodells verwendet (Abbildung 4.10). Die Bakterien aus CN (t=0,5) und CI (t=6) eines Replikates stammen aus der gleichen Versuchsdurchführung. Alle Bakterien wurden mit dem cytosolischen Zellaufschluss extrahiert und die RIN beträgt für alle RNA Proben > 6,5. Die intrazellulären Proben weisen hierbei die niedrigsten RIN Werte auf. Das Replikat 1 zeigt schwache eukaryotische rRNA Banden aber die bakterielle RNA ist kaum degradiert.

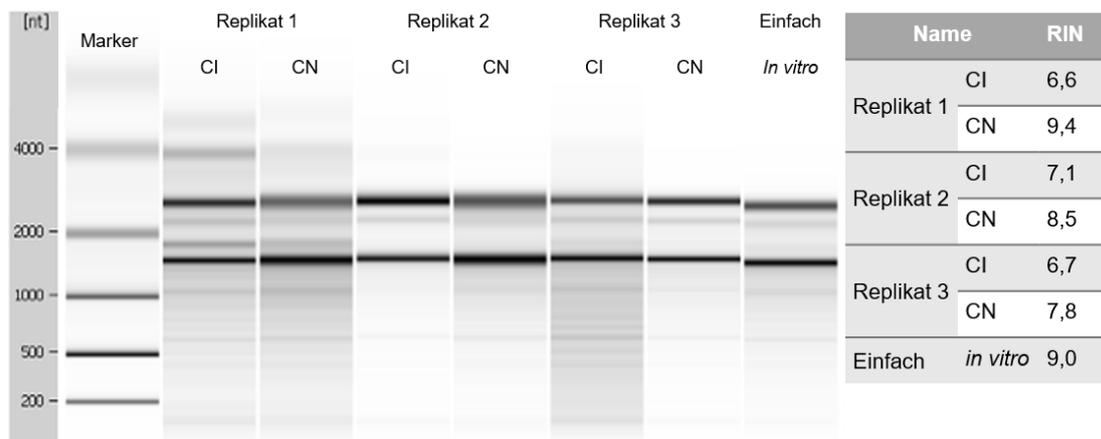


Abbildung 4.10: RNA Proben für die vergleichende Analyse von Genexpressionsprofilen zwischen intrazellulären (CI) und extrazellulären (CN) Salmonella-Proben aus dem CaCo-2 Infektionsmodell

Für die Generierung der cDNA Expressionsbibliothek als auch für die RNA Sequenzierung wurde der gleiche Pool an RNA verwendet. Die *Salmonella* Proben stammen aus dem CaCo-2 Infektionsmodell und der IV (NBS-Medium) Probe, welche die Vorstufe des Infektionsmodells darstellt. Für die Virulenz-adaptierte RNA wurden Replikate (n=3) ausgewählt, wobei CN und CI aus der gleichen Versuchsreihe stammen. Die CN- Proben waren t=0,5 im Infektionsmodell und stellen die nicht-invasiven *Salmonellen* dar. Die invasiven Bakterien waren intrazellulär in den CaCo-2 Zellen (t=6). Die Messung der RNA Qualität erfolgte mit dem Bioanalyzer (Agilent). Für jede Probe wurde der RIN Wert und die graphische Darstellung angegeben.

4.3. Herstellung Virulenz-adaptierter *Salmonella* Expressionsbibliotheken für das Immunscreening via Microarray

Für die cDNA-Generierung wurde für die CN und IV Bibliothek einzelne RNA Proben verwendet (Tabelle 4.8). Aufgrund von Konzentrationsunterschieden wurde für die CI Bibliothek RNA aus drei Replikaten verwendet.

Tabelle 4.8: Deklaration der Bibliotheken und Zusammensetzung des RNA Ursprungs

Bibliothek	Beschreibung	RNA (Kapitel 4.2.2)
CI	intrazelluläre Salmonellen in CaCo-2 Modell	CI RNA: Replikaten 1, 2, 3
CN	nicht-invasive Salmonellen im CaCo-2 Modell	CN RNA: Replikats 1
IV	Salmonellen in NBS-Medium (<i>in vitro</i>)	IV RNA: <i>in vitro</i> Einfach

Die Herstellung der cDNA Bibliothek gliedert sich in die reverse-Transkription und cDNA-Normalisierung. Nach Abschluss der Arbeitsschritte erfolgte die Kontrolle über Probenauftrag auf einem Agarosegel (Abbildung 4.11). Von der Zweitstrangsynthese (A) hin zur Normalisierung (B) nahm der Anteil hochmolekularer Fragmente zu. Der cDNA-Schmier zeigte seine höchste Intensität bei 600-2000 bp. Für eine Anreicherung spezifischer cDNA Fragmente wurde eine Reamplifikation durchgeführt (C). Es wurden vorrangig Fragmente größer 2000 bp sichtbar. Die Verschiebung hin zum hochmolekularen Bereich ist ein Indiz für unspezifische Fragmente. Eine Minimierung der Zyklenzahl und Elongationszeit während der PCR-Amplifikation sowie eine Erhöhung der Startkonzentration zeigten keine Verbesserung.

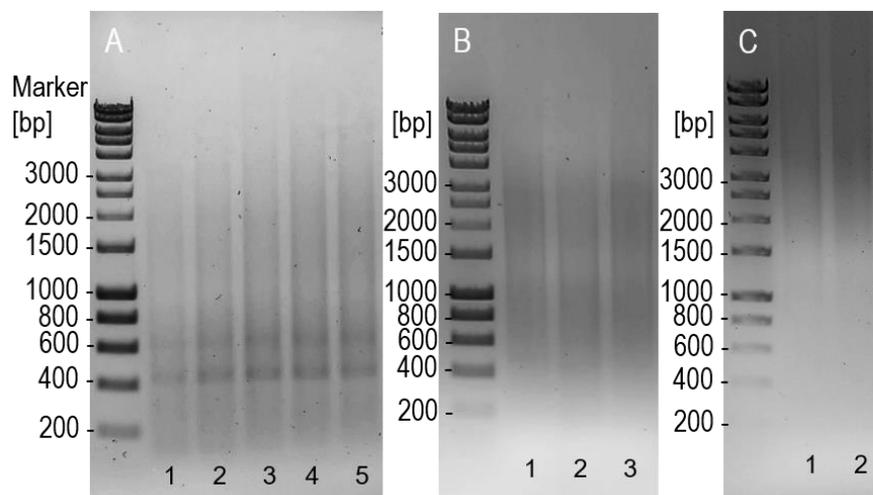


Abbildung 4.11: Reverse Transkription und Normalisierung für die cDNA Bibliotheksgenerierung

Für die reverse Transkription sowohl die Normalisierung der cDNA, welche den Großteil an rRNA minimiert, wurden die Proben nach Reaktionsende auf Agarosegele aufgetragen.

(A) Zyklusoptimierung der Zweitstrang-cDNA-Synthese: A.1: cDNA *Zyklus*₁₂ A.2- 5: cDNA *Zyklus*_{X+3}. Banden, die aus dem Schmier hervorstehen, stellen rRNA dar. (B) cDNA-Normalisierung: nach Duplex-spezifischer-Nuklease (DSN) Behandlung sind keine Banden mehr zu erkennen. B.1-3: DSN-1-, 0,5- und 0,25-fach konzentriert. (C) Reamplifikation der normalisierten cDNA erzeugte unspezifische hochmolekulare Fragmente. C.1: DSN B.1 und C.2: DSN B.2

Für eine Sequenz-spezifische Analyse wurden die cDNA Konstrukte kloniert, transformiert und eine Stichprobe an Klonen untersucht. Es wurden 16 Klone mit Insert sequenziert, wobei 13 der 16 Sequenzen ausschließlich aus Primer-Concatameren bestanden. Die restlichen 3 Sequenzen wiesen ein Insert < 30 bp auf. Das Concatamer besteht aus dem 5' und 3' PCR-Primer (Abbildung 4.12), welche für die PCR Amplifikation der cDNA eingesetzt wurden. Die Untersuchungen waren erschwert, da die Sequenzen für das OligoV und dem abgeleiteten 5'PCR-Primer vom Hersteller nicht angegeben werden. Anhand von Sequenzvergleichen und Literaturhinweisen wurden die Sequenzen dargestellt (Abbildung 4.12).

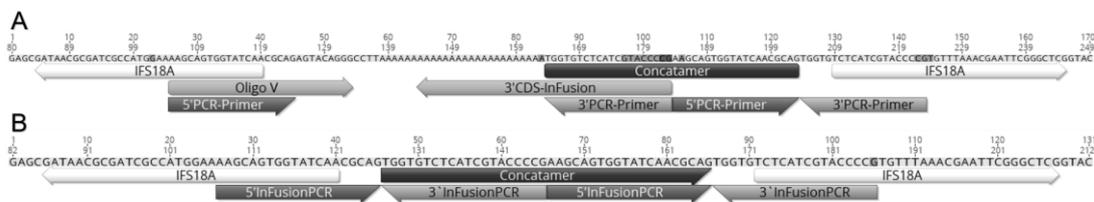


Abbildung 4.12: Darstellung der Concatamer Sequenz am Beispiel zweier cDNA Sequenzen

Die Sequenz der cDNA, wie sie im Plasmid vorliegt, wurde als Ausschnitt dargestellt. Hierbei sind die flankierenden Regionen zum Vektor sichtbar (IFS18A), mithilfe solcher überlappenden Regionen erfolgte die Klonierung vom linearen Vektor und der cDNA Sequenz. Während der Erststrangsynthese wurden die cDNA Fragmente mit dem Primer Oligo V und 3' CDS-InFusion markiert und eine 5'-3' Orientierung geschaffen. Alle darauffolgenden Amplifikationen wurden mit den verkürzten 5' und 3' PCR-Primern durchgeführt. Das Concatamer ist eine Aneinanderreihung der PCR-Primer. Das Auftreten einer Concatamer Sequenzen geht mit dem Verlust Salmonella-kodierender Sequenzen einher. Im Beispiel (A) besteht das Insert vorrangig aus einer PolyA-Sequenz und einem folgenden Concatamer. Im Beispiel (B) besteht das Insert allein aus dem artifiziiellen Concatamer. und tritt vielfach ($n > 1$) in einer cDNA-Sequenz auf.

Die cDNA-Bibliotheksgenerierung lässt sich kurz in die drei Abschnitte, Erststrangsynthese, Zweitstrangsynthese und Normalisierung, gliedern. In allen Abschnitten sind Amplifikationen der cDNA enthalten. Die hochmolekularen Fragmente traten zuerst bei der Normalisierung auf. Für eine spezifischere Amplifikation wurde der 3' PCR-Primer gegen den 3' CDS-InFusion (Erststrangsynthese) Primer ausgetauscht. Dieser ist spezifischer durch die überlappende Sequenz zum PolyA-Schwanz (Abbildung 4.12). Anschließend wurden 10 Klone untersucht und in nur noch 4 Sequenzen wurden Concatameren identifiziert. Die Anpassung zeigte eine geringfügige Verbesserung, allerdings entsteht das Concatamer vermutlich bereits vor der Normalisierung. Deshalb wurde der 3' PCR-Primer gänzlich durch den 3' CDS-InFusion Primer ersetzt. Zudem wurde die cDNA Amplifikation in allen Schritten der Zyklenoptimierung über Gelelektrophorese verifiziert und eine übermäßige Anzahl an Zyklen vermieden. In einer Stichprobe ($n=25$) wurde keine Concatamer-Sequenz mehr identifiziert. Die Modifizierung wurde für die Herstellung aller *Salmonella* cDNA Bibliotheken angewendet.

Die zuvor beschriebene Stichproben-Untersuchung zeigte, dass ein Ungleichgewicht von cDNA Fragmenten, dem Insert, bezogen auf die Sequenzlänge bestand. Es wurden vermehrt sehr kurze Inserts (< 20 bp) identifiziert, welche nicht *Salmonella*-spezifisch sind. Um die

Länge der Inserts zu verbessern wurde eine Größentrennung (> 400 bp) der cDNA Sequenzen durchgeführt. Als vergleichende Analyse zum Größenausschluss wurde die cDNA-Bibliothek ohne Größenausschluss mitgeführt. Die Untersuchung der Bibliotheken erfolgte durch Klonierung, Transformation in *E. coli*, Plasmid-Extraktion und Sequenzierung. Es wurden je Bibliothek 32 Stichproben ausgewählt und die Sequenz des Inserts untersucht, wobei nur die *Salmonella*-kodierende Sequenz betrachtet wurde (Abbildung 4.13). Die durchschnittliche Sequenzlänge beträgt 48 bp für die cDNA ohne Größenausschluss und bzw. 42 bp für die cDNA mit einem Größenausschluss <400 bp. Hingegen wurde für die kodierende Sequenz der cDNA, größer 400 bp, eine durchschnittliche Länge von 225 bp berechnet. Sequenzen kleiner als 20 bp können meist nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden, daher sollte der kodierende Bereich > 20 bp sein. Die cDNA > 400 bp enthält zu 59 % Sequenzen, die Proteine kodieren und größer 20 bp waren (Abbildung 4.13). Die verbleibenden Inserts enthalten Sequenzen, die nicht Proteine kodieren, wie rRNA und tRNA, „zu kurze“ Sequenzen ohne eindeutige Identifizierung, humane und nicht sequenzierbare Sequenzen. Proben unterhalb oder ohne Größenausschluss enthielten weniger als 10 % Protein kodierende Sequenzen. Gleichermäßen stieg der Anteil nicht kodierender Sequenzen bzw. „zu kurzer“ Sequenzen. Der Größenausschluss zeigte eine drastische Verbesserung der entstehenden Bibliotheken und wurde daher für alle cDNA Bibliotheken verwendet.

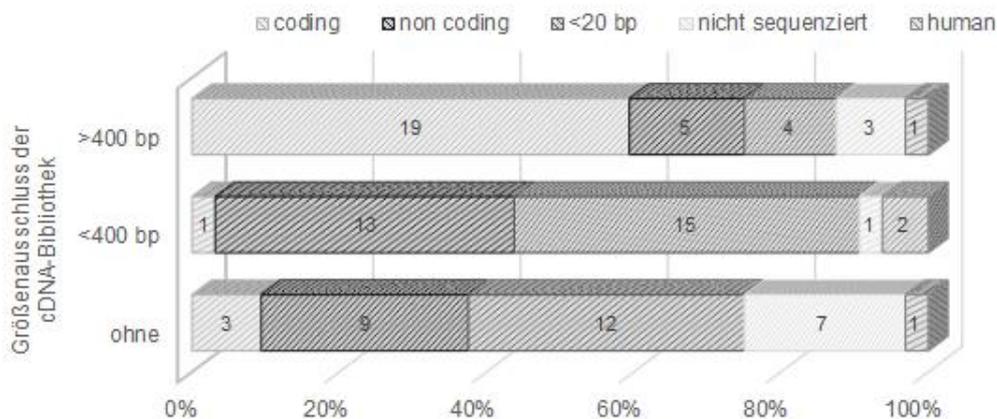


Abbildung 4.13: Optimierung der Expressionsbibliothek durch Klonierung von cDNA Fragmenten mit einem definierten Größenausschluss

Der Größenausschluss der cDNA Sequenzen erfolgte nach Abschluss der cDNA-Generierung und wurde zur Verbesserung des *Salmonella*-spezifischen cDNA-Pools durchgeführt. Hierfür wurden drei cDNA Bibliotheken generiert und miteinander verglichen. Die cDNA ohne Größenausschluss und cDNA mit Größenausschluss (< 400 bp und > 400 bp) wurden untersucht. Es wurden je Bibliothek 32 Stichproben ausgewählt, die Plasmide extrahiert und sequenziert. Die cDNA > 400 bp enthält zu 59 % Protein kodierende Sequenzen. Alle weiteren cDNA Inserts enthalten Sequenzen, die nicht Proteine kodieren, wie rRNA und tRNA, „zu kurze“ Sequenzen ohne eindeutige Identifizierung, humane Sequenzen und nicht sequenzierbare Sequenzen. Für die Bibliothek mit einem Größenausschluss < 400 bp und ohne Größenausschluss wurden hingegen weniger als 10 % Protein-kodieren Sequenzen identifiziert die. Gleichermäßen stieg der Anteil nicht kodierender Sequenzen bzw. „zu kurze“ Sequenzen.

4.3.1. Kriterien zur Identifikation von immundominanten Proteinen

Aus den einzelnen Bibliotheken wurden je 768 Klone für die Immunscreensings verwendet und die Fluoreszenzsignale der Klone bestimmt. Zusätzlich dazu wurden Kontrollen verwendet, wie Vollängenproteine, mit und ohne immunogenen Charakter. Allein Proben mit einem erhöhten Kontrastwert und einer Standardabweichung < 20 % wurden als potentiell immunogen angesehen. In Abbildung 4.14 sind die Kontrastwerte aller 768 Proben aus dem Immunscreening der *in vitro* Bibliothek dargestellt. Als Positivkontrollen wurden *fimA*, die Fimbrien Hauptuntereinheit (Abbildung 4.14, grüner Punkt) und *fljB*, ein Phase- 2 Flagellin verwendet, die bereits als immunogen beschrieben wurden und deren Kontrastwerte 0,72 und 0,57 betragen. Im Gegensatz dazu diente das Protein, *pyrC* eine Dihydroorotase (Pyrimidinbiosynthese) und *gapA*, die Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase A (Glykolyse), deren Kontrastwerte kleiner 0 waren als Negativkontrollen. Für den *E. coli* Hintergrund, das Expressionssystem ohne Plasmid, beträgt der Kontrastwert -0,2 (Abbildung 4.14, rote Raute) und für den Lysepuffer -1. Eine Auswahl von 96 Klonen, die die höchsten Kontrastwerte mit der geringsten Standardabweichung aufwiesen, wurden als potentiell immunogene Proteine angesehen und weitergehend untersucht. In diesem Beispiel umfasst es Klone mit einem Kontrastwert von 0,9- 0,4 (Abbildung 4.14, grauer Rahmen).

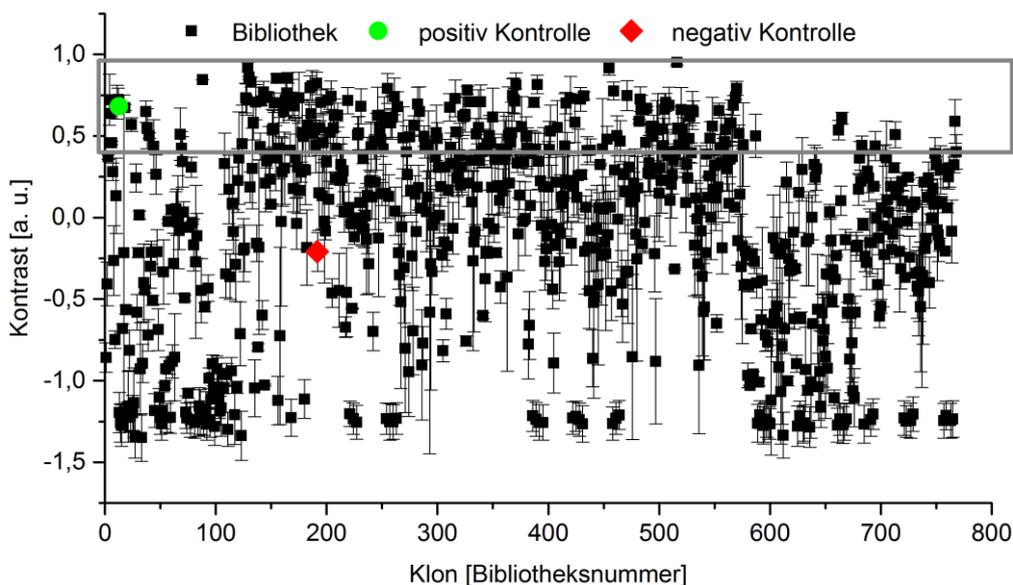


Abbildung 4.14: Identifizierung immundominanter Klone anhand der Kontrastwerte aller 768 Proteine der Salmonella- *in vitro* Bibliothek nach dem Immunscreening (n=3)

Das Immunscreening für die IV Expressionsbibliothek erfolgte auf HaloLink™ Microarrays (n=3) und die Kontrastwerte, welche sich über die Fluoreszenzsignale berechnen, wurden für jeden Klon nach fortlaufender Reihenfolge innerhalb der Bibliothek (n=768) dargestellt. Die Standardabweichung des Kontrastwertes unter den technischen Replikaten (n=3) wurde zusätzlich dargestellt. Als Positivkontrolle wurde *fimA*, die Fimbrien Hauptuntereinheit (grüner Punkt) mit einem Wert von 0,72 und als Negativkontrolle das Expressionssystem ohne Plasmid, mit einem Wert von -0,2 (rote Raute) dargestellt. Die Auswahl an potentiell immunogenen Klonen, welche weitergehend untersucht wurden, wurde durch einen grauen Rahmen markiert.

4.3.2. Identifizierung immundominanter Proteine der *Salmonella* Bibliotheken

Es wurden aus jeder Expressionsbibliothek 96 Klone mit dem besten immundominanten Signal ausgewählt und diese sequenziert. Die Sequenzrecherche zeigte, dass die nicht-invasive (CN) und *in vitro* Bibliothek ein Verhältnis von Genen zu nicht-kodierenden Sequenzen von annähernd 70:30 aufwies (Abbildung 4.15). Zu den nicht-kodierenden Sequenzen in CN/*in vitro* zählen Sequenzen ohne Insert (9%/14%), nicht sequenzierte (16%/5%) und tRNA bzw. rRNA Sequenzen (8%). Diese Art der Falsch-Positiven Sequenzen ließ sich bei der Anwendung nicht zu vermeiden. Das Ergebnis von 70% Genen in der Bibliothek bestätigt die Ergebnisse der cDNA-Optimierung, wobei die Fraktionierung nach Sequenzlänge eine verbesserte Ausbeute an Genen erzielte (Abbildung 4.13).

Für die CI Nr.1- Bibliothek wurde das gegenteilige Verhältnis (20:80) erzielt. Es traten erneut Concatamere auf, die mit 29% den größten Anteil ausmachen. Zudem zeigten 15% der Sequenzen einen humanen Ursprung. Dadurch ist die Ausbeute an *Salmonella*-spezifischen Genen deutlich limitiert und es wurden nur 21% potentielle immundominante Proteine identifiziert. Deshalb wurde im Anschluss CI-RNA eines weiteren Replikates verwendet (nicht aufgeführt), cDNA hergestellt und ein neues Immunscreening durchgeführt (CI Nr. 2). Diese Ergebnisse weisen keine Concatamere auf und konnte daher mit den Bibliotheken CN und IV verglichen werden. Es wurde ein Verhältnis von Genen zu nicht-kodierenden Sequenzen von 55:45 berechnet (Abbildung 4.15, CI Nr. 2). Der Anteil an humanen Sequenzen ist im Vergleich zur CI Nr. 1 erhöht (23%). Dadurch ist der Gesamtanteil an Falsch-Positiven Sequenzen zu CN und IV weiterhin erhöht. Dagegen wurden jedoch ebenfalls mehr als 50% *Salmonella*-spezifische Gene identifiziert.

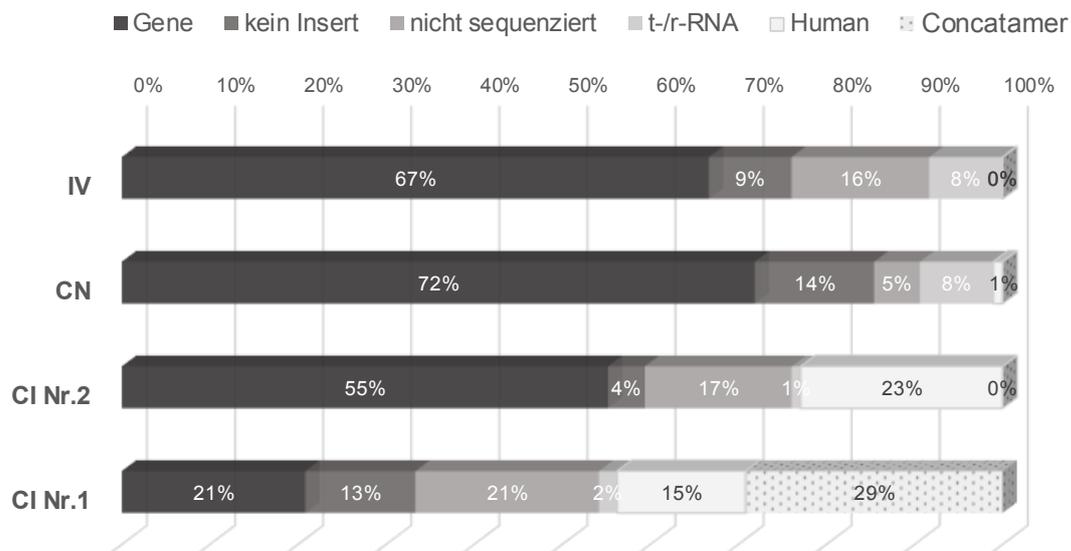


Abbildung 4.15: Prozentuale Darstellung der Sequenzen aus der Top96 der immundominanten Proteine der verschiedenen Expressionsbibliotheken

Die Auswahl der 96 Klone je Bibliothek wurde anhand des Immunscreenings getroffen und zur Identifizierung wurden die Plasmide sequenziert. Für eine vereinfachte Darstellung wurden die Ergebnisse der Sequenzrecherche in Kategorien unterteilt (siehe Legende):

1. Gene= Salmonella-spezifischen Gene
2. kein Insert= Kein Insert bzw. zu kurze Inserts
3. nicht sequenziert
4. t-/r-RNA=Transfer-/Ribosomale-RNA
5. Human= Human-spezifische Sequenz
6. Concatamer= Primer-Concatamere.

Für die Bibliotheken, *in vitro* (IV) und nicht-invasiv (CN), wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Der größte Anteil besteht aus Salmonella-spezifischen Genen (67 %/ 72 %) und die restlichen Anteile setzen sich aus nicht-kodierenden Sequenzen (Nr. 2, 3, 4) zusammen. Die erste invasive-(CI)-Bibliothek wurde von Concatameren dominiert, weshalb eine zweite CI Bibliothek erstellt wurde und das Screening wiederholt wurde. Unter CI Nr.2 wurden die Ergebnisse kategorisiert und 55 % Salmonella-spezifische Gene identifiziert. Der Anteil an Human-spezifischen Sequenzen beträgt 23 %. Wodurch das Verhältnis von Salmonella Genen

Die Analyse der immundominanten Proteine umfasst zudem die Überprüfung des richtigen Leserasters der Inserts. Die cDNA Sequenzen beginnen nicht immer mit dem Startcodon, sondern eine unbestimmte Anzahl an Basen down- oder upstream des Startcodons, wodurch eine Verschiebung des Leserasters zu einem frühzeitigen Abbruch des Produktes führt bzw. ein falsches Produkt gebildet wird. Es wurden auch polycistronische cDNA Sequenzen identifiziert, wodurch das 2. Gen wahrscheinlich nicht produziert wird. Ebenso fügt eine terminale Transferase-Aktivität der Reversen Transkriptase (SMART) zusätzliche Basen am 5'-Ende ein, was zu einem fehlerhaften Leseraster führen kann. Entsprechend der Gesamtanzahl der Gene befanden sich für beide CI Bibliotheken 32 % im richtigen Leseraster, für die CN Bibliothek 28 % und für die *in vitro* Bibliothek 34 % (Tabelle 4.9). Die cDNA-Fragmente in den Plasmiden wurden auf das Vorhandensein von transmembranen Bereichen überprüft. Hierbei wurde nicht das vollständige Protein untersucht, sondern nur das in der Bibliothek vorhandene Fragment.

Tabelle 4.9: 64 immundominante Proteine der CI, CN und IV Bibliothek.

Aufgelistet nach der Größe des cDNA Fragments und der zugeordneten Geninformation (Genname, Locus-tag, Produkt, Größe des Gens [bp])). Entsprechend der cDNA Größe wurde die Position im Protein benannt, N-terminal (Start), C-terminal (Ende), gesamtes Produkt (Voll) oder im Inneren ohne Terminus (-). Der Stern (*) markiert ein Gen, was im falschen Frame war, aber dessen Produkt trotzdem dem Gen entspricht. Zudem wird die Bestimmung von Transmembranen Bereichen mit TMHMM (TM) durchgeführt: cytoplasmatisch (C), Transmembran-assoziiert (M) und Extrazellulär (A).

Gen	Locus-Tag	Produkt	TM	cDNA [bp]	Bereich im Gen	Gen [bp]
Immundominante Proteine der CI Nr.1 Bibliothek						
	SEN1798	cytochrome b	C	477	Ende	531
<i>cypD</i>	SEN0434	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	C	439	-	1872
<i>aspS</i>	SEN1102	Aspartyl-tRNA synthetase	C	269	-	1773
<i>yhjH</i>	SEN3434	conserved hypothetical protein	C	232	Start	768
<i>ssaN</i>	SEN1630	putative type III secretion ATP synthase	C	218	Ende	1302
<i>thrS</i>	SEN1711	Threonyl-tRNA synthetase	C	177	Ende	1929
<i>apaG</i>	SEN0091	diadenosine tetraphosphatase, CorD protein	C	25	Ende	378
Immundominante Proteine der CI Nr.2 Bibliothek						
<i>melR</i>	SEN4068	melibiose operon regulatory protein	C	606	Start	933
<i>mopA</i>	SEN4100	GroEL protein	C	602	-	1647
<i>nuoL</i>	SEN2300	NADH dehydrogenase I chain I	MA	526	Start	1842
<i>gpmA</i>	SEN0717	phosphoglycerate mutase 1	C	523	Ende	753
<i>rplA</i>	SEN3934	50S ribosomal subunit protein L1	C	466	Ende	705
	SEN1679	conserved hypothetical protein	C	373	Ende	411
<i>rbsR</i>	SEN3700	ribose operon repressor	C	372	-	999
<i>arcA</i>	SEN4354	global response regulator	C	307	Ende	717
<i>nuoC</i>	SEN2308	NADH dehydrogenase I chain C	C	292	Start	1803
	SEN_p0048	unnamed protein product	C	289	Ende	942
<i>feoA</i>	SEN3331	putative ferrous iron transport protein	C	228	Voll	228
<i>ybbN</i>	SEN0485	thioredoxin-like protein	C	186	-	855
	SEN_p0041	carbonic anhydrase	C	161	-	741
<i>galT</i>	SEN0720	galactose-1-phosphate uridylyl-transferase	C	115	Ende	1047
<i>alkB</i>	SEN2247	AlkB protein	C	96	Start	651
<i>nuoF</i>	SEN2306	NADH dehydrogenase I chain F	C	85	Ende	1338
Immundominante Proteine der CN Bibliothek						
<i>motB</i>	SEN1081	motility protein B	C	702	Ende	930
<i>cytR</i>	SEN3884	transcriptional repressor	C	672	Start	1026
<i>cheA</i>	SEN1082	chemotaxis protein	C	593	Ende	2016
<i>uvrD</i>	SEN3748	DNA helicase II	C	321	-	2163
<i>ribF</i>	SEN0045	riboflavin biosynthesis protein	C	231	-	939
	SEN1497	glycogen debranching protein	C	229	-	2076
<i>pntA</i>	SEN1570	pyridine nucleotide transhydrogenase α -SU	C	227	Start	1530
<i>fliG</i>	SEN1039	flagellar motor switch protein FliG	C	211	-	996
<i>aroC</i>	SEN2366	Chorismate synthase	C	197	-	1086

ERGEBNISSE

Gen	Locus-Tag	Produkt	TM	cDNA [bp]	Bereich im Gen	Gen [bp]
<i>rplL</i>	SEN3936	50S ribosomal subunit protein L7/L12	C	181	-	366
	SEN1810	SEN1810 (bacteriophage protein)	C	173	Ende	1125
<i>fusA</i>	SEN3274	elongation factor G	C	172	Ende	2115
<i>tdcC</i>	SEN3084	threonine/serine transporter	MA	172	-	1332
<i>rfaB</i>	SEN3541	lipopolysaccharide 1,6-galactosyltransferase	C	154	Ende	1080
<i>dapA</i>	SEN2478	Dihydrodipicolinate synthase	C	130	-	879
<i>ptsI</i>	SEN2413	phosphoenolpyruvate-protein	C	112	Ende	1728
<i>ilvY9</i>	SEN3714	LysR- regulatory protein for ilvC expression	C	88	Ende	888
<i>lgt</i>	SEN2844	prolipoprotein diacylglyceryl transferase	C	37	-	876
<i>lepA</i>	SEN2563	GTP-binding protein lepA	C	32	-	1800
Immundominante Proteine der IV Bibliothek						
<i>glTA</i>	SEN0680	citrate (Si)-synthase	C	742	Ende	1284
<i>imp</i> *	SEN0095	organic solvent tolerance protein	C	550	-	2361
<i>dnaK</i>	SEN0011	DnaK Protein (heat shock protein 70)	C	504	Ende	1917
<i>pspA</i>	SEN1343	phage shock protein A	C	464	Start	663
<i>yabB</i>	SEN0120	conserved hypothetical protein	C	459	Voll	459
<i>gntR</i>	SEN3366	gluconate utilization operon repressor	C	443	Start	996
<i>hflX</i>	SEN4129	HflX protein, putative GTP-binding	C	403	Ende	1281
<i>yjgF</i>	SEN4209	conserved hypothetical protein	C	387	Voll	387
<i>sufC</i>	SEN1674	cysteine desulfurase ATPase component	C	343	Start	747
<i>uvrY</i>	SEN1059	invasion response-regulator	C	289	Start	657
	SEN3403	putative lipoprotein	C	276	-	558
<i>cbiO</i>	SEN2018	cobalt transporter ATP-binding subunit	C	252	-	816
<i>pepT</i>	SEN1822	Aminotripeptidase	C	246	Ende	1230
<i>thiC</i>	SEN3950	thiamine biosynthesis protein	C	243	-	1896
<i>bglX</i>	SEN2160	periplasmic beta-glucosidase precursor	C	218	-	2298
<i>thrS</i>	SEN1711	threonine--tRNA ligase	C	177	Ende	1929
<i>lon</i>	SEN0432	DNA-binding ATP-dependent protease	C	156	-	2355
*	SEN0141	putative lysR- transcriptional regulator	C	129	Ende	942
<i>ftsK</i>	SEN0864	cell division protein FtsK	C	78	-	4122
	SEN1387	Regulator of hokC	C	67	Ende	213
<i>nuoJ</i>	SEN2302	NADH dehydrogenase I chain J	MA	49	Ende	555
<i>rfbB</i>	SEN2093	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	C	44	Ende	1086

Die Analyse zu Homologien der immundominanten Proteine wurde mit NCBI Protein Clusters durchgeführt. Das Attribut „*Conserved in*“ definierte die Homologie innerhalb des taxonomischen Clusters. Die Analyse wurde nur mit Proteinen des richtigen Leserasters durchgeführt. Der Großteil der Proteine ist der taxonomischen Domäne Bakterien zuzuordnen. Es gibt einzelne Proteine, die Homologien zu den zellulären Lebewesen aufweisen, wie das Chaperon GroEL (*mopA*) oder die Uracil Permease (*dapA*) (Anhang A, S.112). Eine nähere Analyse des gesamten Proteins erfolgte mit Proteinen eingegrenzter Homologie in den taxonomischen Klassen: Phylum Proteobacteria, Klasse Gammaproteobacteria, Familie

Enterobacteriaceae und dem Genus *Salmonella* zu finden (Tabelle 4.10). Neben der Untersuchung auf Homologien wurde die subzelluläre Lokalisation ermittelt und die Zuordnung der funktionalen Kategorie anhand des COG (*clusters of orthologous groups*). Das Protein SEN1810, ein cytoplasmatisches Putative Bakteriophagenprotein, kommt nur in *Salmonella enterica* und *bongori* vor. In der Familie Enterobacteriaceae ist FtsK, eine DNA-Translokase, konserviert und stimmt in nur vier Spezies überein (*Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* und *Escherichia coli*). Für die Lipopolysaccharid-1,6-Galaktosyltransferase, RfaB, wurden Homologien zu *Escherichia* Spezies, *Salmonella enterica* und *bongori* sowohl *Citrobacter rodentium/youngae*, *Cedecea davisae*, *Providencia stuartii* und *Pectobacterium wasabiae* zugeordnet.

Tabelle 4.10: Immundominante Proteine, welche konserviert sind innerhalb des Phylums Proteobacteria bis hin zu dem Genus Salmonella.

Mithilfe von NCBI Protein Clusters wurden die Proteine untersucht und die Homologie innerhalb der taxonomischen Klasse zugeordnet. Ferner ist die NCBI Homologie- Identifikationsnummer (NCBI ID) angegeben, der Leseraster (Frame1), die *i* in der Bibliothek (CI/CN/IV), die subzelluläre Lokalisation- (SCL): cytoplasmatisch (C), Membran-assoziiert (M), außerhalb (O), periplasmatisch (P). Mithilfe der COG (*clusters of orthologous groups*) wurden die Proteine in funktionale Kategorien unterteilt: M (Cell wall/membrane/envelope biogenesis), D (Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning), C (Energy production and conversion), P (Inorganic ion transport and metabolism), NU (Cell motility, Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport), L (Replication, recombination and repair), O (Post-translational modification, protein turnover, and chaperones), K (Transcription), G (Carbohydrate transport and metabolism), T (Signal transduction mechanisms), S (Function unknown)

Gen	SCL	COG	Homologie	NCBI ID	Frame 1	Bibliothek
<i>SEN1810</i>	C	S	<i>Salmonella</i>	PCLA_894207		CN
<i>rfaB</i>	C	M	Enterobacterales	PCLA_430219	√	CN
<i>ftsK</i>	CM	D	Enterobacteriaceae	PCLA_6083376	√	IV
<i>SEN1798 (cybB)</i>	CM	C	Gammaproteobacteria	PCLA_3438621	√	CI
<i>SEN_p0048</i>	C	L	Gammaproteobacteria	PCLA_888398	√	CI
<i>cbiO</i>	CM	P	Gammaproteobacteria	PCLA_989462	√	IV
<i>ssaN</i>	C	NU	Proteobacteria	PCLA_210659	√	CI
<i>cypD</i>	CM	O	Proteobacteria	PCLA_431025	√	CI
<i>ybbN</i>	C	O	Proteobacteria	PCLA_879684	√	CI
<i>alkB</i>	P	L	Proteobacteria	PCLA_3275202	√	CI
<i>melR</i>	CM	K	Proteobacteria	PCLA_430638	√	CI
<i>nuoL</i>	CM	C	Proteobacteria	PCLA_417855	√	CI
<i>SEN1497</i>	C	G	Proteobacteria	PCLA_894129	√	CN
<i>cheA</i>	C	T	Proteobacteria	PCLA_3365211	√	CN
<i>pspA</i>	CM	KT	Proteobacteria	PCLA_430939	√	IV
<i>SEN1387</i>	P	S	Proteobacteria	PCLA_512088	√	IV

4.4. Differentielle Genexpressionsanalyse der *Salmonella* RNA

Die RNA-Proben aus je 3 biologischen *Salmonella* Replikaten des CI und CN Infektionsmodells und der einfachen IV *Salmonella*-Probe wurden sequenziert. Insgesamt wurden 111 Millionen *Salmonella* Sequenz-reads (rRNA gefiltert) aus den 7 cDNA Bibliotheken generiert. Für eine erste Übersicht wurde die Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis (PCA)), eine Datenreduktionstechnik, die Varianz in vielen Variablen in einem kleineren, leichter zu bearbeitenden Satz von Variablen erfasst, verwendet. Betrachtet man sich die Konsistenz unter den biologischen Replikaten mittels eines PCA-Plot (Abbildung 4.16, A), so kann man eine Konsistenz innerhalb der Replikate erkennen. Wobei die CI-Proben des CaCo-2 Infektionsmodells am weitesten voneinander abweichen. Die Proben CI 1 und 2 weisen eine höhere Konsistenz zueinander auf als CI 3. Die CN Proben sind sehr ähnlich, wobei CN 2 und 3 sich fast überlagern. Betrachtet man die Korrelation der Gene unter den Probengruppen (Abbildung 4.16, B), so sind sich CI und CN relativ nah und CI und IV ebenso. Der größte Unterschied besteht zwischen CN und IV. Hier wird erneut deutlich, dass das biologische Replikate CI 3 eine differenzierte Korrelation zu den weiteren CI Replikaten aufweist (0,95; rötlich) und zu der CN- Gruppe (0,9; lila).

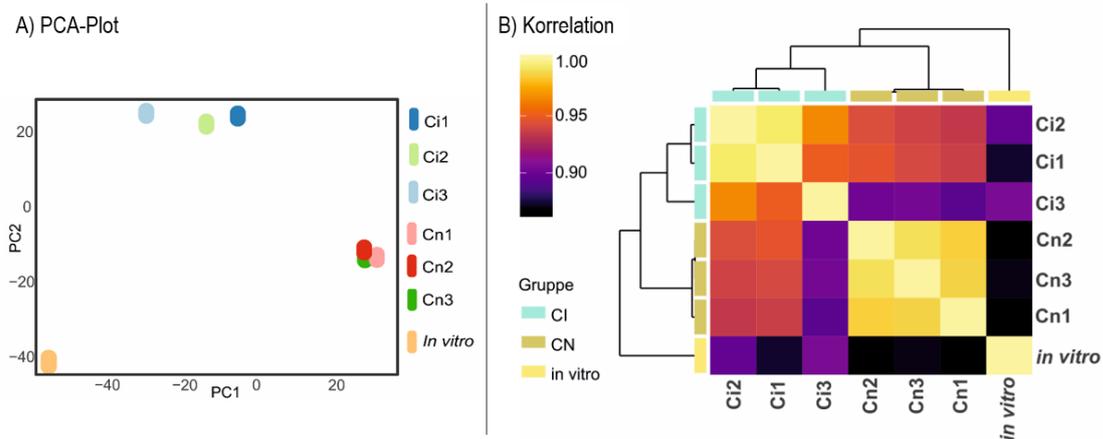


Abbildung 4.16: Darstellung der Ähnlichkeit und Korrelation zwischen den biologischen Replikaten des Infektionsmodells als auch der Transkriptome

A) Mithilfe der vereinfachten Darstellung über die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurden die Daten der einzelnen Bibliotheken in einem Diagramm aufgetragen. Je näher die Proben beieinanderliegen, so konsistenter ist das Genexpressionsmuster. Die biologischen Replikate des nicht-invasiven Infektionsmodells sind sehr ähnlich die Proben CN 2 und 3 überlagern sich annähernd. Die Abweichung ist unter den biologischen Replikaten des invasiven Infektionsmodells deutlich größer, wobei CI1 und 2 näher zueinanderstehen. B) Die Varianz-stabilisierten Daten jeder Bibliothek wurden berechnet und die Korrelation zwischen den Genen anhand einer Farbskala aufgetragen. Die Korrelation unter den biologischen Replikaten ist am größten. Wobei die Probe CI 3 ein leicht abweichendes Genexpressionsmuster aufzeigt. CI und CN korrelieren zu 0,95-0,9; danach folgt CI und in vitro ~ 0,9 und am stärksten weichen CN und in vitro voneinander ab (< 0,9)

Die unverarbeitete Anzahl übereinstimmender Fragmente zum Referenz Genom (P125109) wurde durch die Analyse der differentiellen Expression mittels DESeq, EdgeR und cuffdiff in einen normalisierten Wert, abhängig der Bibliotheksgröße, angegeben. Für die weitergehende Analyse der differentiell exprimierten Gene (DEG) wurde die Berechnung von DESeq verwendet. Diese beinhaltet die größte Schnittmenge an DEGs, die in allen drei Software Programmen als DEG identifiziert wurden und die geringste Anzahl an DEGs, die allein in DESeq vorkommen (Anhang B, S. 113). Die Bezeichnung von DEG erfolgte unter der Bedingung, dass der p-Wert als auch der FDR (*false discovery rate*) kleiner gleich 0,05 ist. Insgesamt wurden 3783 Transkripte bzw. teilweise auch polycistronische Bereiche dem Referenzgenom zugeordnet. Befinden sich Gene sehr nah beieinander oder befinden sich auf überlappenden Bereichen im +/--Strang ebenso, wenn sie durch das gleiche Operon reguliert werden, kann die Zuordnung zu einem Einzelnen Gen nicht eindeutig getroffen werden.

4.4.1. Vergleich der Genregulation zwischen CI-CN-IV und die Zuordnung spezifischer Virulenzfaktoren

Der Vergleich der Transkriptome erfolgte mit den Bezügen CI vs. CN, CI vs. IV und CN vs. IV. In CI vs. CN wurden 1045 DEGs identifiziert, hiervon wurden 682 positiv reguliert und 363 negativ. In CI vs. IV wurden 476 DEG identifiziert und in CN vs. IV 1568. Für einen Vergleich aller DEGs wurde ein Venn-Diagramm erstellt (Abbildung 4.17, A), um die Zuordnung gemeinsamer oder eindeutiger Gene zu erhalten. Die Bereiche in denen sich zwei Kreise schneiden, kann als CI, CN oder CI/CN angesehen werden. In der Mitte befindet sich die Schnittmenge aller Kreise mit 163 DEG, welche als essentiell für die Bakterien im Infektionsmodell angesehen werden können. Als CI-spezifisch wurden 106 DEG identifiziert. Es wurde eine weitere Unterscheidung durchgeführt von DEG, die eindeutig hochreguliert bzw. negativreguliert sind (Abbildung 4.17, B und C). Dadurch werden nicht nur gleiche DEGs identifiziert, sondern auch die gleiche Art der Regulation, wodurch sich die CI und CN spezifischen Bereiche nochmals aufteilen in hoch und herunter regulierte DEGs. Der CI-spezifische Bereich steigt auf eine Gesamtanzahl von 114 DEGs, die essentiell für CI sind und der Anteil positiv regulierter Gene dominiert (Anhang D, S.115). Wiederrum dominieren in CN Gene mit negativer Regulation und die Anzahl der 547 DEGs bleibt relativ konstant (Abbildung 4.17, B und C).

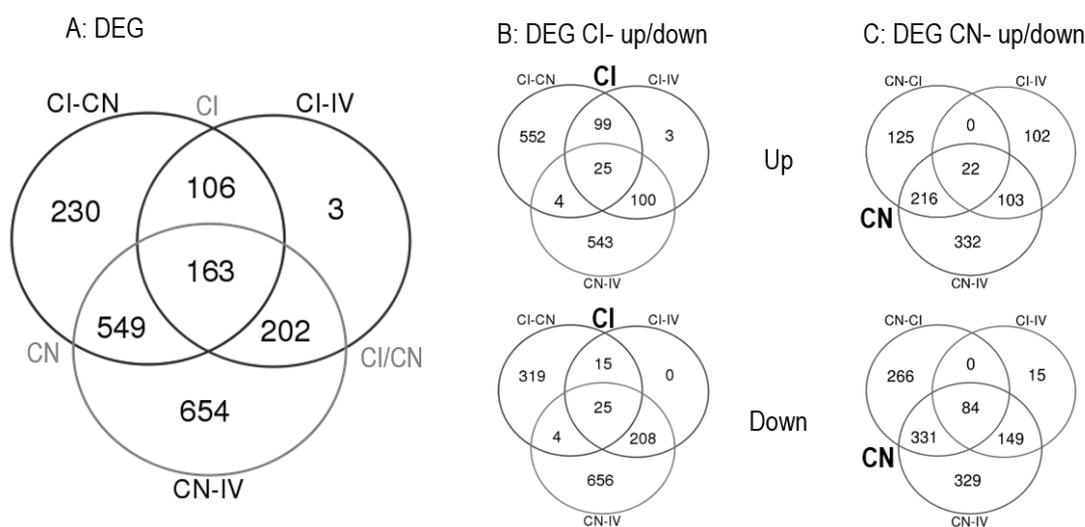


Abbildung 4.17: Venn-Diagramm zur Identifikation von DEGs, die spezifisch sind für CI oder CN

(A) Die Analyse zu Genen, die potentiell spezifisch sind für CI, wurde durch ein Venn-Diagramm verdeutlicht. Hierbei entstehen Schnittmengen an DEGs, welche spezifisch in CI, CN, CI/CN oder in allen drei vorkommen. (B) Ein Vergleich aller DEGs, welche up-reguliert sind bzw. down-reguliert, erlaubt eine weitere Spezifikation innerhalb der Schnittmengen. Die Anzahl CI-spezifischer DEGs steigt von 106 auf 99/15. (C) Die Anzahl CN-spezifischer DEGs unterteilt sich in 216 up-reguliert und 331 down reguliert. Die Schnittmenge aller Kreise sinkt von 163 auf 25/25 für CI und 22/84 für CN. Das Venn-Diagramm wurde mit <http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/Venn-Diagrams> erstellt.

A: CI und CN relevante Gene

Betrachtet man sich die Schnittmenge aller Kreise, so kann diese als essentiell für die Bakterien im Infektionsmodell angesehen werden. Innerhalb der CI-spezifischen Regulation (Abb. B) sinkt die die Schnittmenge aller Kreise von 163 auf 50, wobei 25 positiv und 25 negativ reguliert wurden (Anhang C, S.114). Anhand der Zuordnung in *Clusters of Orthologous Groups* (COG) wurde die DEGs in funktionale Kategorien eingeteilt (Abbildung 4.18). Die Mehrheit der Gene ist in metabolische Prozesse involviert (C, E, F, G, H, P,) gefolgt von Genen für zelluläre Prozesse und Lokalisation (M, O, V), Transkription (K) und ungenügend charakterisierten Genen (S,-). Bei der Kategorie „nicht kategorisiert“ handelt es sich um nicht-protein kodierende DEGs wie nicht-kodierende *small RNA* (sRNA). Wobei die Funktion der sRNA CsrC für Bewegung und Biofilmbildung beschrieben wurde (Anhang C). Anhand der Regulation fällt auf, dass die positive Regulation in der Kategorie anorganischer Ionentransport und Stoffwechsel (P) dominiert. Hierzu gehören die Gene *foxA*, *sfbB*, *sfbC*, *iroD*, *iroN*, *ygiT*, *mgtA*. Wohingegen Gene, wie *dmsA*, *napA*, *napD*, *napF*, *hypO*, *nirB/D*, *fdhE*, *fdoH/I* für die Energieerzeugung und –umwandlung (C) vorrangig herunterreguliert sind.

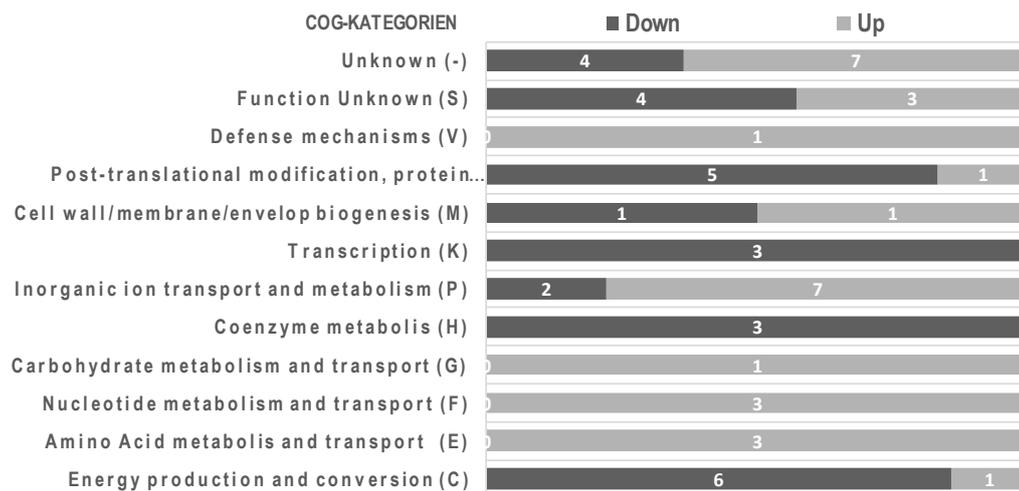


Abbildung 4.18: Infektionsmodell spezifische DEGs (Schnittmenge aller Kreise) unterteilt in COG-Kategorien mit der entsprechenden Regulation

Die COG-Kategorien geben Auskunft über die Funktionalität der Proteine: C (Energy production and conversion), E (Amino acid transport and metabolism), F (Nucleotide metabolism and transport), G (Carbohydrate transport and metabolism), H (Coenzyme metabolis), K (Transcription), M (Cell wall/membrane/envelope biogenesis), O (Post-translational modification, protein turnover, and chaperones), P (Inorganic ion transport and metabolism), V (Defense mechanisms), S (Function unknown) und nicht kategorisiert (-). Im Anhang befindet sich eine ausführlicher Bezeichnung der Gene (Anhang C, S.114).

B: CI-spezifische Gene

Betrachtet man sich die Gen Ontology (GO) bezogen auf die 114 CI-spezifischen Gene, so sind die meisten Gene der Kategorie *metabolic and cellular process* (77) und *localization* (34) zugeordnet. Die dritt größte GO-Kategorie ist *multi-organism process*, welche 26 DEGs umfasst, die für Pathogen-Wirts-Interaktionen relevant sind. Die Aufgliederung der GO-Kategorien auf dem untersten Level ergibt die Hauptgruppen (Tabelle 4.11): Pathogenität (27), Proteinsekretion und -transport (9), Transmembrantransport (7), Transkription und deren Regulation (8) und Metabolischen Prozessen, wie Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängiges Zucker-Phosphotransferase-System (PTS) (3), Biosynthese für Schwefelwasserstoff (3), Stoffwechselprozesse für Stickstoffverbindung (Aminosäuren) (8). Weitere Metabolisch-assoziierte Gene wurden in kleineren Gruppen wie Sulfatassimilation und Acetyl-CoA Stoffwechselprozesse zugeordnet (nicht aufgeführt).

Tabelle 4.11: CI-spezifische DEGs aufgegliedert in GO Kategorie biologischen Prozesse.

Die unterste GO-Stufe gliedert die Gene in Gruppen, wobei die Auflistung der Gene, mit Angaben zum Namen, Locus-Tag und des Produktes erfolgt.

Gen	Locus-Tag	Produkt
GO: pathogenesis		
SEN0876	SEN0876	homologous to secreted protein sopD
sseI	SEN0916	Gifsy-2 prophage; putative type III secreted protein
pipB	SEN0952	Pathogenicity island encoded protein: SPI3
SEN1335	SEN1335	putative inner membrane protein
sseJ	SEN1422	Salmonella translocated effector: regulated by SPI-2
sifB	SEN1454	Salmonella translocated effector: translocated by SPI-2
yscR	SEN1626	Secretion system apparatus:
ssaN	SEN1630	Secretion system apparatus:
ssaL	SEN1633	Secretion system apparatus
ssaG	SEN1639	Secretion system apparatus
sscB	SEN1642	Secretion system chaparone
sseB	SEN1647	Secretion system effector
sseA	SEN1648	Secretion system effector
sscA	SEN1646	Secretion system chaparone
ssaE	SEN1649	Secretion system effector
ssaB	SEN1652	Secretion system apparatus
SEN2269	SEN2269	putative cytoplasmic protein
spaO, P, Q	SEN2730-32	surface presentation of antigens; secretory proteins
invJ,I, B, C	SEN2733-36	surface presentation of antigens; secretory proteins
mgtC	SEN3586	Mg ²⁺ transport protein
GO: protein secretion and transporter (pathogenesis)		
ssaU, T, S,	SEN1623-25	Secretion system apparatus
ssaV, M	SEN1631-32	Secretion system apparatus
ssaK	SEN1634	Secretion system apparatus
ssaJ, I	SEN1636-37	Secretion system apparatus
ssaC	SEN1651	Secretion system apparatus
GO: transmembrane transport		
citT	SEN0587	DASS family, citrate:succinate transport (antiport) protein
smvA	SEN1481	Methyl viologen resistance
SEN2172	SEN2172	putative sugar transporter
pgtP	SEN2385	Phosphoglycerate transport: transporter
uhpT	SEN3602	MFS family, hexose phosphate transport protein

Gen	Locus-Tag	Produkt
phnS	SEN0411	2-aminoethylphosphonate transporter
SEN1417	SEN1417	putative ABC-type transport system
GO: transcription and regulation of transcription		
prpR	SEN0350	regulator for prp operon (EBP family)
SEN0805	SEN0805	putative transcriptional regulator, LysR family
SEN2173	SEN2173	putative transcriptional regulator, LysR family
SEN2967	SEN2967	putative response regulators
lldR	SEN3515	putative transcriptional regulator for lct operon (GntR family)
soxS	SEN4035	transcriptional activator of superoxide response regulon (AraC)
pspB	SEN1344	phage shock protein; regulatory gene
SEN4189	SEN4189	putative cytoplasmic protein
GO: phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system		
yadI	SEN0183	putative PTS enzyme
SEN3593	SEN3593	putative phosphotransferase system (PTS) enzyme IIB
SEN3594	SEN3594	putative phosphotransferase system (PTS) enzyme IIA
GO: nitrogen compound metabolic process		
leuD	SEN0111	3-isopropylmalate isomerase (dehydratase), subunit with LeuC
leuC	SEN0112	3-isopropylmalate isomerase (dehydratase), subunit with LeuD
leuB	SEN0113	3-isopropylmalate dehydrogenase
leuA	SEN0114	2-isopropylmalate synthase
glnK	SEN0444	nitrogen regulatory protein PII
SEN1943	SEN1943	Fels-1 prophage; putative chitinase
yfiD	SEN2573	putative formate acetyltransferase
nirC	SEN3303	FNT family, nitrite transport protein
GO: hydrogen sulfide biosynthetic process		
cysC	SEN2772	adenosine 5'-phosphosulfate kinase
cysN	SEN2773	ATP-sulfurylase, subunit 1 (ATP:sulfate adenylyltransferase)
cysD	SEN2774	ATP-sulfurylase, subunit 1 (ATP:sulfate adenylyltransferase)

Die Betrachtung der 114 CI-spezifischen DEGs in der chromosomalen Anordnung kombiniert mit der Genexpression in CI, CN und IV, so lassen sich spezifisch hoch (99) und herunterregulierte (15) Gene als auch Gencluster unterscheiden. (Abbildung 4.19). Die Farbskala gibt die relative Expression von hoch (rot) bis niedrig exprimiert (blau) an. Von den 114 DEGs gehören 48 Gene zu den 100 am stärksten positiv regulierten Genen zwischen CI und CN. Hierrunter befinden sich Gene die *Salmonella* Pathogenitätsinseln (SPI) zugeordnet werden. Die meisten gehören zur SPI-2 (Rechteck) und SPI-2-Translozierten Genen (*sselJ*, *sifB*, *SEN1335*, *SEN2134*, *SEN0876*, *SEN2269*). Weiterhin wurden Gene aus SPI-3 (*mgtB*, *mgtC*), SPI-5 (*pipB*), SPI-6 (*SEN0288*), SPI-12 (*sspH2*), SPI-13 (*SEN2967*), SPI-14 (*SEN0805*) und die negativ-regulierten Gene SPI-1 (*invB/C/I/J*, *spaO/P/Q*) zugeordnet. Neben den SPIs wurden auch Cluster unbekannter Gene deutlich (gepunkteter Rahmen). Drei davon sind CI-hochreguliert und eins CI-herunterreguliert. Die Gene *SEN2225-SEN2228* sind im Bereich von SPI-12 (*sspH2*) kodiert, wobei diese SPI ausschließlich in *S. Typhimurium* konserviert ist. Es wurden auch regulierende sRNA identifiziert (STnc510, STnc470, isrH/I).

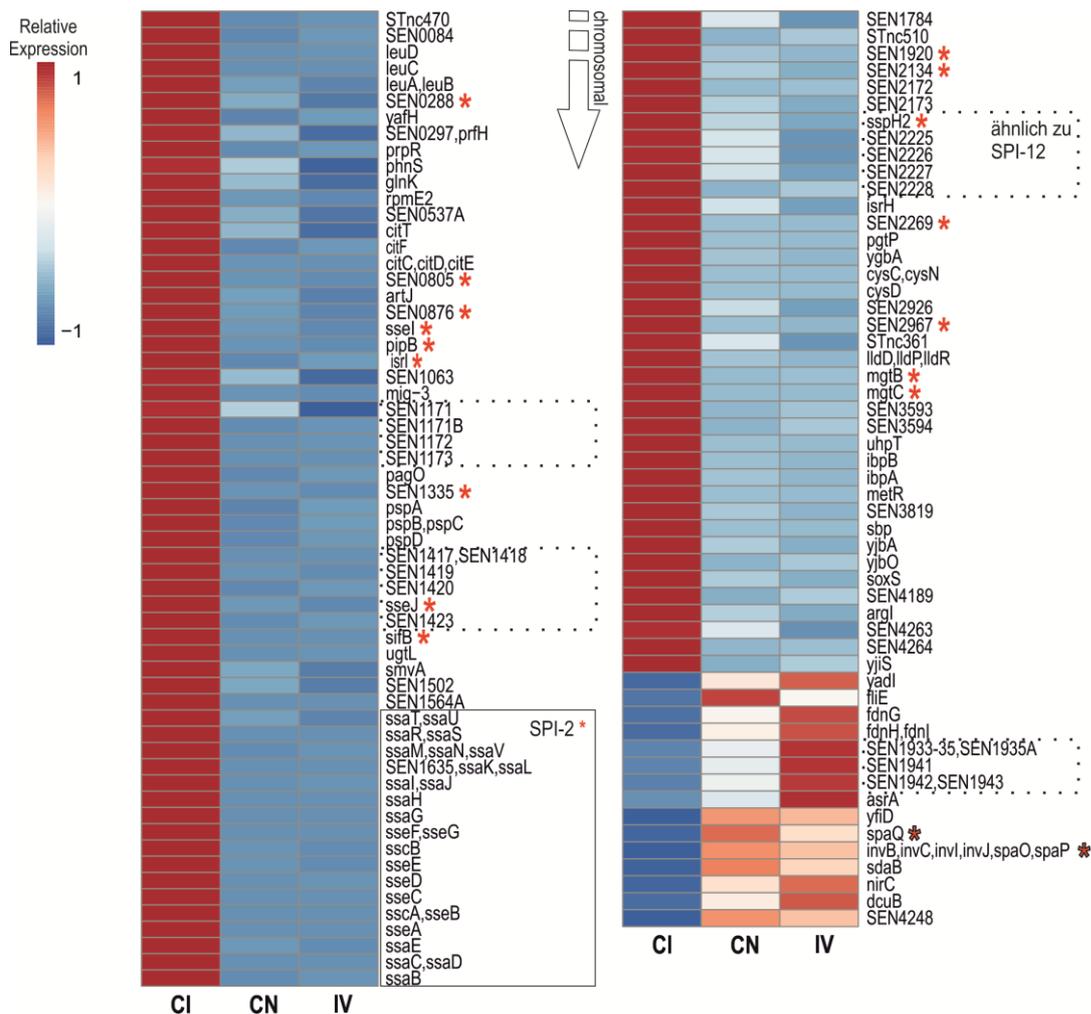


Abbildung 4.19: Heatmap der 114 CI spezifischen Gene für die CI, CN und IV Bedingung

Das Venn-Diagramm hat 114 CI-spezifische DEGs identifiziert, welche über eine Heatmap in chromosomaler Anordnung dargestellt wurden. Die Farbskala gibt die relative Transkriptzahl von hoch exprimiert (rot) bis niedrig exprimiert (blau) an. SPI-relevante Gene wurden markiert (roter Stern). Die SPI-2 Gene dominieren (Rahmen) gefolgt von SPI 2-translozierten Genen (*sseI/J*, *sifB*, *SEN1335*, *SEN2134*, *SEN0876*, *SEN2269*). Ebenso lassen sich Gencluster erkennen, die noch nicht beschrieben wurden bzw. Ähnlichkeiten zu SPI-12 aufweisen (gepunkteter Rahmen). Die Zeilen wurden zentriert, die Skalierung der Einheitenvarianz auf die Zeilen angewendet. Zeilen wurden mit Hilfe von Binärdistanz und durchschnittlicher Verknüpfung gebündelt. DESeq-Werte wurden für die Heatmap Erstellung mit ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) verwendet [149].

B: CN-spezifische DEGs

Die Analyse der 549 CN-spezifischen Gene ist erschwert, aufgrund der großen Anzahl an DEGs, die sich aufgrund der vielen DEGs in CI vs. CN (1045) und CN vs. IV (1568) ergibt. Betrachtet man sich die DEGs mit Bezug zur Art der Regulation so werden 216 hochreguliert und der mehrheitliche Anteil mit 331 DEGs herunterreguliert (Abbildung 4.17, C). Somit dominiert im Vergleich zu CI der negativ regulierte Anteil. Die 216 positiv regulierten Gene erfüllen mehrheitlich Funktionen für Informationsspeicherung und -Verarbeitung (40 %),

gefolgt von Genen für metabolische Prozesse (25 %), ungenügend charakterisierten Genen (20 %) und Genen für zelluläre Prozesse und Lokalisation (15 %) (Tabelle 4.12). Innerhalb der Kategorie metabolische Prozesse überwiegt der Aminosäuretransport, hierzu wurden unter anderem die Gene *ydgI* (Arginin-Antiporter), *yfiK* (Effluxprotein), *pheP* (Phenylalanin-Transporter) und *speD* (S-adenosylmethionin Decarboxylase) zugeordnet. Innerhalb der zellulären Prozesse überwiegt die Biogenese der Zellwand. Hierzu wurden Gene zugeordnet wie *IpxB* (lipid-A-disaccharid Synthase), *mreD* (rod shape-determining Protein), *SEN4028* (ABC Exporter) und *yhjW* (lipid A Phosphoethanolamin Transferase). Innerhalb der Kategorie „Proteine ohne bekannte Funktion“ wurden Lipoproteine wie SEN2428, SEN3512 und SEN4030 zugeordnet.

Tabelle 4.12: CN-spezifisch hochregulierte DEGs untergliedert in ihre COG-Kategorie

Für eine erleichterte Zuordnung der DEGs wurde die COG Kategorie zur annotierten Funktion des Proteins angegeben. Alle 216 hochregulierten DEGs wurden kategorisiert und die Anzahl an Genen in der Gesamtzahl angegeben und die prozentuale Verteilung bezogen auf die Hauptkategorie.

COG- Abk.	COG Kategorie	Anteil	Gesamtzahl an Genen
Informationsspeicherung und -Verarbeitung		40 %	
J	Translation		71
K	Transcription		14
L	Replication and repair		5
metabolische Prozesse		25 %	
C	Energy production and conversion		9
E	Amino Acid metabolis and transport		15
F	Nucleotide metabolism and transport		6
G	Carbohydrate metabolism and transport		11
H	Coenzyme metabolis		2
I	Lipid metabolism		8
P	Inorganic ion transport and metabolism		5
Q	Secondary Structure		1
ungenügend charakterisiert		20 %	
S	Function Unknown		12
-	nicht kategorisiert		32
zelluläre Prozesse und Lokalisation		15%	
M	Cell wall/membrane/envelop biogenesis		15
O	Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions		5
T	Signal Transduction		6
U	Intracellular trafficking and secretion		5
V	Defense mechanisms		2

4.4.2. Regulation der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel SPI-1, SPI-2 und deren Effektoren

Wie zuvor gezeigt wurde sind viele SPI-2 Gene in CI vorhanden und wurden allein in CI hochreguliert (Abbildung 4.20). Deren Expression ist durchschnittlich um das 24-fache erhöht im Vergleich zu IV und CN. Gegenteilige Funktion übernimmt SPI-1. Der Großteil aller Gene ist in CI um das 3-fache negativ-reguliert zu IV und CN. Die Expression ist in CN leicht erhöht außer für die Gene *sicA*, *sipA-sipD*, *sicP*, *sptP* und *prgI* deren Expression ist in IV höher. Neben den SPI-1/2 kodierten Genen sind weitere Virulenz-assoziierte Gene bekannt, die außerhalb von SPI-1/2 kodiert sind. SPI-1 translozierte Effektoren (*sop*) zeigen die höchste Expression in IV, wobei *sopA* und *sopD* ebenso eine erhöhte Expression in CI aufweisen. Die Flagellen (*fli*, *flj*), Chemotaxis (*che*) und Fimbrien Typ-1 (*fim*) Gene sind erhöht in IV vorhanden und in CN/ CI herunterreguliert. Wobei *fljB* eine erhöhte Expression in CI aufweist. Die SPI-4 (*SEN4026-29*, *SEN4030*, *SEN4032*) wird durch SPI-1 (*hilA*) reguliert und weist ein CN-spezifisches Expressionsmuster auf. Effektoren von SPI-1/2 sind vorrangig in CI hochreguliert. Die Effektoren von SPI-2 zeigen eine erhöhte Expression in CI auf, ebenso wie die SPI-2 kodierten Gene. Die Virulenzfaktoren *pagC/D/K*, die durch das 2-Komponenten-System PhoP/Q reguliert werden, sind erhöht in CI. Weitere Regulatoren, wie *phoB/R* und *ompR/envZ* sind entweder in IV oder CI hochreguliert.

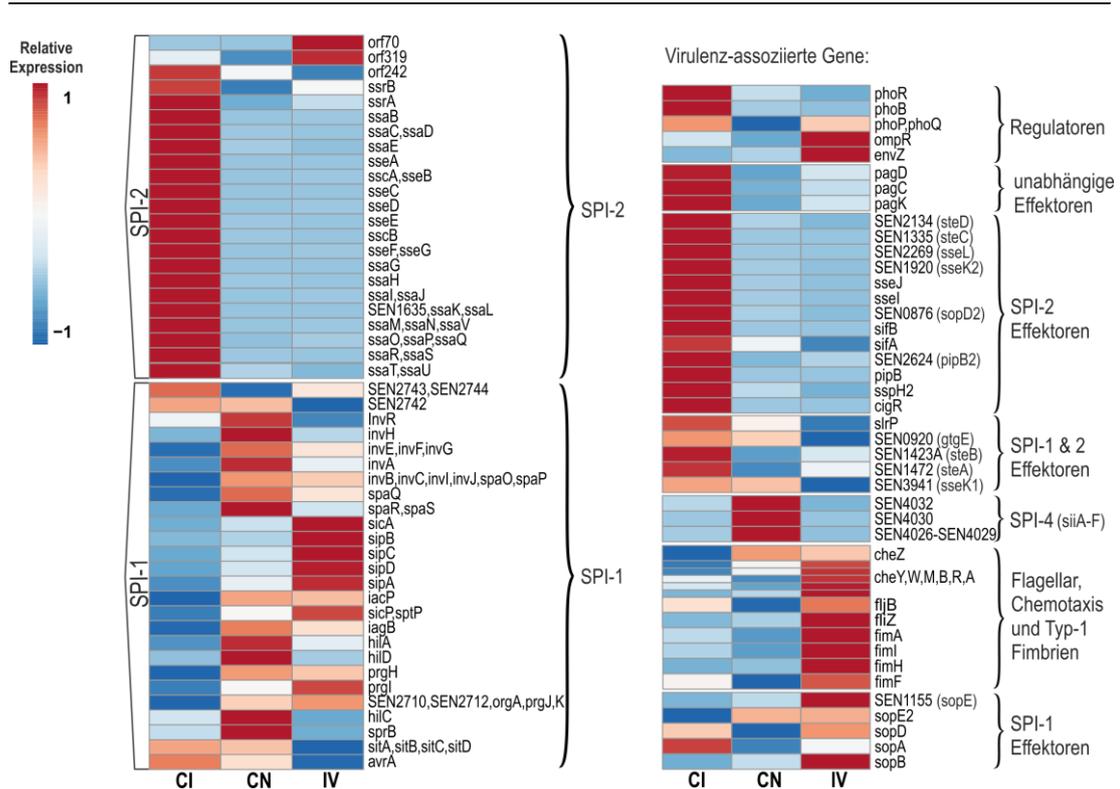


Abbildung 4.20: Heatmap der relativen Genexpression von SPI-1 und SPI-2 sowie Virulenz-assoziierten Genen in CI, CN und IV

Die SPIs übernehmen spezifische Funktionen und SPI-1/2 haben besondere Relevanz für die Wirtsinteraktion. Der Vergleich beider Genexpressionsmuster zeigt, dass die SPI-2 essentiell in CI ist und keine Funktion in CN oder IV übernimmt. Gegensätzlich dazu ist die SPI-1 Expression in CN und IV hochreguliert und teilweise auch in CI. Durchschnittlich sind die SPI-2 kodierten Gene 25-fach hochreguliert und die SPI-1 3-fach herunterreguliert in CI zu CN und IV. Neben den SPI-1/2 kodierten Genen sind weitere assoziierte-Gene aufgelistet, die nach ihrem Expressionsmuster als CI (SPI-2 Effektoren) oder CN spezifisch (SPI-4) zugeordnet wurden. Viele der SPI-1 assoziierten Gene sind in IV hochexprimiert (SPI-1 Effektoren). Die Farbskala gibt die relative Transkriptzahl von hoch exprimiert (rot) bis niedrig exprimiert (blau) an. Die Zeilen wurden zentriert, die Skalierung der Einheitenvarianz wurde auf die Zeilen angewendet und mit Hilfe von Binärdistanz gebündelt. DESeq-Werte wurden für die Heatmap Erstellung mit ClustVis (<https://bit.cs.ut.ee/clustvis/>) verwendet [149].

4.4.3. Regulation des *Salmonella*-Virulenzplasmids

Unabhängig zur Differentiellen Genexpressionsanalyse des Chromosoms wurde auch der Virulenzplasmid (pSEN) untersucht. Hierfür wurde das Verhältnis (Log₂-Wert) zwischen der relativen Expression zwischen CI, CN und IV verglichen (Abbildung 4.21). Drei Gencluster fallen aufgrund einer gegensätzlichen Regulation auf. Die Gene *SEN_p0006-11* sind am meisten in CN gefolgt von IV hochreguliert, wobei *SEN_p0007* am stärksten reguliert wurde. Es kodiert das Membranprotein, Rck (*resistance to complement killing*). Die Gene *SEN_p0006* und *SEN_p0010* sind Transkriptionsregulatoren, *SEN_p0008* und *SEN_p0011* sind hypothetische Proteine und *SEN_p0009* kodiert für eine Protein-Disulfid-Isomerase.

Die CI-spezifischen Cluster sind *spvA-D* und *SEN_p0038-42*, deren Expression in IV am höchsten ist. Das Gencluster *spv* kodiert Virulenz-Proteine. *SEN_p0038-42* ist nicht näher beschreiben, es beinhaltet eine ATPase, zwei Transposasen, eine Carboanhydrase (mig-5 analog) und ein uncharakterisiertes Protein. Die Gene *SEN_p0053* und *SEN_p0016* wurden in IV nicht exprimiert. Letzteres kodiert für das Fimbrienprotein PefB, was gegensätzlich zu PefA in CI erhöht nachgewiesen wurde.

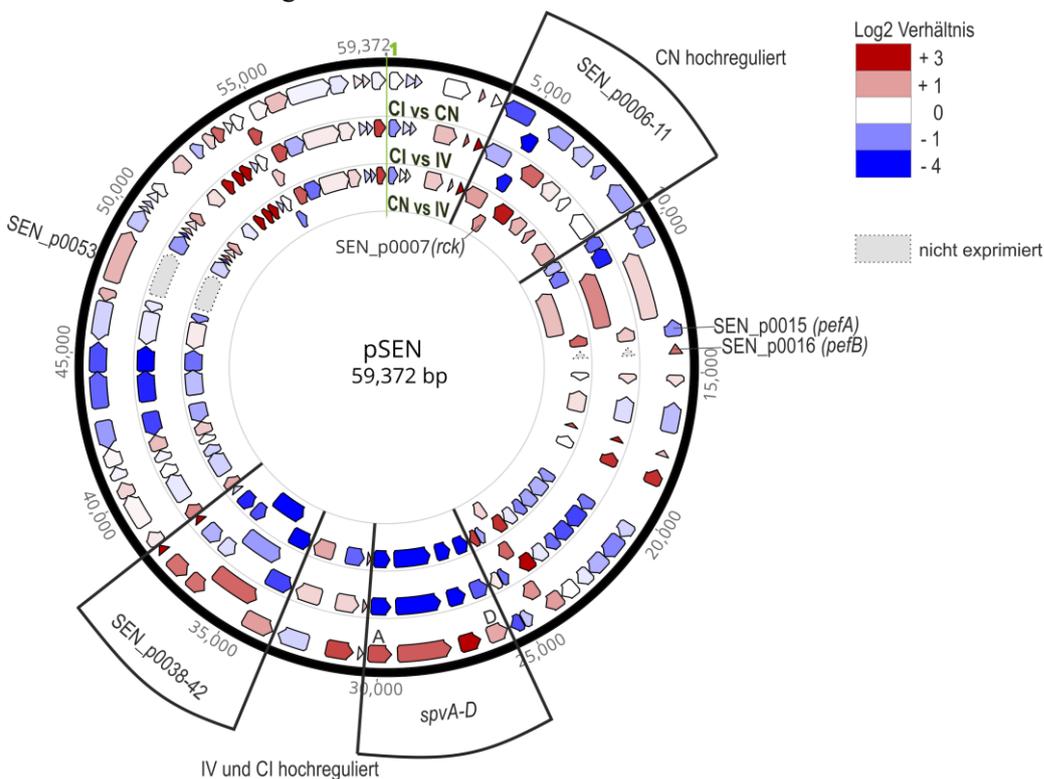


Abbildung 4.21: Heatmap der relativen Genexpression des Virulenzplasmids pSEN in CN, CI & IV

Es wurde die Differentielle Genexpressionsanalyse für den Virulenzplasmids pSEN durchgeführt, wobei nur zwei Bezüge miteinander verglichen werden können. Die Gene wurden als Pfeile dargestellt, deren Farbe die Regulationen (Log₂Wert) anhand der Farbskala wiedergibt. Der pSEN Plasmid von *Salmonella Enteritidis* ist ~60 kB groß und die Gene sind nachfolgend beginnend bei 1 bp (grün) bis 59372 bp einem Locus-Tag (*SEN_p0001-0071*) zugeordnet. Die Gene *SEN_p0006-11* wurden vorrangig in CN hochreguliert, wiederum sind *spvA-D* und *SEN_p0038-41* in CI und IV gegenüber CN höher exprimiert. Nicht exprimiert in IV wurden *SEN_p0053* und *SEN_p0016* (*pefB*).

4.4.4. Gene mit alleiniger Expression unter Virulenz-adaptierten Bedingungen

Bei dem Vergleich der Transkriptome wurden eine große Anzahl an Genen ohne Expression in IV identifiziert, in CN waren es 93 Transkripte und in CI 100. Keine oder kaum Expression wurde mit einer DESeq-Zahl < 20 definiert. Hierbei wurden 25 Transkripte identifiziert, die sowohl in CI als auch CN vorhanden waren, aber nicht in IV. Dabei wurden 8 sRNA-Sequenzen, 9 Pseudogene und 14 Gene den Kategorien zugeordnet (Tabelle 4.13). Allerdings wurden viele Transkripte in geringer Zahl identifiziert (< 100). Die meisten Gene waren um das 8-16-fache hoch reguliert (log₂FC 3-4). Die stärkste Regulation wurde für RyhB-1 berechnet (log₂FC 9) einer nicht-kodierende sRNA, gefolgt von sRNAs Spot_42 und RyhB-2.

Tabelle 4.13: Transkripte, die nur unter Virulenz-adaptierten Bedingungen exprimiert wurden.
Die Namen wurden als Locus-Tag oder Gennamen angegeben, nachfolgend wurde die Kategorie des Transkripts, Produkt, die DESeq-Anzahl für CI, CN und IV und das Log₂FC Verhältnis zu IV aufgelistet. Zahlen mit Stern (*) markieren Fragmente deren FDR-Wert > 0,05 ist. (PI=pathogenicity island)

Name	Kategorie	Produkt	Anz. CI	Anz. CN	Anz. IV	Log ₂ FC CI CN/IV
SEN0276, SEN0277	Gen (SPI-6)	hypothetical PI protein, exported PI protein	51	65	0	-
SEN0329	Gen	possible outer membrane protein	33*	35	7	2 2
SEN0330	Gen	possible transcriptional regulator	88	71	4	3 3
SEN0501	Gen	probable metabolite transport protein	136	65	4	4 3
SEN1008	Gen	hypothetical protein (ROD9)	33*	35	0	-
SEN1388	Gen	Phagenprotein	119	139	7	3 3
SEN1990	Gen	putative DNA-binding protein (ROD21)	276	125	7	4 3
SEN2355	Gen	predicted bacteriophage protein	58	48	0	-
SEN3113	Gen	hypothetical protein	96	96	0	-
SEN4091	Gen	putative exported protein	110	310	4	4 5
stbA	Gen	probable fimbrial protein	29*	26	0	-
SEN0308	Pseudogen	-	41*	29	7	3 2
SEN1141	Pseudogen	-	147	263	5	4 4
SEN2380A	Pseudogen	-	204	110	4	5 4
SEN2742	Pseudogen	SPI-1	78	70	2	4 4
SEN3476A	Pseudogen	transposase	27*	29	7	2 2
SEN3476B	Pseudogen	-	77	42	0	-
SEN4084	Pseudogen	hypothetical protein	241	222	5	4 4
SEN4243A	Pseudogen	-	196	98	7	4 2
ytgA	Pseudogen	Ähnlichkeit zu ytgA	288	286	7	4 4
isrC	sRNA	Hfq binding RNA	227	188	4	5 4
RyhB-2	sRNA	-	1562	150	0	-
RyhB-1	sRNA	-	6450	3054	5	9 8
Spot_42	sRNA	-	398	469	7	5 5
sroD	sRNA	-	11*	67	0	-
STnc170	sRNA	-	34*	28	0	-
STnc420	sRNA	-	32*	30	0	-
STnc490k	sRNA	Hfq binding RNA	76	73	2	4 4
SEN_p0016	Gen(pSEN)	transcriptional regulator PefB	600	239	0	-
SEN_p0053	Gen(pSEN)	chromosome partitioning protein ParB	155	83	18	2 1

4.5. Vergleich zwischen Virulenz-adaptierter CI/CN und IV-Expressionsbibliothek

Für die *Salmonella* Bibliotheken des Infektionsmodells wurde unabhängig von der Immundominanz eine große Anzahl an Genen identifiziert, die in der Expressionsbibliothek vorkommen. Wie in Kapitel 4.3.2 (S. 50) beschrieben, wurden der CN Bibliothek 81 Gene und CI Bibliothek (Nr.1 und 2) 26 und 63 Gene zugeordnet. Für eine annähernd gleiche Anzahl an Genen zwischen den Virulenz-adaptierten Bibliotheken, wurden alle CI-Gene vereinigt. Im nächsten Schritt wurden die Genexpressionsdaten der RNA-Seq-Analyse verwendet, um den Genen der Expressionsbibliothek ihre relative Genexpression zuzuordnen. Im Genexpressions-Datensatz liegen die Anzahl der Rohdaten je Replikate vor, die daraus normalisierte Anzahl (DESeq) und der \log_2FC -Wert (DESeq). Der Vergleich der 81 Gene aus CN bzw. 89 Gene aus CI erfolgte in Bezug auf IV mithilfe des logarithmischen fold change (LFC) Wertes. Damit kann eine Aussage über die Genregulation und im weiteren Sinne auch über die relative Häufigkeit von Transkripten in der Virulenz-adaptierten Bibliothek getroffen werden.

In der CN-Bibliothek waren 33 % der Gene hochreguliert, was einem Verhältnis der relativen Transkripte (CN/IV) von $\log_2FC > 1$ entspricht (Abbildung 4.22, A). Das stärkste hochregulierte Gen war *fhuA* (Nr. 6; \log_2FC 5,8), der Ferrichrom-Eisen-Rezeptor, mit einer 56-fach erhöhten Genexpression und einer durchschnittlichen Anzahl von 16982 (Anhang E). Der Großteil an Genen (58 %) wurde nicht oder kaum reguliert. Das entspricht einem Verhältnis von kleiner 1 und größer -1. Negativ reguliert wurden 9 % der Gene. Das stärkste negativ-regulierte Gen war *SEN1497* (Nr. 25; \log_2FC -5,8), ein putative Glykogen-debranching-Enzym, welches 56-fach weniger vorhanden war und eine durchschnittliche Anzahl von 304 aufwies (Anhang E, S.118).

Für die CI Expressionsbibliothek wurden 89 Gene auf ihre relative Genexpression untersucht (Abbildung 4.22, B). Hierbei zeigte sich, dass der Anteil zwischen positiv und negativ regulierten Genen gleich groß war (18 %). Der Großteil der Gene (64 %) wurde wie bei der CN-Bibliothek nicht oder kaum reguliert. Das stärkste hochregulierte Gen war *sitA* (Nr. 61; \log_2FC 5), ein Eisen-Transportprotein, welches 32-fach hochreguliert war im CI Zustand im Vergleich zu IV. Das stärkste negativ regulierte Gen ist *nuoK* (Nr. 54; \log_2FC 2,6), die NADH Dehydrogenase I (Untereinheit K), wobei es nur 7-fach runter reguliert wurde. Hierbei liegen die meisten negativ regulierten Gene im Bereich > -2 . Eine stärkere negative Genregulation (< -2) trifft nur auf 7 % zu, was ähnlich zur CN-Bibliothek ist.

Für die Genexpression der 75 Gene der IV-Expressionsbibliothek wurde das Verhältnis der Transkriptome IV zu CN betrachtet wurde. Es ergibt sich ein ähnliches Verhältnis zu der CN-Expressionsbibliothek. Es wurden 37 % hochreguliert, 50 % kaum und 13 % negativ reguliert (Anhang G, S.122).

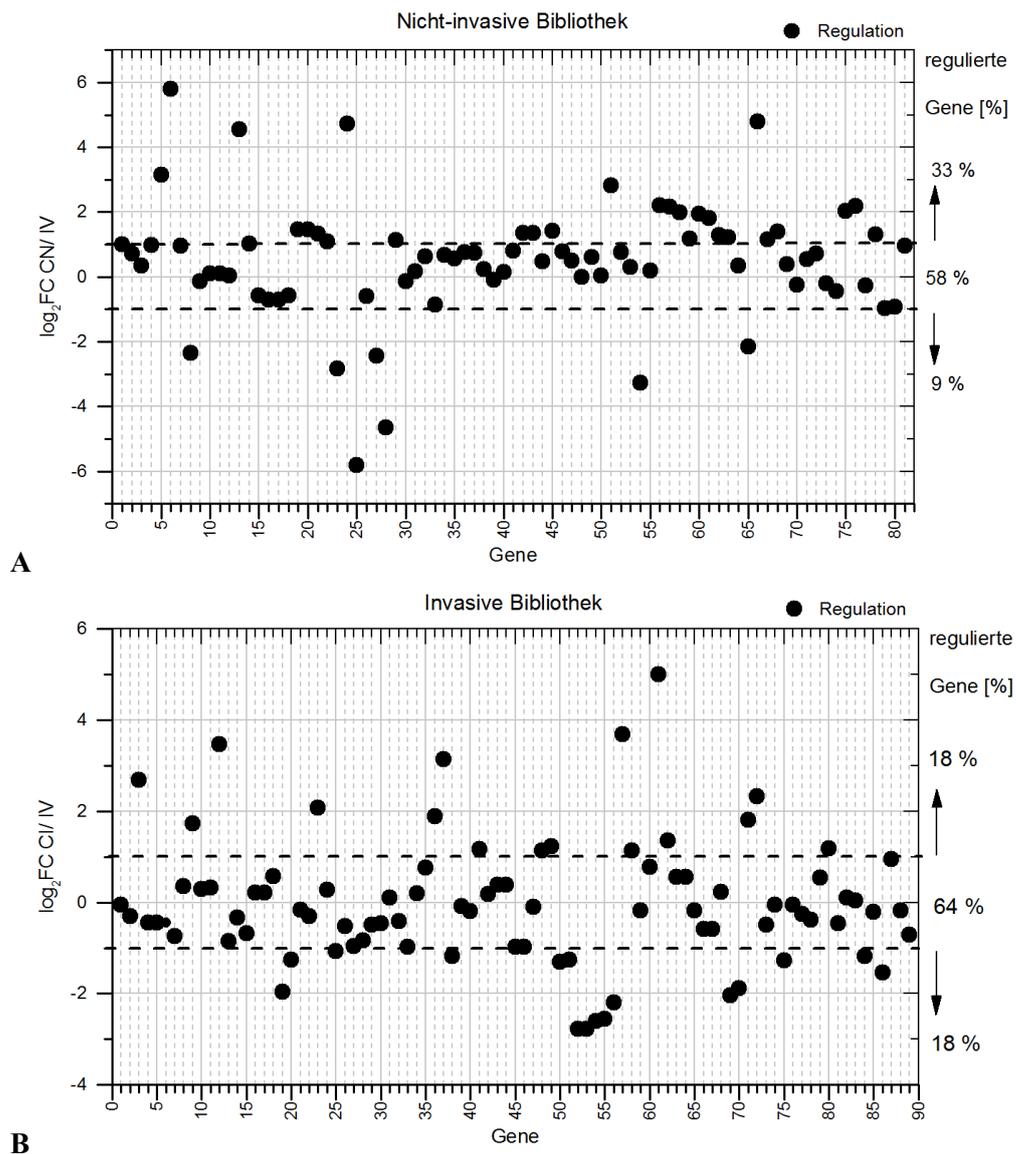


Abbildung 4.22: Relative Genexpression der CI und CN Expressionsbibliothek

Es wurden die Genexpressionsdaten (DESeq) der Transkriptom-Analyse für die 81 Gene der CN (A) bzw. 89 Gene der CI-Bibliothek (B) kombiniert, um die Genregulation zwischen den Bedingungen des Infektionsmodells CN bzw. CI zu IV zu bestimmen. Hierfür wurde das logarithmische Verhältnis der relativen Transkriptanzahl (DESeq-log₂FC) eines Gens verwendet. Ein Verhältnis > 1 entspricht einer positiven Regulation, < 1 und > -1 keiner Regulation und < -1 entspricht einer negativen Regulation. A: Im Anhang E (S.118) sind die Gene entsprechend der x-Achsen Nummerierung aufgelistet. 33 % der Gene waren positiv und 9 % negativ reguliert. Mit 58 % war der größte Teil der Gene nicht oder nur kaum reguliert. Die höchste Regulation war log₂FC +5,8 *fhuA* und -5,8 *SEN1497*. B: Im Anhang F(S. 120) sind die Gene entsprechend der Nummerierung auf der x-Achse aufgelistet. 18 % der 81 Gene wurden positiv und negativ reguliert. Mit 64 % war der größte Teil der Gene nicht oder nur kaum reguliert. Die höchste Regulation lag im positiven Bereich bei + 5 *sitA* und im negativen bei -2,6 *nuoK*.

Betrachtet man neben der Regulation (LFC) auch die Anzahl an Transkripten, so kann man die besten 96 Transkripte der Genexpressionsanalyse bezogen auf die höchste positive Regulation und Transkript-Anzahl identifizieren, jeweils für die CI, CN und IV (Anhang H, S.124). Dabei kommen circa 1/3 der Gene in der Top96 Regulation und Transkript-Anzahl vor, woraus deutlich wird, dass die Regulation nicht immer auf die Transkript-Anzahl schließen lässt. Durchschnittlich wurden 10 % der Gene der Expressionsbibliothek in der Top 96 des Transkriptoms wiedergefunden (Tabelle 4.14). Viele der Gene befinden sich cytoplasmatisch (C) oder sind Membran-assoziierte Proteine (M) und übernehmen vorrangig metabolisch und zelluläre Funktion. So sind SitA und Fhua (höchste Genregulation, S.67) Metallionen-Transporter, deren funktionelle Kategorie den anorganischer Ionentransport und Stoffwechsel (P) darstellt, welche vorrangig in der CI bzw. CN Expressionsbibliothek präsentiert wurden. Spezifisch in CI hochreguliert sind Proteine SsaO und SsaN, die zur Kategorie intrazellulärer, vesikulärer Transport und Sekretion (U) gehören. Spezifisch in CN sind Stress-assoziierte Proteine für die Transkription (K) wie PdhR und CspB. Wohingegen in IV Proteine für die Energieerzeugung und -umwandlung (C) dominieren, wie SEN1790 und SucA.

Vergleicht man die Top96 der Transkriptome zwischen den Bedingungen CI, CN, IV, so finden sich nur gemeinsame Transkripte zwischen CI und CN, aber nicht in IV (Anhang H).

Tabelle 4.14: „Angereicherte Gene“ aus der Expressionsbibliothek, die zu der Top 96 der häufigsten und am stärksten reguliertesten Genen der Transkriptomanalyse gehören jeweils für CI, CN und IV
Es wurde das Gen, das Produkt benannt und die Expression in der Expressionsbibliothek gekennzeichnet, wobei das Leseraster 1 die erfolgreiche Expression definiert. Mithilfe von NCBI Protein Clusters wurden die Konservierung (Homologie) bestimmt, mithilfe von Psortb [235] die subzelluläre Lokalisation (SCL) bestimmt: cytoplasmatisch (C), Membran-assoziiert (M), periplasmatisch (P), außerhalb (O), ohne Motif (-). Die COG-Kategorien geben Auskunft über die Funktionalität: C (Energy production and conversion), E (Amino acid transport and metabolism), G (Carbohydrate transport and metabolism), I (Lipid transport and metabolism), J (Translation, ribosomal structure and biogenesis), K (Transcription), M (Cell wall/membrane/envelope biogenesis), O (Post-translational modification, protein turnover, and chaperones), P (Inorganic ion transport and metabolism), S (Function unknown)

Gen	Produkt	Homologie	Frame	SCL	COG
Bibliothek CI					
gpmA	phosphoglycerate mutase	cellular organisms	1	C	G
yafH	possible acyl-CoA dehydrogenase	Bacteria	3	CM	I
infC	translation initiation factor IF-3	Bacteria	1 *	C	J
thrS	Threonyl-tRNA synthetase	Bacteria	1	C	J
ddg	putative acyltransferase	Proteobacteria	1 *	CM	M
mopA	GroEL protein	cellular organisms	1	C	O
sitA	Mn ²⁺ /Fe ²⁺ : H ⁺ symporter	Proteobacteria	1	P	P
Bibliothek CN					
ansP	L-asparagine permease	Bacteria	2	CM	E
ptsI	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	Bacteria	1	C	G
fusA	elongation factor G	Bacteria	1	C	J
rplL	50S ribosomal SU protein L7/L12	Bacteria	1	-	J
rplQ	50S ribosomal SU protein L17	Bacteria	3	C	J
cspA	cold shock protein	Bacteria	2	C	K
cspB	cold shock protein	Bacteria	1 *	C	K
pdhR	pyruvate dehydrogenase repressor	Bacteria	2	C	K
rpoA	DNA-directed RNA polymerase α	Bacteria	2	C	K
fhuA	ferrichrome-iron receptor	Proteobacteria	3	OM	P
Bibliothek IV					
gltA	citrate synthase	Bacteria	1	C	C
sucA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	Proteobacteria	2	C	C
SEN1790	copper-binding protein	cellular organisms	2	-	C
pps	phosphoenolpyruvate synthase	cellular organisms	3	C	G
thrS	Threonyl-tRNA synthetase	Bacteria	1	C	J
lpp	major outer membrane lipoprotein	Bacteria	2	OM	M
elaB	conserved hypothetical protein	Proteobacteria	2	-	S
ygaU	peptidoglycan-binding protein	Bacteria	2	P	S

Insgesamt traten in allen Expressionsbibliotheken 9 Gene doppelt auf (Tabelle 4.15). Hiervon war das Gen *imp* in den Bibliotheken CN und IV vorhanden und 4 weitere Gene in den Bibliotheken CI und IV. Die restlichen 4 Gene traten in den Bibliotheken CI und CN auf. Die meisten doppelten Gene wurden kaum reguliert (\log_2FC 0 bis -1), was bedeutet die relative Häufigkeit (Transkriptanzahl) in der Bibliothek ist ähnlich. Das Gen *nuoK* wurden 7-fach herunterreguliert (\log_2FC -3). Der relative Genexpressionswert von CI befindet sich allerdings noch im vierstelligen Bereich und unterscheidet sich kaum zu den anderen aufgelisteten Genen. Erst bei einer Transkriptzahl < 10 kann von keiner tatsächlichen Expression ausgegangen werden. Dieser Wert wurde bei keinen der doppelten Gene annähernd erreicht. Das Gen *feoA/B* wurde in CI und CN identifiziert, wo es in ähnlich häufig vorliegt, hingegen ist es in IV deutlich geringer vorhanden. *FeoA* liegt in IV 4-fach weniger vor (674 rel. Anzahl). Es zeigt sich, dass nicht nur die Regulation einen Vergleichsmaßstab darstellt, sondern auch die relative Häufigkeit der Transkripte. Hiervon wurden Gene mit einer spezifischeren Konservierung nochmals detaillierter aufgeführt (Tabelle 4.16).

Tabelle 4.15: Mehrfach identifizierte Gene in den Expressionsbibliotheken (CI/CN/IV)

Mit Angabe der Genexpressionsdaten: die relative Transkriptzahl (DESeq- Anzahl) und die dazugehörigen \log_2FC Werte (Spalte1/ Spalte 2). DEG (\log_2FC von > 1 und < -1).

Gen	Anzahl	Anzahl -IV	Log ₂ FC- CI/IV	Log ₂ FC- CN/IV	Log ₂ FC- CI/CN
<i>imp</i>	CN 9269	7323	-0,4	0,3	-0,8
<i>cstA</i>	CI 8447	13480	-0,7	-1,1	0,4
SEN1387	CI 18394	17110	0,1	-0,4	0,4
<i>thrS</i>	CI 30104	59470	-1,0	0,3	-1,3
<i>nuoK</i>	CI 3757	25655	-2,8	-2,1	-0,7
Gen	Anzahl-CI	Anzahl -CN	Log ₂ FC- CI/CN	Log ₂ FC- CI/IV	Log ₂ FC- CN/IV
<i>feoA</i>	2364	2719	-0,2	1,8	2,0
<i>feoB</i>	19721	14385	0,5	2,3	1,8
<i>iclR</i>	1602	1305	0,3	0,1	-0,3
SEN4030	11582	29237	-1,3	0,0	1,3

Tabelle 4.16: Spezifische Proteine die mehrfach identifiziert wurden in CI und CN

Mithilfe von NCBI Protein Clusters wurde die Konservierung (Homologie) bestimmt. Ferner ist der Leseraster (*=stop-Codon) in der Bibliothek (CI/CN), die NCBI COG (clusters of orthologous groups) Kategorie: P (Inorganic ion transport and metabolism), K (Transcription), S (Function unknown) und die subzelluläre Lokalisation-SCL (psortb): cytoplasmatisch (C), Membran-assoziiert (M), außerhalb (O), extrazellulär (E), periplasmatisch (P), ohne Motif (-) und die Protein-ID (GenBank) angegeben.

Gen	GenBank	Produkt	Homologie	COG	SCL	Frame
<i>feoA</i>	CAR34906	Eisentransportprotein	Proteobacteria	P	-	1
<i>feoB</i>	CAR34907	Eisentransportprotein	Proteobacteria	P	CM	1*
SEN1387	CAR32966	Regulator of hokC	Proteobacteria	S	P	3
<i>iclR</i>	CAR35538	Acetat-Repressor	Enterobacterales	K	C	2
SEN4030	CAR35593	large repetitive protein	<i>Salmonella</i>	S	E/OM	3

4.6. Relevanz der Gene *SEN1171A/B*, *SEN1423* und *SEN2228* im *in vitro* Infektionsverhalten von *S. Enteritidis*

Es wurden drei Gene untersucht, die eine hohe Genregulation im CI Zustand im Vergleich zum CN Zustand als auch im IV Zustand aufwiesen (Tabelle 4.17). Die Proteinfunktion ist für die Gene noch nicht näher beschrieben. *SEN2228* befindet sich im SPI-12 Cluster, welches vorrangig *S. Typhimurium* spezifisch ist. Es ist identisch zu *STM2245* in *S. Typhimurium* und kodiert ein putatives Außenmembranprotein. Anhand einer Untersuchung auf COGs (EggNOG) ist es eine Lipid-A 3-O-Deacylase mit PagL Domäne und Signalpeptid. *SEN1423* ist anhand eines Sequenzvergleichs homolog zu *tfpB* in *S. Newport* (100 %) und *STM1630* in *S. Typhimurium* (99,6 %), die beide für innere Transmembranprotein kodieren. *SEN1171A* und *SEN1171B* besitzen keine Protein-ID, sie sind Pseudogene des Fels-2 Prophagen. Es existiert kein Ortholog zu *SEN1171A*, aber zu *SEN1171B*. Letzteres wird anhand von COGs zu einer Resolvase-Domäne enthaltendem Protein zugeordnet, zu den Proteinen zählen unter anderem Hin und Fin in *S. Typhimurium*. Die Sequenzähnlichkeit von *SEN1171B* zu Hin und zu Fin liegt bei 69 % und 85 % (Anhang I, S.126).

Tabelle 4.17: Genexpressionsdaten der Gene *SEN2228*, *SEN1423*, *SEN1171A* und *SEN1171B*. Hierbei ist die relative Transkriptzahl (DESeq- Anzahl), der \log_2FC Wert und der p-Wert entsprechend der Vergleiche aufgeführt.

Gen	DESeq Anzahl			\log_2FC		p-Wert	
	CI	CN	IV	CI/CN	CI/IV	CI/CN	CI/SC
<i>SEN2228</i>	791	44	87	4,2	3,2	0,000	0,000
<i>SEN1423</i>	233	20	27	3,5	3,1	0,000	0,001
<i>SEN1171A</i>	4560	197	1747	4,5	1,4	0,000	0,172
<i>SEN1171B</i>	234	13	19	4,2	3,6	0,000	0,000

Hierfür wurden Knockout-Mutanten mittels Lambda-Red Rekombination erstellt. Die Pseudogene *SEN1171A* und B haben eine Nukleotidlänge von 171 nt und 144 nt und wurden für den Knockout zusammengefasst. Hierbei wurde der chromosomale Bereich zwischen den Genen ebenso entfernt. Die Sequenzbereiche des Knockouts wurden über sequenziert und verifiziert (Anhang J, S.127). Durch den Knockout Wachstums- bzw. Bewegungsapparat-relevanter Proteine wäre bereits vor der Infektion ein Nachteil für die Mutanten vorhanden, welcher nicht infektionsrelevant ist. Die Gene kodieren keine Proteine, für die eine Relevanz in den zuvor genannten Bereichen bekannt ist, laut NCBI und KEGG. Um dies sicher auszuschließen wurde das Wachstum der Mutanten und des Wildtyps (WT) von *S. Enteritidis* aufgezeichnet als auch ihr Schwarmverhalten in Weichagar. Die Wachstumskurven aller Bakterien überlagert sich (Anhang K, S.127) und auch im Schwarmverhalten ist keine Abweichung vom WT zu erkennen. Daraufhin wurden die Mutanten und der Wildtyp im CaCo-2 Infektionsmodell untersucht.

ERGEBNISSE

Das Infektionsverhalten wurde für alle Mutanten und den WT zu den Zeitpunkten $t= 1, 3, 5$ p. i. analysiert (Abbildung 4.23). Die Probenanzahl war für den WT $n=18$, Δ SEN1423 $n=6$, Δ SEN2228 $n=6$ und für Δ SEN1171A/B $n=12$. Ein signifikanter Unterschied der Daten wurde zu $t= 1$ und $t= 5$ mittels ANOVA berechnet. Die Mutante Δ SEN2228 wies bei $t= 1$ einen 1,8-fach kleineren Mittelwert auf als der WT und dieser Unterschied war signifikant (p -Wert= 0,036). Im Gegensatz dazu konnte für Δ SEN1423 eine leicht erhöhte Invasionsrate berechnet werden, welche allerdings nicht signifikant war. Zum Zeitpunkt $t= 5$ wies die Mutante Δ SEN1171A/B einen 1,5-fach kleineren Mittelwert als der WT auf, dieser Unterschied war ebenso signifikant (p -Wert= 0,018). Der WT hatte sich um Faktor 25 vermehrt, Δ SEN1171A/B nur um das 16fache. Alle weiteren Mutanten zeigten keinen signifikanten Unterschied zum WT auf. Zum Zeitpunkt $t= 3$ wurde eine ähnliche Anzahl an intrazellulären Bakterien (Mutanten und WT) nachgewiesen.

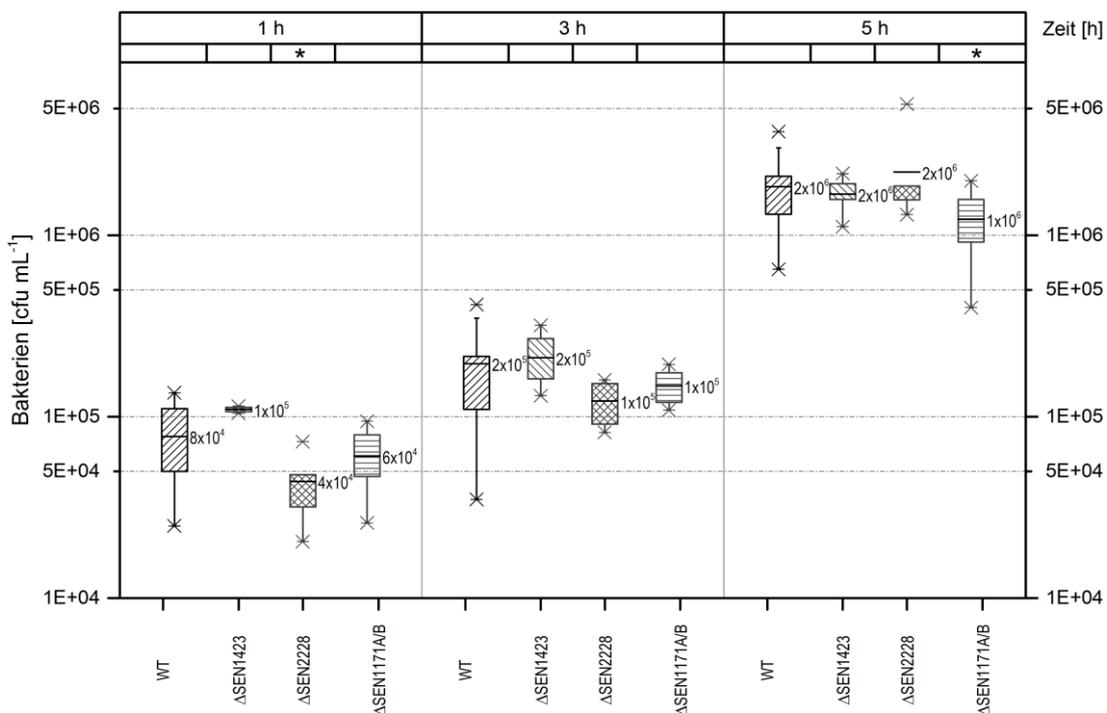


Abbildung 4.23: Quantifizierung der Infektionsrate für die Knockout-Mutanten und den WT

Der Gentamicin-Invasionstest wurde für die Mutanten und den WT zu den Zeitpunkten $t= 1, 3, 5$ p. i. durchgeführt. Die Probenanzahl war für den WT $n=18$, Δ SEN1423 $n=6$, Δ SEN2228 $n=6$ und für Δ SEN1171A/B $n=12$. Die Daten wurden mittels Box-Plot dargestellt, wobei die Skalierung logarithmisch erfolgt. Die Boxen sind definiert mit Maximum und Minimum als Bindestrich und 99 % und 1 % als Kreuz. Die Boxen teilen sich mit 25 %, 50 % und 75 % auf, wobei der Strich den Mittelwert definiert und der Mittelwert angegeben ist. Die Signifikanz wurde mit ANOVA (einfach) im Vergleich zum WT berechnet. Die Mutante Δ SEN2228 wies bei $t= 1$ einen 1,8-fach kleineren Mittelwert auf als der WT und dieser Unterschied war signifikant (p -Wert= 0,036). Und zum Zeitpunkt $t= 5$ wies die Mutante Δ SEN1171A/B einen 1,5-fach kleineren Mittelwert als der WT auf, dieser Unterschied war ebenso signifikant (p -Wert= 0,018). Alle weiteren Mutanten zeigten keinen signifikanten ($P < 0,05$) Unterschied zum WT auf.

5. Diskussion

Die Anzahl an Salmonellosen ist seit 2004 in den europäischen Ländern deutlich rückläufig. Die Ursache hierfür ist das umfassende Monitoring durch die EU, mit dem Ziel eine Reduzierung von Salmonellen in Geflügelbeständen und Schweinen durchzusetzen (*European Food Safety Authority*, EFSA). Seit 2014 stagniert die Zahl der Infektionen mit *S. Enteritidis*, welcher der häufigste Serovar verantwortlich für lebensmittelbedingte Salmonellenausbrüche ist [213]. 2016 kam es bspw. zu einem länderübergreifenden Ausbruch durch *S. Enteritidis*-kontaminierte Eier, die von drei polnischen Packstellen stammten [153]. Der Nachweis des Krankheitserregers erfolgte anhand von Whole-Genome-Sequencing (WGS), das den neuen Standard für staatliche Laboratorien definiert und eine eindeutige Subtypisierung ermöglicht. Die eindeutige Zuordnung des Erregers ist notwendig, um den kontaminierten-Ursprung zu lokalisieren. Nur durch eine schnelle Identifizierung wird eine weitere Ausbreitung verhindert. Die Methoden zur Subtypisierung sind relativ aufwendig und bedürfen geschulten Personals. Im Gegensatz dazu gewährleistet die Schnelldiagnostik eine leichte Handhabung, zeitnahe Ergebnisse und ggf. eine Point-of-care Analyse. Hierfür finden immunologische oder Nukleinsäure-basierte Tests mit spezifischen Antikörpern bzw. von spezifischen Amplikons eine Anwendung. Neben den Oberflächenstrukturen wie LPS-O-Antigenen, sind spezifischere Zielstrukturen von Interesse, welche auch eine Unterscheidung nahverwandter Stämme erlauben.

Eine Gastroenteritis kann nach wenigen Tagen abklingen oder aber systemisch mit schweren Folgen verlaufen [206]. Insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, älteren Menschen und Kindern können Salmonellen-Infektionen lebensbedrohlich sein. Die entscheidende Weichenstellung für den Krankheitsverlauf erfolgt vermutlich bereits in einer frühen Infektionsphase. Daher sind Wirt-Pathogen-Studien ein wichtiger Anknüpfungspunkt, um geeignete Methoden für den Nachweis und die Prävention zu entwickeln. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Etablierung eines *in vitro* Infektionsmodells von *Salmonella* Enteritidis. Pathogene werden durch Virulenzfaktoren zur Invasion von Wirtszellen befähigt. Die Genexpression von Virulenzfaktoren erfolgt angepasst auf die Umgebung des Pathogens und wird über bestimmte Stimuli induziert. Durch den Einsatz im Infektionsmodell werden Virulenz-adaptierte Salmonellen stimuliert und eine Anreicherung von Proteinen erzielt, deren Existenz im Wirt wahrscheinlich ist. Für die Suche nach neuen immunogenen Proteinen wurde eine cDNA-basierte Expressionsbibliothek erstellt und ein Immunscreening der rekombinanten Proteine mittels Microarrays durchgeführt.

5.1. Infektionsmodell: Eine *in vitro* Alternative zu *Salmonella*- Wirtsstudien

Das Infektionsmodell für *S. Enteritidis* wurde anhand der natürlichen Eintrittspforte, also dem Gewebe das Salmonellen passieren müssen, abgestimmt und daraufhin die Darmzelllinie CaCo-2 und die Makrophagen-Zelllinie J774A.1 ausgewählt. Die Kulturbedingungen der Bakterien im *in vitro* Modell werden daher als infektiionsähnlich statt *in vitro* bezeichnet.

Das Infektionsmodell für die Invasion des Darmlumens wurde mit der Zelllinie CaCo-2 bearbeitet. Diese wird häufig in Studien zu Permeabilität und Versstoffwechslung von Arzneistoffen verwendet (z. B. Screening bei Prodrugs) [13, 54, 86]. Die CaCo-2 sind immortalisierte Colon-Adenokarzinom Zellen, welche sich spontan ausdifferenzieren nachdem sie Konfluenz erreicht haben [98]. Die pro-inflammatorische Antwort wurde mittels der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 modelliert. Sie besitzen einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp [66]. Dieser wird unter anderem definiert über das Vorhandensein von spezifischen Rezeptoren zur aktiven Phagozytose. Daher werden sie auch als professionelle Phagozyten bezeichnet. Die Phagozytose verläuft durch die Interaktion zwischen Makrophagen-Rezeptoren und Liganden, die auf der Oberfläche der Zielzellen exponiert sind.

Vorteile bei der Verwendung von Zelllinien sind ihre vielfältige Verfügbarkeit, Robustheit und Stabilität. Die Untersuchung von Wirts-Pathogen-Interaktionen *in vivo* stellt ein komplexes System dar und lässt sich durch die Verwendung von Zelllinien deutlich vereinfachen. Die Vielfalt von Zelllinien ermöglicht die Nachahmung weiterer Infektionsmodelle, bspw. für Vorstufen von Sepsis [56], Inflammation und Persistenz [31]. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass die Zellen meist aus Tumorzellen stammen, deren Zellverhalten nicht identisch zum natürlichen Zelltyp ist [98]. Demzufolge stimmen Ergebnisse aus Studien mit Zelllinien nicht immer mit *in vivo* Untersuchungen [138] oder mit *in vitro* Untersuchungen primärer Ziellinien [5] überein. Trotz der Stabilität und beständigen Charakteristika von Zelllinien wurde von abweichenden Resultaten in Arbeiten mit der gleichen Zelllinie berichtet, wie z. B. die Verwendung unterschiedlicher Passagenanzahl [98, 181]. Bei CaCo-2 Zellen wurde beschrieben, dass die Ausprägung des Monosialo Gangliosid 1 (GM1) zu einem Verlust der Epithel-Eigenschaften führt [98]. Die CaCo-2 Infektionsversuche wurden deswegen innerhalb der Passagenanzahl von 10-20 durchgeführt, um konstante und solide experimentelle Daten zu erlangen.

Das Infektionsmodell wurde anhand des Gentamicin-Invasionsassays (*gentamicin protection assay*) [57, 140] durchgeführt. Kurz gesagt wird durch die Verwendung von einigen Antibiotika wie dem Aminoglykosid Gentamicin, das Eindringen in die eukaryotische Zelle verhindert. Dadurch können intrazelluläre Bakterien wie Salmonellen nach Penetration der Zellen geschützt vorliegen und extrazelluläre Bakterien abgetötet werden. In den letzten Jahren wurden vielfältige Methoden, zum Gentamicin-Invasionsassay publiziert [158, 202, 205, 232], die sich in erster Linie in der Verwendung von Zelllinien und dem Bakterium unterscheiden. In dem Invasionsassay gibt es variable Parameter, wie die Inkubationszeit, die *multiplicity of infection* (MOI) oder ggf. ein Zentrifugationsschritt, die teilweise ungenügend beschrieben werden, was den Vergleich zu anderen Publikationen erschwert.

5.1.1. Morphologische Auffälligkeiten der Zelllinien J774A.1 im Infektionsmodell-Hyperreaktion des Wirts auf das Pathogen *Salmonella*

Betrachtet man die Morphologie der J774A.1 Zellen zum Zeitpunkt $t=0$, wies die Kultur überwiegend semi-adhären, längliche Zellen auf. Nach dem Kontakt zu Salmonellen war eine morphologische Veränderung zu erkennen. Die Zellen hatten eine unregelmäßige flache (Spiegelei-ähnlich) Morphologie. Verreck, Boer et al. beschrieben im Jahr 2006 Makrophagen, die sich auf ihrem Differenzierungsweg von Monozyten-abstammend in Typ-1 und Typ-2 entwickeln. M1-Makrophagen erscheinen typischerweise als adhärenente Zellen mit klassischer Spiegelei-Morphologie; M2 als adhärenente und gestreckte, "spindelförmige" Zellen. Die wesentliche Aufgabe von M1 stellt die Abwehr von Mikroorganismen dar, während M2-Makrophagen eher immunsuppressiv und an der Beseitigung von Zelltrümmern beteiligt sind [220]. Somit dominieren zu Beginn der J774A.1-Kultur nicht-differenzierte Zellen, die morphologisch M2 Makrophagen ähneln. Wobei nach dem bakteriellen Stimulus (z. B. LPS) die Zellen zu M1-Makrophagen differenzieren.

Die J774A.1 wiesen nach der Bakterienzugabe sofort eine deutliche Zunahme an Vakuolen auf, welche Bakterien beinhalteten (S. 38). Die Invasionsrate im Gentamicin-Invasionstests war erwartungsgemäß im Vergleich zur CaCo-2 Zelllinie deutlich erhöht (S. 39). Makrophagen sind professionelle Phagozyten, die Bakterien aktiv in Phagosomen aufnehmen und zum lytischen Verdau hin zum Lysosomen transportiert. Nach der Phagozytose sind Salmonellen in der Lage dem lytischen Verdau zu entgehen und sich intrazellulär in Makrophagen zu vermehren. Hierzu konnten keine genauen Angaben gemacht werden, da bei $t > 3$ h p. i. Anzeichen von Apoptose sichtbar wurden, die mit einem stetigen Ablösen von semiadhärenente J774A.1 Zellen verbunden waren (S. 34). Die Zellmembran erschien deformiert, aufgrund von Stachel-ähnlichen Strukturen auf der Zelloberfläche, hierbei könnte es sich um Apoptopodien handeln. Im späteren Infektionsverlauf wurden viele Zellmembranbläschen sichtbar. Die Vitalität der J774A.1 Zellen war nach 3 h nicht mehr gegeben, da mehr als die Hälfte der Zellen tot bzw. abgelöst waren. Beide Deformationen der Zellmembran sind Kennzeichen von Apoptose [126, 198]. Der regulierte Zelltod von Pathogen-infizierten Zellen ist ein Schutzmechanismus, der im Körper eine weitere intrazelluläre Ausbreitung und Vermehrung des Krankheitserregers verhindern und reduzieren soll. Je nach Interaktion werden unterschiedliche Formen des Zelltodes unterschieden: Apoptose, Nekrose und Pyroptose [108]. Apoptose ist Caspase-abhängig und führt zu einer Reihe von morphologischen und molekularen Veränderungen. Es ist gekennzeichnet durch Membran-Bläschen (*membrane blebs*), DNA-Fragmentierung und Expression von Signalen, die Phagozyten anlocken und die Entsorgung des apoptotischen Materials (*apoptotic bodies*) auszulösen [12, 44].

Das J774A.1 Infektionsmodell zeigte eine derart übermäßige Reaktion auf den Bakterien-Stimulus, dass es zum sukzessiven Ablösen und Absterben der Zellen kam. Das Infektionssystem wurde für J774A.1 und CaCo-2 identisch aufgebaut und setzt für die nicht-phagozytierenden CaCo-2 Zellen einen invasiven Phänotyp voraus, da andernfalls keine bzw. eine stark verminderte Salmonellen- Invasion erfolgt [30]. Das Wachstum von *S. Enteritidis*

bis zur mittleren logarithmischen Phase unterstützt den invasiven Phänotyp, welcher die Expression der *Salmonella pathogenicity island 1* (SPI-1) bewirkt. Nach Betrachtung der Genexpression in IV kann bestätigt werden, dass SPI-1 ebenso wie die zugehörigen kodierenden-Effektoren *sipA-D* stark exprimiert wurden (S. 63). Für ein stabiles Makrophagen-Modell erscheint es notwendig zu sein die nachfolgenden Kriterien anzupassen. Es wurde für Makrophagen eine weitere Art der Zytotoxizität durch Salmonellen beschrieben, die auf die SPI-1 Expression zurückzuführen ist [27, 183, 218]. Dabei kommt insbesondere dem Protein SipB, welches Caspase-1 in Makrophagen aktiviert und zu Apoptose führt, eine tragende Rolle zu. Durch die Verwendung von Salmonellen der stationären Wachstumsphase (SPI-2 Expression dominiert) wird eine verzögerte Apoptose (5-10 h p. i.) einleitet, die SipB-unabhängig verläuft [183]. Ebenso kann eine Opsonierung von Salmonellen mittels Antikörper oder Komplement vor der Zugabe zum Infektionssystem, eine Abschwächung bewirken, indem eine andere Rezeptor-vermittelte Phagozytose Reaktion auslöst und die Caspase-1 Aktivierung unterbunden wird [201]. Ebenso führt der Kontakt zu Bakterien, insbesondere LPS, dem Hauptbestandteil gramnegativer Zellwand, zu einem inflammatorischen Signal. LPS wirkt abhängig von der Dosis als Endotoxin [186]. Eine ähnliche Hyperreaktion wurde indirekt bei einer Studie zu LPS hyposensitiven J774A.1 Zellen berichtet. Hierbei erfolgte eine stabile mehrstündige Infektion mit dem Pathogen *Yersinia enterocolitica* allein bei einer vorherigen LPS-Desensibilisierung der J774A.1 Zellen, andernfalls führte die Infektion zu 80 % apoptotischen Zellen [178].

Zukünftig ist ein kombiniertes Modell aus CaCo-2 und Makrophagen-Zellen interessant. Epithelzellen werden bei der Salmonellen-Invasion ebenso geschädigt bzw. lösen eine zelluläre Antwort (Zytokin-Sekretion) aus. Im Falle von Apoptose kommt es zur Bildung von *blebs* und Freisetzung von LPS der Salmonellen. Kleineste Mengen an löslichem LPS bzw. Zytotoxinen würden eine Aktivierung der Makrophagen bewirken.

5.1.2. Morphologische Auffälligkeiten der Zelllinien CaCo-2 im Infektionsmodell- Dokumentation der *Salmonella-containing vacuole* (SCV)

In dem CaCo-2 Infektionsmodell wurden innerhalb der Infektionsdauer von 5 Stunden keine apoptotischen Merkmale sichtbar. Bei andauernder Inkubation länger als 20 h wurde auch hier eine Vakuolisierung sichtbar (Daten nicht gezeigt), was eine erste Stressantwort darstellt. Darmepithelzellen sind *in vivo* mit zwei Seiten konfrontiert, dem stetigen Kontakt zur Mikrobiota (apikal) und zu weiteren Epithelzellen und Lamina Propria (basolateral). Die Zellen besitzen weniger Rezeptoren wie PRRs als Makrophagen und sind daher inhärent robuster gegenüber bakteriellen Kontakt. Bei einer Infektion stellt sich in Epithelzellen ebenso wie in Makrophagen ein apoptotischer Verlauf ein, allerdings zeitlich versetzt [7, 159]. Innerhalb der Darmepithelzellen erfolgt die erste intrazelluläre Adaption der Salmonellen, was die erhöhte Inkubationszeit der Salmonellen in diesem Wirtsgewebe erklären könnte. Es wird vermutet, dass nach ausreichender Adaption gezielt Apoptose in den Zellen ausgelöst wird, was zur Freisetzung und weiteren Verbreitung des Pathogens führt [159].

Der zeitliche Verlauf des CaCo-2 Infektionsmodells wurde quantitativ und qualitativ, anhand der Transkriptomdaten, untersucht. Im folgenden Abschnitt werden diese Ergebnisse zusammengefasst und ein Bezug zum Infektionsgeschehen hergestellt. Hierbei dient das nicht-CaCo-2-invasive *Salmonella* Transkriptom (CN) als Modell für die Situation der Adhärenz, das CaCo-2 invasive *Salmonella* Transkriptom (CI) als intrazelluläres Modell. Das unter Laborbedingungen herangezogene *Salmonella* Transkriptom (IV) wurde als klassisches *in vitro* Modell bezeichnet und ist die Vorstufe zu CN. Virulenzfaktoren sind für *Salmonella* zum Teil sehr gut beschrieben. Dies begründet sich, da *S. Typhimurium* in Mausmodellen, einen typhösen Verlauf aufzeigt und so als geeignetes Tiermodell für *S. Typhi* verwendet wurde [63, 143]. Diese Versuche haben deutlich zum Verständnis der systemischen Infektion von *S. enterica* im Allgemeinen beigetragen. Dennoch ist aufgrund der Wirtsspezifität von Salmonellen eine Übertragung nur begrenzt möglich und die Untersuchung von pathogenen Mechanismen spezifisch für einzelne Serovaren notwendig.

A: Invasion

CaCo-2 Zellen sind nicht-phagozytierende Epithelzellen und können von nicht-invasiven Bakterien, wie *E. coli* K12 (Daten nicht gezeigt) nicht penetriert werden. Im Gegensatz zu Makrophagen, die aktiv Bakterien, Partikel und extrazelluläre Substanzen aufnehmen [175]. Salmonellen können die CaCo-2 Zellen so manipulieren, dass eine Invasion über den *Trigger-like* Mechanismus ausgelöst wird. Vermittelt über ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) der SPI-1 [69, 136, 164], werden zahlreiche SPI-1 Effektoren ins intrazelluläre des Wirts injiziert, die die Aufnahme induzieren [41, 94]. Das Vorhandensein der relevanten SPI-1 Virulenzfaktoren ist Voraussetzung für die T3SS-vermittelte Invasion in CaCo-2 Zellen und wurde durch den Zusatz von NaCl im Puffer zusätzlich stimuliert. Osmolarität aktiviert indirekt die SPI-1 Genexpression [150]. Das Transkriptom der IV Salmonellen bestätigt die SPI-1 Genexpression, welche in CN ähnlich ist (S. 63). Zudem wurden Gene zur Fortbewegung, Chemotaxis und Typ-1 Fimbrien primär in IV hochreguliert (S. 63). Diese sind

für eine gerichtete Bewegung notwendig und verstärken die Invasion *in vivo* [164]. Verschiedene chemische Reize, die von Rezeptoren empfangen werden, beeinflussen die Rotation des Flagellum-Motors und ermöglichen es Salmonellen, durch Motilität auf Lockstoffe zu reagieren [22]. Der zweite Invasionsmechanismus (*Zipper-like*) wird von Salmonellen über Rck vermittelt. Das Gen *rck* (SEN_p0007) des Virulenzplasmids wurde in CN 2-fach hochreguliert gegenüber IV (S.64).

In den CaCo-2 Zellen waren die Salmonellen nach kurzer Zeit ($t > 15$ min p. i.) mikroskopisch sichtbar, begleitet von Endosomen (S. 36). Durch das Vorhandensein der SPI-1 wird die T3SS-vermittelte Invasion bevorzugt, wobei die SPI-4 Gene und Adhäsine ebenso eine wichtige Funktion bei der Zelladhäsion übernehmen. Der Regulator HilA aktiviert direkt die SPI-1 Gene *inv/spa* als auch *prg/org* [211] und bewirkt indirekt eine Aktivierung der SPI-4 Gene [60]. In den CN Salmonellen war die Expression von *hilA* deutlich erhöht und auch weitere Regulatoren wie HilD und InvF wurden hochreguliert (S. 63). Insgesamt führte dies zu einer verstärkten Expression in CN der *inv* und *spa* Gene (2-fach) als auch der SPI-4 Gene (25-fach). Die SPI-4 Gene *siiA-F* ähneln einem T1SS mit zusätzlicher Chemotaxis Funktion [16, 230] und sind zusätzlich zu SPI-1 relevant für die Invasion [60, 70]. Die SPI-1 translozierten Effektoren (*sipA-D*) und assoziierten Effektoren (*sopE/E2/A/B/D*) weisen die stärkste Expression in IV auf, 2-fach höher als in CN. Sie werden durch InvF und SicA (Chaperon) reguliert, nachträglich zum T3SS Komplex und weisen eine geringe Halbwertszeit von kleiner 10 min auf [117]. Chaperone schützen nachweislich die Effektormoleküle vor dem Abbau und verhindern die Assoziation von Effektoren vor der Sekretion [43].

B: intrazelluläre Strategien

Für das intrazelluläre Überleben der Salmonellen ist die Ausbildung einer *Salmonella containing vacuole* (SCV) elementar. Nach Abschluss der *Salmonella*-induzierten Endozytose beginnt die Umwandlung des Endosomen hin zum SCV, um den endolysosomalen Weg zum Lysosomen zu umgehen. Die Umwandlung von Endosomen zu SCV und dessen Aufrechterhaltung ist vermittelt über SPI-2 und dessen Effektoren sowie einer negativen Regulation von SPI-1 und assoziierten Genen [203, 204], was im CI Transkriptom ersichtlich wird. Die Expression SPI-1 kodierter Gene wurde 3-fach herunterreguliert und es erfolgte eine spezifische positive Regulation der SPI-2-Gene (\emptyset 24-fach hochreguliert) (S. 63). Im Gegensatz zu SPI-1 wird SPI-2 nur intrazellulär stimuliert. Die Ergebnisse des Gentamicin-Invasionstests deuten darauf hin, dass bis zum Zeitpunkt 3 h p. i. kaum Wachstum der Salmonellen erfolgte, da sich die Zellzahl nur verdoppelte. Hingegen wurde vom Zeitpunkt 3 h-5 h p. i. eine 10-fache Erhöhung ermittelt (S. 39). Innerhalb der ersten Stunden nach Infektion erfolgt die Restrukturierung des *Salmonella*-beinhaltenden Endosomen zum SCV, dieses Stadium wird als Mittelstadium der SCV Biogenese beschrieben. In der Literatur wird der Zeitraum auf 0,5-5 h p. i. festgesetzt wobei erst im Spätstadium (> 5 h) eine intrazelluläre Vermehrung charakteristisch ist [203, 204]. Neben der SCV wurde eine weitere Möglichkeit für Salmonellen beschrieben, die ein intrazelluläres Überleben gewährleistet. Hierfür erfolgt ein Übergang aus dem SCV ins Cytosol. Die Vermehrung im Cytosol erfolgt deutlich schneller als im vakuolären Stadium [119, 146].

Zum späten Zeitpunkt der Invasion ($t = 6$ h p. i) wurden CaCo-2 Zellen sichtbar, die sehr viele (> 20), sich bewegende, Bakterien enthielten. Mikroskopisch sichtbare Strukturen um das Bakterium herum weisen auf eine Membran hin, wobei es sich um das SCV handeln könnte (S. 36). Die Bewegung einzelner Bakterien war um den Zellkern herum lokalisiert und verlief auf geradlinigen Bahnen, wobei sich Vakuolen mit vielen Bakterien eher peripher befanden und sich die Bakterien kaum bewegten (S. 37). Hierzu wurde beschrieben, dass die Bewegung von intrazellulären Salmonellen bzw. SCVs über Kinesin vermittelt und durch die Bindung der SCV-Oberfläche mit Mikrotubuli-Filamenten initiiert wird [203]. Die Bewegung entlang Mikrotubuli-Filamenten ist ein wesentliches Merkmal des SCV Spätstadiums und wird zusammen mit der Entstehung von Sifs (*Salmonella-induced filaments*) beschrieben. Hierbei werden spezifisch SPI-2 Effektoren benötigt, die sowohl in der SCV- als auch in der SIF-Biogenese relevant sind. Das CI-Transkriptom zeigt bezogen auf die SCV Entstehung klare Anzeichen, da alle grundlegenden SPI-2 Gene (\emptyset 24-fach) als auch translozierte Effektoren (\emptyset 12-fach) stark hochreguliert vorliegen (S. 63). Der zentrale Faktor für die Aufrechterhaltung der SCV Membran und SIF-Biogenese ist SifA, dessen Expression stets zur Aufrechterhaltung der SCV führt [239] und dies direkt mit den Mikrotubuli verbindet. In CI liegt *sifA* 5-fach hochreguliert vor. Für die SIF-Biogenese ist SifA im Zusammenspiel mit SseJ Voraussetzung, so weist eine Doppelmutante *sifA/sseJ* eine intakte SCV-Membran auf, aber keine SIF-Bildung [179]. SseJ ist verantwortlich für SCV-Membranmodifikationen [122]. Der Knockout von *sseJ* erzeugt einen Phänotypen mit einem nachweisbaren Virulenzdefekt [68, 179]. *SseJ* wurde in CI 27-fach hochreguliert. Ebenso wurde gezeigt, dass SseJ und SpvB einen Einfluss bei der Regulation haben und zum Teil übermäßige SIF-Ausläufer kontrollieren bzw. herunterregulieren [21]. Die Anzahl von *spvB* (S. 64) ist in CI 3-fach höher als in CN, aber dennoch ist die Anzahl in IV am höchsten (7-fach herunterreguliert). SCVs bilden ähnliche Strukturen wie Endosomen auf ihrer Oberfläche aus, die vom Wirt erkannt werden und eine weitere Bewegung zum Lysosomen verantworten. Dieser Rab32-abhängige Wirtsabwehrweg kann Salmonella mittels SopD2 entgegenwirken, das in Verbindung mit GtgE wirkt [200]. Beide Gene sind hochreguliert, *sopD2* 10-fach und *gtgE* 2-fach reguliert sind. Neben der Ausbildung der SIFs ist auch die SIF-Dynamik und SCV-Bewegung ein interessantes Merkmal. Die Bewegung entlang des Zytoskelettes wird über die Proteine SifA und PipB2 in Richtung Plus-Ende begünstigt [83] und über SopB und SipA (SPI-1 Effektoren) [131] in die entgegengesetzte Richtung. In der SCV-Spätphase wird das über SseF, SseG (SPI-2 Effektoren) vermittelt [50]. Ebenso wurde zusammen mit SseG das Protein SteA benannt, welche die perinukleare Position und den Kontakt zum Golgi-Apparat stabilisieren. Die Deletion von *sseG* zeigte einen Phänotyp mit deutlich weniger Salmonellen im Cytosol. Somit spielt SseG vermutlich eine Rolle beim Verlassen der SCV oder es erleichtert das Überleben und die Replikation im Cytosol der Epithelzellen [146]. Zudem hat eine frühere Studie gezeigt, dass im zeitlichen Verlauf der SCV Biogenese die Expression der SPI-1-Effektoren *sopB* und *sipA* abnimmt, wodurch die perinukleare SCV Position nicht ausreichend aufrechterhalten wird und es zu einer erhöhten Streuung der SCVs innerhalb der Zelle kommt [207].

Hauptmerkmale für die perinukleare Position sind *sseF/G* und *steA*, je 10- und 4-fach hochreguliert, wohingegen *sopB* (3-fach) und *sipA* (4-fach) herunterreguliert wurden. Das niedrige Level der SPI-1 Effektoren, könnte den Phänotyp erklären, der mikroskopisch festgehalten wurde. SCVs bewegten sich in CaCo-2 Zellen zentrifugal und waren dispers in der Zelle verteilt (S.37). Szeto et al. vermuten, dass die zentrifugale SCV-Verschiebung durch bakterielle als auch durch Wirtsfaktoren gesteuert wird und der Erreger diesen Mechanismus nutzt, um aus der Wirtszelle zu entkommen und andere Zellen zu infizieren [207]. Die für die SIF Biogenese und Bewegung verantwortlichen Gene *sifA* (5-fach), *sseJ* (27-fach) und *pipB2* (18-fach) wurden hochreguliert. Diese tubulären Strukturen könnten ebenso in der Zelle lokalisiert sein. Dies könnte mit einer LAMP1-Färbung bestätigt werden. Das CI-Transkriptom beschreibt einen SCV-spezifischen Phänotyp im Spätstadium, welcher eine Motilität der SCVs und SIFs aufweist. Diese Motilität wurde in den letzten Jahren häufiger beschrieben, allerdings sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht aufgeklärt. Das fast gleichnamige Protein SifB, weist hohe Strukturähnlichkeit zu SifA auf und ist bislang nicht viel beschrieben. In CI ist *sifB* (32-fach) hochreguliert. Es wurde zusammen mit SseJ als Effektor der SCV-Motilität beschrieben und weist keinen Phänotyp bei einer Deletion auf [161]. Generell wird über die Bewegung der intrazellulären Salmonellen kontrovers diskutiert. Der Knockout von *sifA* erzeugt einen Phänotypen, der bereits in der SCV Biogenese einen Virulenzdefekt erzeugt, wodurch weitere Rückschlüsse auf die Motilität nicht getroffen werden können [239]. SifA übernimmt eine so zentrale Rolle, dass mittels Knockouts keine weitere Erklärung gefunden werden kann. Es wurde kürzlich gezeigt, dass insbesondere SIFs ein tubuläres *Salmonella* Netzwerk darstellen, welches Nährstoffe des Wirts-Endosomen-Systems aufnimmt. Die bei der Lysosomen-Verschmelzung entstehenden toxischen Effekte können durch die SIF-Ausbreitung, was mit einer Vergrößerung ihrer Fläche und des Volumens einhergeht, vermieden werden [132, 197]. Die SIF Bildung und SCV Bewegung konnte im Infektionsmodell in CaCo-2 Zellen bestätigt werden.

C: Abweichende Merkmale

Die Genexpression der SPI-1 und SPI-2 als auch von außerhalb dieser zwei Pathogenitätsinseln liegenden, assoziierten Genen stimmt größtenteils mit der Annahme überein, dass die Expression zeitlich voneinander getrennt ist und abhängig vom Infektionsstadium erfolgt. Die SPI-1 assoziierten Gene wurden primär als Invasions-relevant beschrieben, weshalb viele nachfolgende Studien allein die Invasion oder frühe SCV Bildung und nicht die intrazelluläre Funktion untersuchten [15, 168]. Die Genexpressionsdaten zeigten, dass sowohl SPI-1 assoziierte Gene im späteren Infektionsstadium exprimiert wurden. Beispielweise wurde der SPI-1 Effektor *sopA* allein in CI 2-fach hochreguliert. Zum späten Zeitpunkt der Infektion scheint SopA eine Funktion zu übernehmen, wobei die anderen *sop* Gene nur im Invasions-induzierten Zustand (IV) hochreguliert wurden (S. 63). SopA wurde als Wirts-Ubiquitin-ähnliche Ligase beschrieben, die keine Funktion während der Invasion übernimmt, sondern vielmehr die Entzündungsreaktion im Wirt beeinflusst [237]. Die Bindung von SopA an die Wirts-Ubiquitin-Ligase (TRIM) führt zu einer verminderten Aktivität und Häufigkeit des Wirtsproteins und verstärkt dadurch indirekt die

Entzündungsreaktion im Wirt [65, 191]. Ebenso sind SspH2 (5-fach) und SlrP (2-fach), die SPI-2 translozierten Effektoren, eine Wirts-Ubiquitin-ähnliche Ligase, die auch in der Wirts-Entzündungsregulation eingreifen. Den gleichen Effekt erzeugen die deubiquitinierenden-Enzyme (DUB) AvrA und SseL, welche den NF- κ B-Signalweg unterdrücken [84]. Am Beispiel von SopA und AvrA wird deutlich, dass keine klare Abgrenzung der SPI-1 Effektoren vom intrazellulären Überleben möglich ist. Hierfür spricht auch, dass der Infektionsverlauf von Salmonellen eine Infektionsausbreitung über einen größeren Bereich im Darmlumen auslöst. Salmonellen induzieren eine verstärkte Entzündungsreaktion im Wirtsgewebe wodurch die Zellen platzen und das Pathogen, welches sich intrazellulär vermehrt hat, sekundäre Zellen infizieren kann. Für die Invasion neuer Zellen werden die SPI-1 assoziierten Gene benötigt. Die Expression muss zu diesem Zweck bereits intrazellulär stimuliert werden. Die SPI-1 Genexpression geht einher mit dem Verlust der SCV und dem Übergang ins Cytosol. Das nährstoffreiche Cytosol unterstützt eine hohe bakterielle Replikationsrate, die den entzündlichen Wirtszelltod fördert [119]. Ebenso wurde das Invasions-spezifische Gen *fljB* hochreguliert, stärker als in CN und liegt in ähnlicher Anzahl wie in IV in der Zelle vor (S.63). Flagellin (FljB) ist das wichtigste Strukturprotein der Flagellarfäden. Es wurde bestätigt, dass Flagellin basolateral an den TLR5 von Darmepithelzellen bindet und dort eine pro-inflammatorische Antwort induziert [72].

Zusammenfassend konnte bei CI-Salmonellen ein SCV-Phänotyp im Spätstadium beschrieben werden, wobei ein Übergang ins Cytosol nicht ausgeschlossen werden kann. Die erhöhte Varianz unter den Triplikaten des CI Transkriptoms (S. 54) unterstützt die Vermutung, dass es sich um einen Übergangszeitraum zwischen zwei Phänotypen handeln könnte. Zum einen eine Population in SCVs mit starker Ausprägung von SIFs, zum anderen SCVs, die durch die Expression von SPI 1 assoziierten Genen ihre Integrität der Vakuole verloren haben oder im Stande sind sie zu verlieren. Hierbei können Subpopulationen innerhalb einer Zelle oder auch in verschiedenen Zellen vorkommen [33]. Das Genexpressionsmuster der CN Salmonellen war teilweise entgegen der Erwartung. Es wurde angenommen, dass der direkte Kontakt zu Wirtszellen wie für CN Salmonellen zu einer zusätzlichen Aktivierung führt und besonders Adhärenz-vermittelte Gene hochreguliert werden. Allerdings wurden ein Großteil der Gene gegensätzlich zu CI reguliert, wobei dennoch Virulenzgene spezifisch für die Adhäsion hochreguliert wurden. Bereits im IV Transkriptom befinden sich die Salmonellen in einem Invasions-aktiven (T3SS-1) Zustand, der sowohl Fortbewegung und Chemotaxis vermittelt als auch Adhäsion und Invasion in Zellen gewährleistet. Demnach erfolgte der Aufbau des SPI-1-T3SS-Komplexes vor dem Kontakt zu den Wirtszellen und stellt sicher, dass nach erfolgter Adhäsion der Effektor-Pool innerhalb weniger Sekunden durch den bereits assemblierten Nadelkomplex in den Wirt entleert werden kann. Dies wurde für den Sekretionskomplex und die daran bereits anhaftenden Effektoren im cytosolischen Bereich beschrieben [47]. Trotzdem stellt CN einen diversen Pool an Populationen dar, wobei einige Salmonellen Kontakt zu Wirtszellen aufnehmen und andere möglicherweise nicht.

5.2. Immunscreening Virulenz-adaptierter Expressionsbibliotheken

5.2.1. Extraktion der Pathogen-RNA- Heterogenität zwischen Pathogen und Wirt

Studien zu Wirts-Pathogen Interaktionen sind hochrelevant in Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen. Das Prozedere wird deutlich aufwendiger und schwieriger, wenn das Transkriptom des Pathogens im Kontext mit dem Wirt untersucht wird. Zwischen Pathogen und Wirt besteht ein Ungleichgewicht bezogen auf den makromolekularen Inhalt von eukaryotischen zu prokaryotischen Zellen, der sich um ein Vielfaches unterscheidet. Wiederum kann für Wirts-Transkriptomanalysen der prokaryotische Anteil der RNA vernachlässigt werden.

Ein Vergleich von Relationen zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen verdeutlicht das Ungleichgewicht bzw. die Dominanz von Wirtszellinhalt. So liegt die durchschnittliche Größe eukaryotischer Zellen bei 10 bis 100 μm wohingegen *Salmonella spp.* auf 2 bis 5 μm kommt. Betrachtet man beide als Sphären so wird ihr Volumen auf $\sim 10^9$ und $\sim 10^5 \text{ cm}^3$, Eukaryoten und Prokaryoten entsprechend, geschätzt. Abgesehen von dem Größenunterschied ist die Komplexität der Genome zu betrachten. So zeichnen sich höhere eukaryotische Organismen wie der Mensch (2996 Mb), durch ein größeres und komplexeres Genom aus als Prokaryoten wie *Salmonella* Enteritidis (4,8 Mb). Der RNA-Inhalt pro Zelle beträgt demnach 20 pg für Eukaryoten und 0,1 pg für Prokaryoten [109]. Die Isolierung beider Zellen getrennt voneinander vor dem lytischen Aufschluss ist dahingehend fundamental und ein kritischer Schritt für den Erfolg von Pathogen-bestimmten Analysen. Die Separation von Pathogen und Wirt kann mittels verschiedener Methoden erfolgen wie Differentielle Zentrifugation, Durchflusszytometrie (FACS) oder Immunmagnetische Selektion [85]. Wobei ihre Anwendung vom technischen Equipment, spezifischen Markern und dem Probenvolumen abhängt. Nach der Lyse gibt es weitere Methoden zur Anreicherung von prokaryotischer gegenüber eukaryotischer RNA, die jedoch keine ausreichende Effizienz gewährleisten. Daher ist die Anreicherung von Bakterien gegenüber Wirtszellen essentiell. Zusätzlich wurde die Anzahl an Bakterien, die eine Zelle infizieren berücksichtigt, um der Heterogenität von Pathogen zu Wirt entgegenzuwirken. Im *in vitro* Infektionsmodell wird nicht jede Wirtszelle von einem Pathogen infiziert, abhängig von der *multiplicity of infection* (MOI), welches das Verhältnis von eukaryotischer Zelle zu Bakterien beschreibt, kann die Anzahl an infizierten Zellen erhöht werden. So wurde gezeigt, dass eine MOI von 10 nach 4 h p. i. zu 5 % infizierter Zellen führte, wobei eine MOI von 100 in einer mehr als das 10-fach gestiegenen Anzahl (75 %) infizierter HeLa Zellen resultierte [228]. Daher wurde die MOI für alle Versuche auf 100 eingestellt, um eine möglichst hohe Infektionsrate und damit Anzahl an intrazellulärer Bakterien zu gewährleisten.

Anhand der, in der Literatur beschriebenen, *Salmonella spp.* Infektionsstudien wurde eine Detergenz-basierte Lyse der Zellen angewendet [60, 80, 87], die sowohl für Makrophagen als auch Epithelzellen erfolgreich angewendet wurde. Für die Lyse von CaCo-2 Zellen ergaben sich Komplikationen, da sich die Konsistenz des eukaryotischen Lysats veränderte und die gelartige Konsistenz eine Separation mittels der zweistufigen Zentrifugation erschwerte

(S. 41). Die Qualität der bakteriellen RNA wurde bei dieser Art der Extraktion stark degradiert und konnte trotz Optimierungen nicht verbessert werden. Hierfür wurde das zuvor verwendete Detergenz SDS durch Igepal ersetzt, da es ein milderes und nicht-ionisches Tensid ist. Klassische Anwendungsgebiete von Igepal sind die Zellmembranpermeabilisierung [103], wie für den Gentamicin-Invasionstest [128, 144] und für den eukaryotischen Zellysepuffer RIPA. Mithilfe der Cytosol und Nucleus-Fraktionierung sollte eine erhöhte Viskosität des Lysats ausgelöst durch DNA verhindert werden, da nur die Lyse der Zellmembran propagiert wurde ohne die Zellkernmembran aufzuschließen. Durch die veränderten Lysebedingungen wurde die Konsistenz des Lysates aufrechterhalten, was eine Separation der Phasen gewährleistete. Gleichwohl wurde eine Ausflockung des Lysates bemerkt, die in einem festen Aggregat resultierte. Es wurde gezeigt, dass dieses Aggregat vorrangig eukaryotischen Ursprungs ist (S. 43). Das Aggregat konnte sehr leicht aus dem Lysat entfernt werden, wodurch eine Separation indirekt begünstigt wurde. Hierbei könnte es sich um ungenügend gelöste Zellen handeln oder erneut um chromosomale DNA. Die veränderten Lysebedingungen erzielten eine Verbesserung in der RNA-Qualität und Ausbeute als auch im zeitlichen Ablauf der Lyse, welche auf 15 min begrenzt werden konnte. In den Virulenz-adaptierten *Salmonella*-Proben, insbesondere den intrazellulären (CI) Proben, sind Spuren von eukaryotischer RNA nicht gänzlich auszuschließen. Gleichwohl wurde durch die Detergenz-basierte Lyse in Verbindung mit einer zweistufigen Zentrifugation der eukaryotische Eintrag minimal gehalten.

In einer aktuellen Studie zu einer verbesserten Quantifizierung von Pathogen-Wirts Interaktionen wurde ein neues Detergenz (Elugent™) eingesetzt, welches eine Bildung von Aggregaten wie es bei Igepal auftrat verhindert [90]. Die Verwendung von Elugent™ könnte auch für die Separation von Wirt und Pathogen interessant sein, da ohne Aggregatbildung möglicherweise die Bakterienausbeute erhöht wird. Welches Detergenz bzw. welche Zusammensetzung an Lysepuffer verwendet wird, sollte je nach Wirtszelle entschieden werden. Wie am Beispiel von CaCo-2 Zellen deutlich wurde, sind auch unterschiedliche Epithelzelllinien heterogen (HeLa vs. CaCo-2) und die praktische Durchführung nicht identisch. Ein wesentlicher Unterschied ist die Ausbildung des CaCo-2 Monolayers, da Zellen nur schwer voneinander zu trennen sind und eine Vereinzelung erschwert wird, was die Homogenisierung bei der Lyse beeinflusst.

5.2.2. Generierung von cDNA Bibliotheken- Eine Frage der Größe

CDNA Bibliotheken erlauben die Untersuchung der Genexpression, Proteininteraktion und folglich auch die Identifizierung neuer Gene. Gegenüber Genom-basierten Bibliotheken ist die Analyse des Transkriptoms eine Momentaufnahme der funktionellen Gene und Gencluster, welche beispielsweise den Phänotyp bei infektiösen Bedingungen beschreiben. Ein weiterer Vorteil ist die Reduktion der auszuwertenden Datenmenge. Diese komprimierten Genbibliotheken stellen eine geeignete diagnostische Ressource für die Entwicklung relevanter molekularer Marker dar. Die *messenger* RNA (mRNA) macht typischerweise einen sehr kleinen Teil der Gesamt-RNA in Bakterienzellen aus. Mit bis zu 95 % dominiert ribosomale RNA (rRNA), da große Mengen an Ribosomen und damit rRNA benötigt werden, um den Bedarf der Zellen an Proteinsynthese zu decken. Darüber hinaus ist die Mehrheit der bakteriellen mRNA nicht polyadenyliert, wie es bei Eukaryoten der Fall ist, und kann daher nicht durch Selektion mittels Oligo-dT isoliert werden. Es erfordert spezielle Ansätze, um die gewünschten Transkripte anzureichern. Hierzu zählt die Reduktion von rRNA aus Gesamt-RNA Proben mittels Ribo-Zero (Illumina) oder MICROBEnrich und MICROBExpress Kits (Ambion) zur Anreicherung bakterieller RNA und mRNA. Dennoch ist eine Anwendung auf RNA-Ebene immer kritisch, da trotz RNase-Inhibitoren mit jedem Arbeitsschritt ein RNA-Abbau stattfindet und die Qualität der Downstream Ergebnisse beeinflusst wird. Zudem werden meist große Mengen Ausgangsmaterial benötigt (> 5 µg) und dennoch wird nicht zwangsläufig eine Anreicherung erzielt, da Aspekte wie RNA-Integrität und Konzentration bakterieller RNA zu Wirts-RNA relevant sind [81]. Bakterielle Transkripte können auch nach der Umwandlung von RNA in cDNA angereichert werden, was den Vorteil einer erhöhten Stabilität der cDNA und weniger Ausgangsmaterial mit sich bringt. Hierbei wurde die *duplex-specific nuclease* (DSN) effizient eingesetzt zur Normalisierung von cDNA- oder RNA-seq-Bibliotheken [234, 244].

Die Arbeitsabläufe zur Herstellung bakterieller cDNA Bibliotheken wurden in unserer Arbeitsgruppe etabliert und für verschiedene Pathogene angewendet, daher wird die Methodik nicht nochmals vertiefend diskutiert [46, 91–93]. Es erfolgt die Umwandlung der Gesamt-RNA in cDNA mittels SMARTer® cDNA Library Construction Kit (Clontech). Das Verfahren nutzt die template-switching Aktivität der Moloney-murinen Leukämievirus (MMLV)-Reversen Transkriptase, um die Erststrang Synthese in einem Schritt abzuschließen und definierte 5' und 3' Ankersequenzen einzubringen [227, 243]. Hierfür nutzt man die Eigenschaft, dass die Reverse Transkriptase zusätzliche Basen am 3' Ende des neu synthetisierten cDNA-Strangs hinzugefügt [25], wobei das 5' Ende durch einen PolyA-Schwanz definiert ist. Für die Zweitstrang-Synthese werden darauf abgestimmte 5' und 3'-Primer eingesetzt. Folglich werden Vollängen Gene begünstigt und eine Orientierung der cDNA Sequenz gewährleistet. Die Herstellung von großen cDNA Bibliotheken mit randomisierten Fragmenten unterliegt oftmals einem Größenungleichgewicht, kleine Fragmente werden während der Ligationsreaktion und der Plasmidübertragung in *E. coli* begünstigt. Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung zahlreicher *E. coli* Klone, deren cDNA-Inserts zu 90 % aus nicht-proteinkodierenden Sequenzen bestanden, die größtenteils

kleiner 20 bp waren (S.47). Tendenziell führen diese Sequenzen zu falsch-positiven Aussagen, da sie häufig tRNA-Ursprung haben, keine spezifische Zuordnung zu einem Gen erfolgt oder die Wahrscheinlichkeit von cDNA aus degradierten Fragmenten steigt. Ab einer Größe von 20 bp können DNA Sequenzen typischerweise einem Gen eindeutig zugeordnet werden. Besonders im Hinblick auf das Immunscreening sind große Proteine und Fragmente interessant, da sie durch die Antikörper spezifisch detektiert werden können. Deshalb wurde vor der Ligationsreaktion ein definierter Größenausschluss für cDNA Sequenzen durchgeführt, was zu einer Anreicherung von Sequenzen größer 20 bp führte und somit die Wahrscheinlichkeit für proteinkodierende Inserts erhöhte. Daher ist der Größenausschluss ein erstes Fundament für die Generierung einer erfolgreichen Expressionsbibliothek.

Die gesamte Konstruktion der cDNA Bibliothek und die DSN-Normalisierung beruht auf der PCR-Amplifikation. Es ergeben sich Abhängigkeiten in einem Pool von Fragmenten unterschiedlicher Sequenz und Länge, die zu Unter- oder Überrepräsentation bestimmter Sequenzen führen können. Zusätzlich können sich Fehler in Templates ansammeln, die sich oft in Regionen mit geringer Komplexität befinden. Dies kann ebenfalls zu einem verzerrten Verhältnis von Template und Produkt oder Nebenprodukt führen, die durch Überamplifikation entstehen [165]. Eine dauerhafte Kontrolle der Qualität durch visuelle Darstellung mittels Elektrophorese oder Sequenzierung der Inserts nach der Klonierung gewährleisten eine erfolgreiche Etablierung der cDNA Bibliotheken. Das Auftreten von Concatameren kann durch eine sorgfältige Optimierung der PCR-Bedingungen, der Wahl der Polymerase und sorgfältige Auswahl der Amplifikations-Primer auf ein Minimum reduziert werden. Letzteres war der entscheidende Punkt für die erfolgreiche Amplifikation der cDNA Bibliothek. Jedoch war die RNA-Konzentration des Ausgangsmaterials der infektionsrelevanten RNA insbesondere der CI-RNA geringer als berechnet, was trotz der Optimierung bezüglich der Primer Zusammensetzung zum Auftreten von Concatameren führte und die Aussage des CI-Immunscreenings (Nr.1) verzerrte (S.50). Es wurde beschrieben, dass vorrangig bei Mischproben die Konzentration der bakteriellen RNA bei Analysen mit dem Bioanalyzer verzerrt angegeben werden [142], was zu einem ungünstigen Verhältnis von Primer zu RNA führte. Daher wurde die CI Bibliotheksgenerierung wiederholt und das RNA-Ausgangsmaterial von 0,9 µg auf 1,5 µg erhöht, wodurch die Entstehung von Concatameren behoben werden konnte und die resultierenden Bibliotheken IV, CN und CI sich in der Zusammensetzung von proteinkodierenden Genen zu nicht-proteinkodierenden Genen ähnlich waren (S.50). Die Ausbeute bakterieller RNA aus einem infektionsähnlichen Versuch war durch die Verwendung von 4x 75 cm² bzw. 3x 150 cm² Zellkulturflaschen limitiert. Es wurden maximale Ausbeuten von 3-10 µg aus einem Experiment erzielt. Durch die Verwendung einer RNA-Probe für die extern durchgeführte RNA-Sequenzierung (> 5 µg) und cDNA-Generierung für das Immunscreening (1-3 µg) wurden minimale Ausbeuten von > 8 µg benötigt, so dass eine Auswahl von RNA Proben bezüglich der Konzentration und der Integrität getroffen werden musste (S.44). Für die intrazelluläre CI RNA wurde die eukaryotische mRNA durch Aufreinigung reduziert, um sie für die nachfolgende cDNA Herstellung auszuschließen. Hierfür wurden Oligo (dT) Beads verwendet, welche PolyA

markierte eukaryotische mRNA aus dem Gemisch extrahieren. Restliche eukaryotische RNA-Fragmente werden zusammen mit bakterieller rRNA downstream bei der Normalisierung der cDNA-Bibliothek entfernt. Die RNA Vorbehandlung zeigte keinen Einfluss auf die RNA Integrität, diese war ähnlich zu IV und CN RNA Proben (S.41), wobei die RNA-Ausbeute durch die Aufreinigung bis zu 40 % sinkt.

Innerhalb der CI-Expressionsbibliotheken wurden 20 % der Sequenzen eukaryotischem Ursprung zugeordnet. Sie setzen sich aus ribosomalen, nicht-kodierenden oder kodierenden Genen zusammen. Zum einen ist die Separation von PolyA-mRNA nur bedingt erfolgreich, insbesondere, wenn die RNA teilweise degradiert vorliegt, wodurch potentiell mRNA in die CI Proben gelangt ist. Zum anderen ergibt sich ein negativer Effekt durch die Normalisierung, bei der prinzipiell nur bakterielle mRNA angereichert werden soll. Das Prinzip beruht generell auf der Anreicherung seltener gegenüber häufiger DNA-Sequenzen. In den Virulenz-adaptierten cDNA Proben sind allerdings eukaryotische gegenüber bakterielle cDNA relativ selten, da der Großteil bereits bei der differentiellen Lyse und zweistufiger Zentrifugation voneinander separiert wurde. Ebenso war die Herstellung der cDNA für die Sequenzierung problematisch, die von LGC Genomics durchgeführt wurde, da bei der Normalisierung der cDNA eine Anreicherung von humanen Sequenzen erfolgte, weshalb auf die Normalisierung verzichtet wurde. Für RNA-Seq Proben kann nachträglich ein *Post-alignment* Filter auf rRNA oder tRNA Regionen angewendet werden, wodurch die Sequenzen im Transkriptom nicht mehr auftauchen. Dennoch ist ein nachträgliches Filtern unerwünscht, da rRNA die Kapazität des Sequenzier-Chips unnötig einschränkt. Für die CI Bibliothek wurde das nicht in Erwägung gezogen, da die Probenanzahl auf dem Microarray limitiert ist und so viel wie möglich proteinkodierende Sequenzen darauf abgebildet werden sollen.

5.2.3. Immunscreening der Expressionsbibliotheken- immundominante Kandidaten

Die Identifizierung von immunogenen Proteinen erfolgte mittels eines Microarray-Screenings, worüber die in *E. coli* rekombinant erzeugten cDNA-basierten Proteine detektiert wurden. Die Verwendung des HaloTag®, als N-terminaler Fusionspartner gewährleistet eine kovalente Bindung zum synthetischen HaloTag Liganden, welcher sich auf der Oberfläche der Microarrays befand. Der HaloTag® wurde von Promega entwickelt [137, 160] und wird für eine Reihe von funktionellen Studien eingesetzt, darunter Protein-Microarrays, DNA-Protein und Protein-Protein-Interaktionen, Identifizierung von Proteinkomplexen und *in vitro* Imaging von Protein-Aktivität [58]. Hierbei ist der Vorteil gegenüber anderen Proteinmarkierungen, dass ein variabler HaloTag-Ligand schnell und mit hoher Affinität und Spezifität an das HaloTag-Protein bindet. Das erlaubt in der verwendeten Versuchsstrategie das Zelllysat direkt nach der rekombinanten Expression auf den Microarray-Slides zu koppeln, ohne das eine zusätzliche Aufreinigung durchgeführt werden muss [92]. Das Immunscreening wurde von Hoppe et al. erfolgreich etabliert und für unterschiedliche Pathogene angewendet, um mögliche Antigenkandidaten zu identifizieren [46, 91, 93]. Die Verwendung eines

spezifischen Tags in Kombination mit der Microarray Technologie ermöglicht einen Hochdurchsatz.

In diesem Immunscreening wurden insgesamt 768 Proteine pro Bibliothek und nahezu 4000 Proben je Slide untersucht (S.48). Nach dem Immunscreening der Bibliotheken (CI, CN, IV) wurden 64 Proteine identifiziert, dessen Expression im richtigen Leseraster erfolgte, was durch Sequenzanalyse bestimmt wurde (S.51). In Hinblick auf eine spezifische Detektion von *Salmonella* wurde eine Analyse der Sequenzen auf konservierte Bereiche durchgeführt, die die Auswahl von 64 immundominanten Proteinen (S.51) auf 16 Proteine aufsteigend des Phylums Proteobakterien eingegrenzt hat (S.53). Für einen schnellen diagnostischen Nachweis sind Membranproteine mit extrazellulären Bereichen interessant wie NuoL und NuoF. Ihre Antigenizität wurden bei Untersuchungen von EHEC mit humanem Serum bestätigt [102]. Die beiden Proteine sind in Bakterien konserviert und daher eher unspezifisch. Allerdings kann die Auswahl eines spezifischen Epitops, anhand der Protein-3D-Struktur, für die Generierung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers genutzt werden [104]. Aus den 64 immundominanten Proteinen haben sich drei Proteine aufgrund ihrer Spezies spezifischen Homologie hervorgehoben. Erstens, das Lipopolysaccharid-Biosynthese-Protein RfaB, welches in Enterobacteriales und näher in *Escherichia* Spezies, *Salmonella enterica* und *bongori* sowohl *Citrobacter rodentium/youngae*, *Cedecea davisae*, *Providencia stuartii* und *Pectobacterium wasabiae* konserviert ist. Zweitens die DNA-Translokase FtsK, die in den Spezies *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* und *Escherichia coli* konserviert ist. Drittens das Bakteriophagen-Protein SEN1810, welches konserviert in *Salmonella enterica* und *bongori* vorliegt.

Das Lipopolysaccharid-Biosynthese-Protein RfaB wurde vorrangig in Erregern des Magen-Darm-Trakts und des nah-assoziierten Harnweges identifiziert. Diese sind gekennzeichnet als eher unspezifische Erreger, die vorrangig bei einem Immundefekt pathogene Eigenschaften entwickeln. *Citrobacter rodentium* wird als Goldstandard für ein Mausmodell zur Untersuchung der Virulenz für die nah verwandten enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EPEC und EHEC) beschrieben [40]. Der humane Erreger *Citrobacter youngae* wurde vorrangig bei Infektionen immunsupprimierten Personen beschrieben [35]. In der medizinischen Literatur wurden *Cedecea davisae* und *Providencia stuartii* als Erreger für Harnwegs- oder Weichteilinfektionen in immunsupprimierte Personen bzw. Katheter-Patienten beschrieben [10, 163]. Möglicherweise ist RfaB ein interessanter Kandidat für nicht-typhöse Salmonellen (NTS). Die prädiktive subzelluläre Lokalisation für RfaB ist im Cytosol. Gleiches gilt für die DNA-Translokase FtsK, welche allerdings im N-terminalen Bereich eine Transmembranverankerung besitzt und im komplexen Prozess der bakteriellen Zellteilung beteiligt ist [20]. Der dritte Kandidat ist SEN1810, ein *Salmonella*-spezifisches Bakteriophagen-Protein unbekannter Funktion für das eine subzelluläre Lokalisation im Cytoplasma vorhergesagt wird. Kürzlich wurde in *S. Typhimurium* gezeigt, dass das Protein als Effektor vom T3SS-1 sekretiert wird und während der Invasion von Epithelzellen (HeLa) sowie dem intrazellulären Überleben in Makrophagen relevant ist [36, 199]. Bekannte Effektorproteine des T3SS wie SipA oder SipC induzieren eine starke

Immunantwort, insbesondere im MALT [55] oder wie zuletzt auch mit natürlichen *outer membran vesicles* gezeigt wurde [134]. Daher ist SEN1810 ein potentieller Impfstoffkandidat und durch die Konservierung innerhalb *Salmonella* auch ein prominenter Kandidat als spezifischer, cytosolischer Marker.

Der Großteil der Proteine wurde anhand der Aminosäuresequenz einer cytoplasmatischen Lokalisation zugeordnet (S.51). Das HaloTag Expressionssystem unterstützt die Expression sowohl für cytosolische als auch Membranproteine, wobei eine Erhöhung des Gehaltes und der Löslichkeit des rekombinanten Produktes, wie für das *maltose binding protein* (MBP), gezeigt wurden [135, 156]. Das Verhältnis von cytosolischen und Membranproteinen kann nicht direkt optimiert werden, da die Auswahl der 768 Klone zufällig erfolgt. Durch eine Automatisierung der Handhabung der rekombinanten *E. coli* Bibliothek könnte eine größere Anzahl an Klonen verarbeitet werden, wodurch mehr Proteine gleichzeitig untersucht werden könnten. Die Gesamtzahl protein-kodierender Gene beträgt 4502 für *S. Enteritidis* PT4 und kann ohne Automatisierung nicht vollständig erfasst werden. Bei der Durchführung von Immunscreenings können falsch-positive Signale detektiert werden. Diese resultieren aus fehlerhafter Expression von cDNA-Fragmenten, Kontaminationen und der Verwendung unzureichend spezifischer Antikörper (Antigendiversität). Insbesondere die Verwendung von polyklonalen Antikörpern hat einen Einfluss auf die Antigenauswahl, welche durch den zusätzlichen Einsatz von Seren verbessert werden kann. Die Validierung der unterschiedlichen *Salmonella* Bibliotheken wurde mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt, um eine gute Vergleichbarkeit für alle Screenings zu erhalten. Für eine weitere Charakterisierung der Kandidaten SEN1810, RfaB und FtsK sollten die Proteine in Volllänge hergestellt und unabhängig vom Microarray ebenso über einen ELISA quantitative Messungen durchgeführt werden.

Abgesehen von Proteinen mit immundominanten Eigenschaften wurden Proteine wiederholt im Immunscreening identifiziert, deren Expression (basierend auf der Sequenzinformation) vermutlich im falschen Leseraster erfolgte. Die Anreicherung dieser Proteine gibt einen Anhaltspunkt, dass eine Antigenizität vorliegt (S.70). Die Proteine FeoA und FeoB sind Eisen- (Fe^{2+}) -Transporter, wobei FeoB membranständig ist. Beide wurden charakteristisch hochreguliert in CI und CN (S.70). Die Eisen Aufnahme ist insbesondere im intrazellulären Wachstum wichtig, aufgrund der Eisen-limitierten Umgebung. In Proteobakterien und Pathogenen wie *Vibrio* [233] und *Legionella* [174] unterstützen Eisentransporter wie Feo wirksam die Virulenz. Wobei einige Eisentransporter wie z. B. IroN und TonB bereits als Antigen für Impfstoffe untersucht wurden [152] und ein Schutz mittels rekombinanter Antigene gegen *E. coli*-Infektionen bei Sepsis bestätigt wurde [147]. Ebenso Virulenz-assoziiert ist SEN4030, bezeichnet als SiiE in *S. Typhimurium*. Es ist ein Nicht-Fimbrien-Adhäsion und vermittelt den ersten Kontakt zur apikalen Seite von Epithelzellen [76]. SiiE ist Teil der SPI-4 zusätzlich zu einem T1SS, welches für die Sekretion von SiiE verantwortlich ist. Es reicht über die LPS Schicht hinaus während es sekretiert wird und geht dabei Bindung zu N-Acetylglucosaminen ein [65]. SEN4030 wurde bereits in einer vorherigen Arbeit als

immundominanter Kandidat beschrieben [46] und kann hier nochmals bestätigt werden. Anhand der Salmonella-spezifischen Konservierung stellt es einen interessanten Kandidaten dar. Weiterhin wurde in der IV-Bibliothek das Membranlipoprotein Lpp identifiziert, welches zur Virulenz in *Salmonella* beiträgt [193], aber auch in *Yersinia*, wo es als Knockout-Kandidat für Lebendimpfstoff untersucht wurde und ein Schutz gegen eine erneute Infektion im Mausmodell bewiesen wurde [192, 194]. In der Arbeit von Andersson, Sha 2017 [3] wurde ebenso auf ein Virulenz-assoziiertes Protein RbsA verwiesen, dessen Transkriptionsregulator RbsR in der CI-Bibliothek als immundominantes Protein identifiziert wurde (S.51).

5.2.4. Vergleich der Virulenz-adaptierter CI/CN und IV-Expressionsbibliothek-Anreicherung spezifischer Virulenz-assoziiierter Gene

Bei dem Immunscreening der cDNA-basierten Expressionsbibliothek besteht ein Ungleichgewicht zwischen der Gesamtzahl protein-kodierender Gene in *S. Enteritidis* PT4 zu möglichen Klonen die während des Microarray-Screenings untersucht werden können (4502 : 768). Das *in vitro* Infektionsmodell sollte eine Anreicherung von Virulenz-assoziierten Proteinen erzielen. Für eine Quantifizierung, der auf dem Microarray abgebildeten Gene, wurden die Genexpressionsdaten zur Definition der relativen Genexpression verwendet. Die direkte Übertragung der Genexpressionsdaten ist möglich, da es sich um die gleichen RNA-Proben zur cDNA Generierung für die Expressionsbibliothek wie für das RNA-Seq handelt. Je Bibliothek wurden 96 Proben aus der Expressionsbibliothek (768) untersucht und die Regulation der Gene in CN bzw. CI zu IV verglichen (S.67). Der Vergleich zeigte, dass circa 60 % der Gene nicht differentiell reguliert wurden. In CN wurden 33 % der Gene hochreguliert wiederum in CI nur 18 %. Die geringere Anzahl an CI positiv regulierten Genen begründet sich vermutlich in der Ähnlichkeit des Genexpressionsmusters von CI und IV, was anhand der Korrelation und der geringen Anzahl an DEGs sichtbar wurde (S. 54, S.56). Dennoch stellt das intrazelluläre Modell (CI) einen spezifischen Phänotyp dar, der sich klar von IV abgrenzt, was durch die Ausprägung von Sifs und der Expression von SCV und Sif-spezifischen Genen deutlich wurde (S.63). Daher wurde neben der Regulation auch die relative Anzahl an Transkripten je Gen verglichen und es konnte gezeigt werden, dass 10 % der häufigsten Transkripte je nach Transkriptom in der dazugehörigen Bibliothek vorkommen (S.69). Vergleicht man die Top96 der Transkriptome CI, CN und IV, so finden sich 40-60 % der gemeinsamen Transkripte zwischen CI und CN, aber keines in IV (S.124). Die Häufigkeit von Transkripten nimmt einen Einfluss auf die Verfügbarkeit in der cDNA-Bibliothek und folglich auf die Expressionsbibliothek. Anhand von Genregulation als auch der relativen Häufigkeit konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Bibliotheken unterscheidet. Die Bibliothek setzt sich ebenso aus cDNA-Sequenzen zusammen, deren relative Anzahl an Transkripten gering war bzw. deren Genexpression stark herunterreguliert war. So wurden Proteine identifiziert mit bis 56-fach geringerer Genexpression, dessen durchschnittliche Transkriptanzahl mit 304 als gering bezeichnet werden kann (S.67). Die Verfügbarkeit von Transkripten unterschiedlicher Anzahl zeigt auf, dass nicht nur häufige Transkripte in die Bibliothek eingebaut werden, sondern auch solche deren relative Häufigkeit klein ist.

Weiterhin wurden zwischen den drei Bibliotheken Proteine identifiziert, die doppelt auftraten (S.70). Doppelung erfolgten vorrangig zwischen den Bibliotheken CI- IV und CI- CN, deren Transkriptome stärker korrelieren. Mithilfe der Genexpressionsanalyse wurde gezeigt, dass zahlreiche Gene (~100) im IV Transkriptom nicht exprimiert wurden (S:65). Durch die positive Regulation von Genen, die für die Adhäsion an Wirtszellen als auch für das intrazelluläre Überleben essentiell sind, steigt die Anzahl an Transkripten und erhöht die Wahrscheinlichkeit in der cDNA Bibliothek und dem nachfolgenden Screening abgebildet zu werden. Zudem werden durch die infektiösen Bedingungen funktionelle Gene und Gencluster abgebildet, welche einen bestimmten Phänotypen beschreiben. Diese komprimierten Gene stellen eine geeignete Ressource für die Entwicklung von relevanten molekularen Markern dar. Die Konstruktion von spezifischen Bibliotheken erzeugt Vorteile, wenn der Schwerpunkt auf einem Infektionsrelevanten Modell liegt. Ferner wäre aber auch die Konstruktion von Bedingungen für Lebensmittel-relevante Screenings denkbar. Hierfür kann durch die Adaption unterschiedlicher *in vitro* Bedingungen eine spezifische Bibliothek für ein optimiertes Immunscreening angelegt werden. *Salmonella* zeigt beispielsweise bei Exposition zu Eiweiß von Hühnereiern eine spezifische Stressantwort und metabolische Veränderungen, die zu einer Verschiebung der Transkription führt [17, 195]. Der Einsatz von individuellen Bibliotheken erhöht die Erkennung spezifischer Proteine und kann durch die einfache Wiederverwendung der Expressionsbibliotheken gut umgesetzt werden. Die rekombinante *E. coli* Bibliotheken können nach Abschluss dauerhaft gelagert werden und für unterschiedliche Immunscreensings wiederverwendet werden.

In der Kategorie alleinige Expression im Virulenz-adaptierten Zustand wird die Relevanz eines individuellen Screenings sichtbar. Es konnten die Gene *SEN0276/0277*, *SEN1008* (ROD9) und *SEN1990* (ROD21) identifiziert werden, die zur *region of difference* (ROD) gehören [214] und in *Salmonella enterica* konserviert sind. RODs sind Gencluster, die nicht gemeinsam sind zwischen *S. Enteritidis* PT4 und *S. Typhimurium* LT2. Weiterhin wurden verhältnismäßig viele Pseudogene gefunden, die oftmals spezifisch sind, da sie kodierende Bereiche darstellen, die in *S. Enteritidis* PT4 vorhanden sind, aber in *S. Typhimurium* LT2 nicht. Dabei dominieren prophagen-bezogene Funktionen, wie Transposasen oder solche mit unbekannter Funktion (S.65). Für ROD21 als auch ROD9 wurde eine Relevanz in *in vivo* wie *in vitro* Infektionsmodellen beschrieben [48, 169]. Gleiches gilt für Phagen-assoziierte Proteine, deren Knockout oft mit einem Virulenzdefekt einhergeht [169, 195].

5.3. Transkriptomanalyse- *in vitro* Pathogen Genexpressionsprofil in Epithelzellen

Die Genexpressionsprofile für *S. Enteritidis* wurde in einem zeitlichen Verlauf analysiert, um eine Aussage über die Zelladhäsion (CN) und das intrazelluläre Überleben (CI) von *S. Enteritidis* in humanen Epithelzellen zu treffen. Der Vergleich zwischen CN und CI sollte spezifische adhäsionsrelevante Gene von intrazellulär-spezifischen Genen unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass die Genexpression zwischen CI und CN sehr kontrovers ist und eine viel zu große Anzahl an Genen (1045 DEGs), keine Eingrenzung CN bzw. CI spezifischer Gene erlaubt (Kapitel 4.4.1). Daher wurde das *in vitro* (IV) Transkriptom zum Vergleich hinzugezogen, um mögliche Gene, die bereits unter Laborbedingungen ähnlich exprimiert wurden, auszuschließen. Dadurch konnten eine kleinere Anzahl an DEGs eingegrenzt werden, die CI- bzw. CN-spezifisch und im Infektionsmodell angereichert waren. Dennoch wurden für das CN Transkriptom noch 547 DEGs als CN-spezifisch identifiziert (Abbildung 4.17, S.56). Wiederrum reduzierte sich die Anzahl in CI auf 114 spezifische DEGs. Daher lässt sich vermuten, dass die zeitliche Adaption (Inkubationszeit) einen Einfluss hatte. Die IV Salmonellen wurden über 4 Stunden unter kontinuierlichen Wachstumsbedingungen inkubiert, die CI Salmonellen verbleiben für 6 Stunden im Infektionsmodell und die CN-Salmonellen für 30 min. Die CN-spezifischen DEGs kodieren zum Großteil ribosomale Proteine und Proteine, die relevant für den Aminosäure-Transmembran-Transport sind (S.61). Gefolgt von Genen die für Lipoproteine wie SEN2428, SEN3512 und das Adhäsin SEN4030 sowie das SPI-4 Cluster kodieren. Die Funktion dieser Proteine ist als Adhäsin bereits in *S. Typhimurium* beschrieben, wie für das SadA assoziierte Protein (SEN3512) [77], das RpoE-regulierte Lipoprotein (SEN2428) [4] und das nicht-Fimbrien-Adhäsin (SiiE, SEN4030) [223]. Diese Gene wurden spezifisch hochreguliert, wohingegen andere Fimbrien Gene wie *fim* (S.63) und *pef* (Virulenzplasmid, S.64) kaum exprimiert wurden. Aus Studien ist bekannt, dass diese Fimbrien eine *in vivo* Bindungsspezifität besitzen und nur in geringen Mengen unter Standard Laborbedingungen vorhanden sind [37, 96]. Die Genexpression für Fimbrien erfolgte in CN nur mäßig, was auf die *in vitro* Bedingungen während der Infektion hinweist. Bereits im Kapitel 5.1.2 (A) zur Beschreibung der Invasion wurde die Vermutung aufgestellt, dass CN diverse Populationen beinhaltet, wobei einige Salmonellen Kontakt zu Wirtszellen aufnehmen und andere nicht. Für eine eindeutigere Zuordnung von invasionsrelevanten Genen, ist eine Vergleichsprobe bspw. kurz nach der Invasion interessant. Daraus resultierend wurden keine weiteren Analysen zu möglichen Invasions-relevanten Genen unternommen.

In CI kodieren die spezifischen DEGs vorrangig Proteine, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind, hierbei dominieren Transmembrantransporter, Proteine für Aminosäure- und Kohlenhydrat-Metabolismus (S.58). In den Kategorien sind viele Kohlenhydrat-assoziierte Gene zu finden, wie *uhpT* (Glukose-6-phosphat Transporter) als auch *SEN3593* und *SEN3594*, die für das (PEP)-abhängiges Zucker-Phosphotransferase-System (PTS) kodieren. Die Versorgung mit Zuckern, wie Glukose-6-phosphat innerhalb der SCV ist sehr wichtig und wird meist als Haupt-Kohlenstoffquelle verwendet [74]. Weiterhin konnte das Gen *yafH* (FadE) identifiziert werden, welches eine Acyl-Coenzym A Dehydrogenase kodiert, mit der

neben Zucker auch Lipide als Kohlenstoffquelle genutzt werden können. Es wurde bereits gezeigt, dass das Gen während der Infektion in Epithelzellen (MDCK) induziert wird [53]. Die vermehrten Aminosäure-Transporter (*glnK*, *leu*, *artJ*, SEN1417 (S.58)) können aufgrund von Lys und Met-Auxotrophie begründet werden, die hervorgerufen werden durch Wirtsabwehrmechanismen wie die Stickoxidproduktion. Weshalb eine Aufnahme von Aminosäuren aus der Wirtszelle erforderlich wird und bei Verlust zu einem intrazellulären Virulenzdefekt führt [166]. Die Aufnahme von Nährstoffen unter intrazellulären Bedingungen wurde bereits auf die SIF-Ausbildung zurückgeführt, die *Salmonella* mit dem Wirts-Endosomen-System verbindet und den Wirt sozusagen ausbeutet (Kap.5.1.2, B). Weiterhin sind viele Pathogenitäts-assoziierte Gene im CI-spezifischen Cluster zu finden, wie SPI-2, die der intrazellulären Sekretion zuzuordnen sind (S.58). Hierbei wurden die meisten Gene bereits im intrazellulären Infektionsgeschehen beschrieben, wie T3SS-2 (*ssa*), *sifB*, *sspH2* und weitere. Das CI-spezifische Cluster enthält eine Reihe an Genen, deren Funktion bereits *in vivo* bestätigt wurde und deren Verlust zu einem Virulenzdefekt führt.

Unabhängig von den bekannten Virulenzfaktoren wurden Gene untersucht, dessen Funktion im intrazellulären Verlauf noch nicht aufgeklärt wurden. Auffällig unter den CI-spezifischen Genen waren solche, die in einem Gencluster lagen (S.60). Hierzu gehört das Pseudogen SEN1171A-B (Fels-2 Prophage), die Lipid A Deacylase (SEN2228), welche im SPI-12 Cluster in *S. Typhimurium* liegt und Pili-assoziiertes Transmembranprotein (SEN1423). Durch die Deletion der Gene können wichtige Informationen über ihre Rolle bei der bakteriellen Virulenz bestimmt werden. Mittels Lambda-Red Rekombination wurden Knockout-Mutanten generiert und ein Einfluss im CaCo-2 Infektionsmodell untersucht (Kap.4.6, S.71). Es konnte eine signifikante Abschwächung im späten intrazellulären Stadium für Δ SEN1171AB identifiziert werden. Hierbei ist die Anzahl der intrazellulären Salmonellen 1,5-fach verringert im Vergleich zum WT (S.72). Das Pseudogen SEN1171B ist ein Ortholog zu *Hin* und *Fin* (STM2702) in *S. Typhimurium*, mit einer Sequenzähnlichkeit von 69 %, wobei SEN1171B nur 48 AS und *Hin* 185 AS umfasst. Das *Hin* Gen ist in *S. Typhimurium* LT2 an der Regulation des Flagella-Phasenwechsels beteiligt [124] und wurde später auch für das *Fin* Gen bestätigt [125]. Die Flagella-Phasenvariation erfolgt durch alternative Expression von *fliC* (Phase 1) und *fljB* (Phase 2), die Strukturgene des Flagellin. Dieser Wechsel der Flagellen Phase hilft den Salmonellen dabei, sich temporär vor der Immunantwort des Organismus zu schützen. Weiterhin ist bekannt, dass monomeres Flagellin ein Ligand für den TLR5 Rezeptor ist und eine proinflammatorische Reaktion in Epithelzellen auslöst [72]. Die Funktion der SEN1171B DNA-Invertase ist nicht bestätigt und eine Analogie zu *Fin* ist, aufgrund der ungenügenden Identität von nur 21 AS zu 181 AS des *Fin* Proteins, nicht zu erwarten. Dennoch wurde durch den Knockout von *SEN1171A-B* ein Einfluss im späten Zeitpunkt der Salmonellen-Infektion bestätigt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um einen Regulation von SEN1171B nachzuweisen, die möglicherweise spezifisch ist für *S. Enteritidis*. Der Genlokus befindet sich zwischen *pagK* und *pagO*, welche ebenso wie *SEN1171B* in CI hochreguliert sind (S.63). Dasselbe gilt für das umliegende Fels-2 Prophagen Gencluster *mig-3*, *SEN1170-73* (S.60). Es lässt sich vermuten, dass *SEN1171B* die Regulation der

umliegenden Gene beeinflusst, was ebenso zu einer Abschwächung im Infektionsmodell nach sich ziehen könnte. Des Weiteren konnte für die Knockout Mutanten *SEN2228* und *SEN1423* kein Einfluss im Infektionsmodell nachgewiesen werden. Die SPI-12 ist ein remnant Phage-Locus und wurde mit dem intrazellulären Überleben von Salmonellen in Verbindung gebracht, wobei die Funktion vorrangig in Typhimurium bestätigt wurde [216]. Die Regulation des Homologs in Typhimurium [201] gleicht dessen in Enteritidis. Die Deletion des Gens führte dennoch zu keinem gravierenden Einfluss im Infektionsmodell. Die quantitative Untersuchung der Knockout-Mutanten erzielte eine begrenzte Aussage, da nur ein abweichender Infektionsverlauf detektiert wurde. Für die Identifizierung von Kandidaten eines abgeschwächten Phänotyps war diese Untersuchung ausreichend. Der Vergleich der Transkriptome von Knockout und Wildtyp würde einen detaillierten Einfluss und Interaktion zu Genen aufzeigen. Somit ist die Expression der SPI-12 und Pili-assoziierten Gene *SEN2228* und *SEN1423* wichtig, aber nicht essentiell. Anhand von spezifisch ausgewählten Genen des intrazellulären Salmonellen Transkriptoms wurde ein Kandidat identifiziert, dessen Knockout einen abgeschwächten Phänotyp erzeugt. Zudem ist das Pseudogen *SEN1171B* aufgrund der Konservierung in *Salmonella* ein spezifisches Target und könnte für therapeutische Anwendungen interessant sein. Virulenz-assoziierte Gene sind bspw. für die Entwicklung von Lebendimpfstoffen bedeutungsvoll. Hierbei kann durch Deletion eine anschließend wirksame therapeutische Intervention durchgeführt werden. Neben der Verwendung als Lebendimpfstoff kann auch der Einsatz zur Krebstherapie angedacht werden. Hierbei sind Effektoren hilfreich, die zu einem induzierten Zelltod der Wirtszellen führen wie SipB, das einen Caspase-1-Weg in Makrophagen aktiviert und zu Apoptose führt [183]. Möglicherweise erzielt der Knockout von *SEN1171B* einen ähnlichen Effekt, wodurch es für die Krebstherapie einen adäquaten Phänotyp generiert. Die Invasion in die Epithelzellen war nicht vermindert, sondern allein die Anzahl der intrazellulären Salmonellen. Dies könnte durch eine frühzeitige Erkennung des Wirts begründet sein, welche mit einer frühen Inflammation und Zelltod einhergeht.

6. Zusammenfassung

Die Folgen einer lebensmittelbedingten Erkrankung sind zum Teil gravierend, insbesondere für Kinder und immunsupprimierte Menschen. Hierbei gehören *Salmonella* und *Campylobacter* zu den häufigsten Erregern, die verantwortlich für gastrointestinale Erkrankungen in Deutschland sind. Trotz umfassender Maßnahmen der EU zur Prävention und Bekämpfung von Salmonellen in Geflügelbeständen und der Lebensmittel-Industrie, wird von einem stagnierenden Trend von Infektionszahlen berichtet. Zoonose-Erreger wie Salmonellen können über Nutztiere in die Nahrungskette des Menschen gelangen, wodurch sich Infektionsherde schnell ausbreiten können. Dabei sind bestehende Präventionsstrategien für Geflügel vorhanden, die aber nicht auf den Menschen übertragbar sind. Folglich sind Diagnostik und Prävention in der Lebensmittelindustrie essentiell. Deshalb besteht ein hoher Bedarf für spezifische, sensitive und zuverlässige Nachweismethoden, die eine Point-of-care Diagnostik gewährleisten. Durch ein wachsendes Verständnis der wirtsspezifischen Faktoren von *S. enterica* Serovaren kann die Entwicklung sowohl neuartiger diagnostischer Methoden, als auch neuartiger Therapien und Impfstoffe maßgeblich vorangetrieben werden.

Infolgedessen wurde in dieser Arbeit ein infektionsähnliches *in vitro* Modell für *S. Enteritidis* etabliert und darauf basierend eine umfassende Untersuchung zur Identifizierung neuer Zielstrukturen für den Erreger durchgeführt. Während einer Salmonellen-Infektion ist die erste zelluläre Barriere im Wirt die Epithelschicht. Dementsprechend wurde eine humane Zelllinie (CaCo-2, Darmepithel) für die Pathogen-Wirt-Studie ausgewählt. Das Salmonellen-Transkriptom und morphologische Eigenschaften der Epithelzellen wurden in verschiedenen Phasen der Salmonellen-Infektion untersucht und mit bereits gut beschriebenen Virulenzfaktoren und Beobachtungen in Bezug gesetzt. Durch dieses Infektionsmodell konnte ein spezifischer Phänotyp für die intrazellulären Salmonellen in den Epithelzellen nachgewiesen werden. Zudem wurde aufgezeigt, dass bereits die Kultivierung in Flüssigmedium einen invasionsaktiven Zustand der Salmonellen erzeugt. Allerdings wurde durch die Kokultivierung mit Epithelzellen eine zusätzliche Expression relevanter Gene induziert, um eine effiziente Adhäsion und Transmembran-Transport zu gewährleisten. Letzterer ist charakteristisch für die intrazelluläre Limitierung von Nährstoffen und prägt den infektionsrelevanten Status. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ergab sich ein Phänotyp, der eindeutig Mechanismen zur Wirtsadaptation und möglicherweise auch Pathogenese aufzeigt. Die intrazellulären Bakterien müssen vom Wirt separiert werden, was ein wesentlicher Schritt für Pathogen-bestimmende Analysen ist. Hierbei wurde mithilfe einer Detergenz-basierten Lyse der eukaryotischen Zellmembran und differentieller Zentrifugation, der eukaryotische Eintrag minimal gehalten. Unter Verwendung der Virulenz-adaptierten Salmonellen wurden Untersuchungen in Hinblick auf die Identifizierung neuer Zielstrukturen für *S. Enteritidis* durchgeführt. Mithilfe eines immunologischen Screenings wurden neue potentielle Antigene entdeckt. Zu diesem Zweck wurden bakterielle cDNA-basierte Expressionsbibliotheken hergestellt, die durch eine vereinfachte Microarray-Anwendung ein Hochdurchsatzscreening von Proteinen als potentielle Binder ermöglichen. Folglich konnten

neue unbeschriebene Proteine identifiziert werden, die sich durch eine *Salmonella*-Spezifität oder Membranständigkeit auszeichnen. Ebenso wurde ein Vergleich der im Screening identifizierten Proteine mit der Regulation der kodierenden Gene im infektiönsähnlichen Modell durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Häufigkeit von Transkripten einen Einfluss auf die Verfügbarkeit in der cDNA-Bibliothek und folglich auch auf die Expressionsbibliothek nimmt. Angesichts eines Ungleichgewichts zwischen der Gesamtzahl protein-kodierender Gene in *S. Enteritidis* zu möglichen Klonen, die während des Microarray-Screenings untersucht werden können, besteht der Bedarf einer Anreicherung von Proteinen in der Expressionsbibliothek. Das infektiönsähnliche Modell zeigte, dass nicht nur Virulenz-assoziierte, sondern auch Stress- und Metabolismus-relevante Gene hochreguliert werden. Durch die Konstruktion dieser spezifischen cDNA-Bibliotheken ist die Erkennung von charakteristischen molekularen Markern gegeben.

Weiterhin wurden anhand der Transkriptomanalyse spezifisch hochregulierte Gene identifiziert, die relevant für das intrazelluläre Überleben von *S. Enteritidis* in humanen Epithelzellen sind. Hiervon wurden drei Gene näher untersucht, indem ihr Einfluss im infektiönsähnlichen Modell mittels entsprechender Gen-Knockout-Stämme analysiert wurde. Dabei wurde für eine dieser Mutanten ein reduziertes Wachstum in der späten intrazellulären Phase nachgewiesen. Weiterführende *in vitro* Analysen sind für die Charakterisierung des Knockout-Stamms notwendig, um den Einsatz als potenzielles Therapeutikum zu verifizieren. Zusammenfassend wurde ein *in vitro* Infektionsmodell für *S. Enteritidis* etabliert, wodurch neue Zielstrukturen des Erregers identifiziert wurden. Diese sind für diagnostische oder therapeutische Anwendungen interessant. Das Modell lässt sich ebenso für andere intrazelluläre Pathogene übertragen und gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung von potentiellen Antigenen.

7. Abstract

The outcomes of food-borne diseases are in part severe, especially for children and immunocompromised people. *Salmonella* and *Campylobacter* are among the most common pathogens responsible for gastrointestinal diseases in Germany. Despite the comprehensive EU efforts to prevent and control salmonella in poultry flocks and the food industry, a trend of stagnating outbreaks is reported. Zoonotic agents like salmonella can enter the human food chain through livestock, allowing colonies to spread rapidly. There are existing prevention strategies for poultry, but they are not transferable to humans. Consequently, diagnostics and prevention are essential in the food industry. Therefore, a high demand exists for specific, sensitive and reliable detection methods that guarantee point-of-care diagnostics. Through a growing understanding of the host-specific factors of *S. enterica* serovars, the development of novel diagnostic methods as well as novel therapies and vaccines can be significantly advanced.

As a result, an infection-like *in vitro* model for *S. Enteritidis* was established and a comprehensive study was conducted to identify new target structures for the pathogen. During a salmonella infection, the first cellular barrier in the host is the epithelial layer. Accordingly, a human cell line (CaCo-2, intestinal epithelium) was selected for the pathogen-host study. The salmonella transcriptome and morphological properties of epithelial cells were studied at different stages of salmonella infection and were compared with well-described virulence factors and findings. Through this infection model, a specific phenotype for intracellular salmonella in epithelial cells could be detected. In addition, it was shown that cultivation in liquid medium already induces an invasion-active state of salmonella. However, co-cultivation with epithelial cells induced additional expression of specific genes to ensure efficient adhesion and transport of the membrane. The latter is characteristic for the intracellular limitation of nutrients and determines the infection-relevant status. Taking these factors into account, a phenotype with clear mechanisms for host adaptation and also potentially pathogenesis was observed. The intracellular bacteria must be separated from the host, which is an essential step for pathogen-determined analyses. With the help of detergent-based lysis of the eukaryotic cell membrane and differential centrifugation, the eukaryotic input was kept to a minimum. Using virulence-adapted Salmonella RNA, experiments were conducted to identify new target structures for *S. Enteritidis*. With the help of immunological screening, new potential antigens were discovered. For this purpose, bacterial cDNA-based expression libraries were created that enable high-throughput protein screening through a simplified microarray application providing potential binders. Consequently, new undescribed proteins characterised by salmonella specificity or membrane origin could be identified. A comparison of the identified screening proteins with the regulation of the coding genes in the infection-like model was also carried out. It became clear that the frequency of transcripts has an influence on their availability in the cDNA library and consequently also on the expression library. Given an imbalance between the total number of protein-coding genes in *S. Enteritidis* and possible clones that can be tested during microarray screening, there is a need for protein

enrichment in the expression library. The infection-like model showed that not only genes associated with virulence but also genes relevant to stress and metabolism are upregulated. The construction of such specific cDNA libraries enables the recognition of characteristic molecular markers.

Furthermore, transcriptome analysis was used to identify specifically up-regulated genes that are relevant for the intracellular survival of *S. Enteritidis* in human epithelial cells. Three of these genes were investigated in more detail by examining their influence in the infection-like model using corresponding gene knockout strains. For one of these mutants, reduced growth in the late intracellular phase was proven. Further *in vitro* analyses are necessary for the characterization of the knockout strain in order to verify its use as a potential therapeutic agent. In summary, an *in vitro* infection model for *S. Enteritidis* was established, which revealed new target structures of the pathogen. These are interesting for diagnostic or therapeutic applications. The model can also be transferred to other intracellular pathogens and provides reliable identification of potential antigens.

Literaturverzeichnis

- [1] Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 4, 783–801.
- [2] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 3, 403–410.
- [3] Andersson, J. A., Sha, J., Erova, T. E., Fitts, E. C., Ponnusamy, D., Kozlova, E. V., Kirtley, M. L., and Chopra, A. K. 2017. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 448.
- [4] Andreatta, M., Nielsen, M., Møller Aarestrup, F., and Lund, O. 2010. In silico prediction of human pathogenicity in the γ -proteobacteria. *PLoS ONE* 5, 10, e13680.
- [5] Andreu, N., Phelan, J., Sessions, P. F. de, Cliff, J. M., Clark, T. G., and Hibberd, M. L. 2017. Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports* 7, 42225.
- [6] Andrews, J. R., Prajapati, K. G., Eypper, E., Shrestha, P., Shakya, M., Pathak, K. R., Joshi, N., Tiwari, P., Risal, M., Koirala, S., Karkey, A., Dongol, S., Wen, S., Smith, A. B., Maru, D., Basnyat, B., Baker, S., Farrar, J., Ryan, E. T., Hohmann, E., and Arjyal, A. 2013. Evaluation of an electricity-free, culture-based approach for detecting typhoidal *Salmonella* bacteremia during enteric fever in a high burden, resource-limited setting. *PLoS neglected tropical diseases* 7, 6, e2292.
- [7] Angus, A. A., Lee, A. A., Augustin, D. K., Lee, E. J., Evans, D. J., and Fleiszig, S. M. J. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* Induces Membrane Blebs in Epithelial Cells, Which Are Utilized as a Niche for Intracellular Replication and Motility. *Infection and Immunity* 76, 5, 1992–2001.
- [8] Antti, H., Fahlgren, A., Näsström, E., Kouremenos, K., Sundén-Cullberg, J., Guo, Y., Moritz, T., Wolf-Watz, H., Johansson, A., and Fallman, M. 2013. Metabolic profiling for detection of *Staphylococcus aureus* infection and antibiotic resistance. *PLoS ONE* 8, 2, e56971.
- [9] Arabyan, N., Park, D., Foutouhi, S., Weis, A. M., Huang, B. C., Williams, C. C., Desai, P., Shah, J., Jeannotte, R., Kong, N., Lebrilla, C. B., and Weimer, B. C. 2016. *Salmonella* Degrades the Host Glycocalyx Leading to Altered Infection and Glycan Remodeling. *Scientific Reports* 6, srep29525.
- [10] Armbruster, C. E., Smith, S. N., Yep, A., and Mobley, H. L. T. 2014. Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. *The Journal of infectious diseases* 209, 10, 1524–1532.
- [11] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., Castro, E. de, Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., and Stockinger, H. 2012. ExPASy. SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 40, Web Server issue, W597-603.
- [12] Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., and Sasakawa, C. 2011. Cell death and infection. A double-edged sword for host and pathogen survival. *The Journal of cell biology* 195, 6, 931–942.
- [13] Awortwe, C., Fasinu, P. S., and Rosenkranz, B. 2014. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies. Current approaches and challenges. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 17, 1, 1–19.
- [14] Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., and Gordon, J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)* 307, 5717, 1915–1920.
- [15] Bakowski, M. A., Braun, V., and Brumell, J. H. 2008. *Salmonella*-containing vacuoles. Directing traffic and nesting to grow. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9, 12, 2022–2031.
- [16] Barlag, B., Beutel, O., Janning, D., Czarniak, F., Richter, C. P., Kommnick, C., Göser, V., Kurre, R., Fabiani, F., Erhardt, M., Piehler, J., and Hensel, M. 2016. Single molecule super-resolution imaging of proteins in living *Salmonella enterica* using self-labelling enzymes. *Scientific Reports* 6, 31601.

-
- [17] Baron, F., Bonnassie, S., Alabdeh, M., Cochet, M.-F., Nau, F., Guérin-Dubiard, C., Gautier, M., Andrews, S. C., and Jan, S. 2017. Global Gene-expression Analysis of the Response of Salmonella Enteritidis to Egg White Exposure Reveals Multiple Egg White-imposed Stress Responses. *Frontiers in microbiology* 8, 829.
- [18] Bascuas, T., Moreno, M., Grille, S., and Chabalgoity, J. A. 2018. Salmonella Immunotherapy Improves the Outcome of CHOP Chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma-Bearing Mice. *Frontiers in immunology* 9, 7.
- [19] Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N., and Valdivia, R. H. 2013. Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3, 5, a010256.
- [20] Berezuk, A. M., Goodyear, M., and Khursigara, C. M. 2014. Site-directed fluorescence labeling reveals a revised N-terminal membrane topology and functional periplasmic residues in the Escherichia coli cell division protein FtsK. *The Journal of biological chemistry* 289, 34, 23287–23301.
- [21] Birmingham, C. L., Jiang, X., Ohlson, M. B., Miller, S. I., and Brumell, J. H. 2005. Salmonella-Induced Filament Formation Is a Dynamic Phenotype Induced by Rapidly Replicating Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 73, 2, 1204–1208.
- [22] Blair, D. F. 1995. How bacteria sense and swim. *Annual review of microbiology* 49, 489–522.
- [23] Boddicker, J. D. and Jones, B. D. 2004. Lon protease activity causes down-regulation of Salmonella pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infection and Immunity* 72, 4, 2002–2013.
- [24] Bolton, F. J., Fritz, E., Poynton, S., and Jensen, T. 2000. Rapid enzyme-linked immunoassay for detection of Salmonella in food and feed products. Performance testing program. *Journal of AOAC International* 83, 2, 299–303.
- [25] Boone, M., Koker, A. de, and Callewaert, N. 2018. Capturing the 'ome'. The expanding molecular toolbox for RNA and DNA library construction. *Nucleic Acids Res.* 46, 6, 2701–2721.
- [26] Boyd, M. A., Tennant, S. M., Melendez, J. H., Toema, D., Galen, J. E., Geddes, C. D., and Levine, M. M. 2015. Adaptation of red blood cell lysis represents a fundamental breakthrough that improves the sensitivity of Salmonella detection in blood. *Journal of applied microbiology* 118, 5, 1199–1209.
- [27] Brennan, M. A. and Cookson, B. T. 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular Microbiology* 38, 1, 31–40.
- [28] Briken, V. 2008. Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions and their Potential for the Discovery of New Drug Targets. *Current drug targets* 9, 2, 150–157.
- [29] Bruno, M. E. C., Frantz, A. L., Rogier, E. W., Johansen, F.-E., and Kaetzel, C. S. 2011. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor by the classical and alternative NF- κ B pathways in intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunology* 4, 4, 468.
- [30] Bueno, S. M., Wozniak, A., Leiva, E. D., Riquelme, S. A., Carreño, L. J., Hardt, W.-D., Riedel, C. A., and Kalergis, A. M. 2010. Salmonella pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology* 130, 2, 273–287.
- [31] Bürki, S., Gaschen, V., Stoffel, M. H., Stojiljkovic, A., Frey, J., Kuehni-Boghenbor, K., and Pilo, P. 2015. Invasion and persistence of Mycoplasma bovis in embryonic calf turbinat cells. *Veterinary research* 46, 53.
- [32] Butler, S. A., Khanlian, S. A., and Cole, L. A. 2001. Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *Clinical chemistry* 47, 12, 2131–2136.
- [33] Castanheira, S. and García-Del Portillo, F. 2017. Salmonella Populations inside Host Cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 432.
- [34] Chen, J., Tang, J., Liu, J., Cai, Z., and Bai, X. 2012. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of applied microbiology* 112, 4, 823–830.
- [35] Chen, K. J., Chen, T. H., and Sue, Y. M. 2013. Citrobacter youngae and Pantoea agglomerans peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 33, 3, 336–337.
-

- [36] Cheng, S., Wang, L., Liu, Q., Qi, L., Yu, K., Wang, Z., Wu, M., Liu, Y., Fu, J., Hu, M., Li, M., Zhou, D., and Liu, X. Identification of a novel Salmonella type III effector by quantitative secretome profiling. *Mol Cell Proteomics*, mcp.000230.2017. DOI=10.1074/mcp.RA117.000230.
- [37] Chessa, D., Dorsey, C. W., Winter, M., and Bäuml, A. J. 2008. Binding specificity of Salmonella plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *The Journal of biological chemistry* 283, 13, 8118–8124.
- [38] Cho, I.-H. and Ku, S. 2017. Current Technical Approaches for the Early Detection of Foodborne Pathogens. Challenges and Opportunities. *International journal of molecular sciences* 18, 10.
- [39] Cho, Y., Park, S., Barate, A. K., Truong, Q. L., Han, J. H., Jung, C.-H., Yoon, J. W., Cho, S., and Hahn, T.-W. 2015. Proteomic analysis of outer membrane proteins in Salmonella enterica Enteritidis. *Journal of microbiology and biotechnology* 25, 2, 288–295.
- [40] Collins, J. W., Keeney, K. M., Crepin, V. F., Rathinam, V. A. K., Fitzgerald, K. A., Finlay, B. B., and Frankel, G. 2014. Citrobacter rodentium. Infection, inflammation and the microbiota. *Nature reviews. Microbiology* 12, 9, 612–623.
- [41] Cornelis, G. R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature reviews. Microbiology* 4, 11, 811–825.
- [42] Cossart, P. and Lebreton, A. 2014. A trip in the "New Microbiology" with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS letters* 588, 15, 2437–2445.
- [43] Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G. 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria. Structural and mechanistic insights. *Nature reviews. Microbiology* 13, 6, 343–359.
- [44] Crane, J. K., Majumdar, S., and Pickhardt, D. F. 1999. Host cell death due to enteropathogenic *Escherichia coli* has features of apoptosis. *Infection and Immunity* 67, 5, 2575–2584.
- [45] Creasey, E. A. and Isberg, R. R. 2014. Maintenance of vacuole integrity by bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 17, 46–52.
- [46] Danckert, L., Hoppe, S., Bier, F. F., and Nickisch-Rosenegk, M. von. 2014. Rapid identification of novel antigens of Salmonella Enteritidis by microarray-based immunoscreening. *Microchim Acta*.
- [47] Darwin, K. H. and Miller, V. L. 2001. Type III secretion chaperone-dependent regulation. Activation of virulence genes by SicA and InvF in Salmonella typhimurium. *The EMBO journal* 20, 8, 1850–1862.
- [48] Das, S., Ray, S., Ryan, D., Sahu, B., and Suar, M. 2018. Identification of a novel gene in ROD9 island of Salmonella Enteritidis involved in the alteration of virulence-associated genes expression. *Virulence* 9, 1, 348–362.
- [49] Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12, 6640–6645.
- [50] Deiwick, J., Salcedo, S. P., Boucrot, E., Gilliland, S. M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S. R., Gorvel, J.-P., Holden, D. W., and Méresse, S. 2006. The translocated Salmonella effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infection and Immunity* 74, 12, 6965–6972.
- [51] Denagamage, T., Jayarao, B., Patterson, P., Wallner-Pendleton, E., and Kariyawasam, S. 2015. Risk Factors Associated With Salmonella in Laying Hen Farms. Systematic Review of Observational Studies. *Avian diseases* 59, 2, 291–302.
- [52] Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R., and Indrio, F. 2013. Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian journal of pediatrics* 39, 15.
- [53] Diacovich, L., Lorenzi, L., Tomassetti, M., Méresse, S., and Gramajo, H. 2017. The infectious intracellular lifestyle of Salmonella enterica relies on the adaptation to nutritional conditions within the Salmonella-containing vacuole. *Virulence* 8, 6, 975–992.
- [54] DiMarco, R. L., Hunt, D. R., Dewi, R. E., and Heilshorn, S. C. 2017. Improvement of paracellular transport in the Caco-2 drug screening model using protein-engineered substrates. *Biomaterials* 129, 152–162.
- [55] Durand, D., Ochoa, T. J., Bellomo, S. M. E., Contreras, C. A., Bustamante, V. H., Ruiz, J., and Cleary, T. G. 2013. Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal

- immune response against proteins of the type III secretion system of Salmonella, Shigella and enteropathogenic Escherichia coli. *The Pediatric infectious disease journal* 32, 10, 1122–1126.
- [56] Edwards, A. M., Potts, J. R., Josefsson, E., and Massey, R. C. 2010. Staphylococcus aureus host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS pathogens* 6, 6, e1000964.
- [57] Elsinghorst, E. A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods in enzymology* 236, 405–420.
- [58] England, C. G., Luo, H., and Cai, W. 2015. HaloTag technology. A versatile platform for biomedical applications. *Bioconjugate chemistry* 26, 6, 975–986.
- [59] Eri, R. and Chiappa, M. 2013. Messages from the Inside. The Dynamic Environment that Favors Intestinal Homeostasis. *Frontiers in immunology* 4, 323.
- [60] Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J. C. D. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Mol. Microbiol.* 47, 1, 103–118.
- [61] Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J. C. D. 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular Salmonella enterica. *Molecular Microbiology* 47, 1, 103–118.
- [62] European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Annual Epidemiological Report 2016 – Typhoid and paratyphoid fever. *Stockholm: ECDC*.
- [63] Everest, P., Roberts, M., and Dougan, G. 1998. Susceptibility to Salmonella typhimurium infection and effectiveness of vaccination in mice deficient in the tumor necrosis factor alpha p55 receptor. *Infection and Immunity* 66, 7, 3355–3364.
- [64] Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., and Gordon, M. A. 2012. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet* 379, 9835, 2489–2499.
- [65] Fiskin, E., Bhogaraju, S., Herhaus, L., Kalayil, S., Hahn, M., and Dikic, I. 2017. Structural basis for the recognition and degradation of host TRIM proteins by Salmonella effector SopA. *Nature communications* 8, 14004.
- [66] Fitzgerald, M. L., Moore, K. J., Freeman, M. W., and Reed, G. L. 2000. Lipopolysaccharide induces scavenger receptor A expression in mouse macrophages. A divergent response relative to human THP-1 monocyte/macrophages. *The Journal of Immunology* 164, 5, 2692–2700.
- [67] Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E.-J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., and Schrenzel, J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS immunology and medical microbiology* 62, 1, 41–48.
- [68] Freeman, J. A., Ohl, M. E., and Miller, S. I. 2003. The Salmonella enterica serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the Salmonella-containing vacuole. *Infection and Immunity* 71, 1, 418–427.
- [69] Garcia-del Portillo, F. and Finlay, B. B. 1994. Salmonella invasion of nonphagocytic cells induces formation of macropinosomes in the host cell. *Infection and Immunity* 62, 10, 4641–4645.
- [70] Gerlach, R. G., Cláudio, N., Rohde, M., Jäckel, D., Wagner, C., and Hensel, M. 2008. Cooperation of Salmonella pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cellular Microbiology* 10, 11, 2364–2376.
- [71] Gerlach, R. G., Jäckel, D., Hölzer, S. U., and Hensel, M. 2009. Rapid oligonucleotide-based recombineering of the chromosome of Salmonella enterica. *Applied and environmental microbiology* 75, 6, 1575–1580.
- [72] Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. 2001. Cutting Edge. Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *The Journal of Immunology* 167, 4, 1882–1885.
- [73] Goto, Y. and Kiyono, H. 2012. Epithelial barrier. An interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunological reviews* 245, 1, 147–163.
- [74] Götz, A., Eylert, E., Eisenreich, W., and Goebel, W. 2010. Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PLoS ONE* 5, 5, e10586.

- [75] Granger, E., McNee, G., Allan, V., and Woodman, P. 2014. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Seminars in cell & developmental biology* 31, 20–29.
- [76] Griessl, M. H., Schmid, B., Kassler, K., Braunsmann, C., Ritter, R., Barlag, B., Stierhof, Y.-D., Sturm, K. U., Danzer, C., Wagner, C., Schäffer, T. E., Sticht, H., Hensel, M., and Müller, Y. A. 2013. Structural Insight into the Giant Ca²⁺-Binding Adhesin SiiE: Implications for the Adhesion of *Salmonella enterica* to Polarized Epithelial Cells. *Structure* 21, 5, 741–752.
- [77] Grin, I., Hartmann, M. D., Sauer, G., Hernandez Alvarez, B., Schütz, M., Wagner, S., Madlung, J., Macek, B., Felipe-Lopez, A., Hensel, M., Lupas, A., and Linke, D. 2014. A trimeric lipoprotein assists in trimeric autotransporter biogenesis in enterobacteria. *The Journal of biological chemistry* 289, 11, 7388–7398.
- [78] Groisman, E. A. and Ochman, H. 1996. Pathogenicity Islands. *Bacterial Evolution in Quantum Leaps. Cell* 87, 5, 791–794.
- [79] Hansmeier, N., Miskiewicz, K., Elpers, L., Liss, V., Hensel, M., and Sterzenbach, T. 2017. Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Scientific Reports* 7, 1, 10326.
- [80] HAUTEFORT, I., THOMPSON, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R. J. M., Ahmad, N., RHEN, M., and Hinton, J. C. D. 2008. During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cellular Microbiology* 10, 4, 958–984.
- [81] He, S., Wurtzel, O., Singh, K., Froula, J. L., Yilmaz, S., Tringe, S. G., Wang, Z., Chen, F., Lindquist, E. A., Sorek, R., and Hugenholtz, P. 2010. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. *Nature methods* 7, 10, 807–812.
- [82] Heffernan, E. J., Wu, L., Louie, J., Okamoto, S., Fierer, J., and Guiney, D. G. 1994. Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes *rck* from *Salmonella typhimurium* and *ail* from *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* 62, 11, 5183–5186.
- [83] Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P., Steele-Mortimer, O., Borg, J.-P., Gorvel, J.-P., and Méresse, S. 2006. The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 36, 13497–13502.
- [84] Herhaus, L. and Dikic, I. 2017. Regulation of *Salmonella*-host cell interactions via the ubiquitin system. *International journal of medical microbiology : IJMM*.
- [85] Herweg, J.-A., Hansmeier, N., Otto, A., Geffken, A. C., Subbarayal, P., Prusty, B. K., Becher, D., Hensel, M., Schaible, U. E., Rudel, T., and Hilbi, H. 2015. Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 5, 48.
- [86] Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96, 3, 736–749.
- [87] HINTON, J., HAUTEFORT, I., ERIKSSON, S., THOMPSON, A., and RHEN, M. 2004. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Current Opinion in Microbiology* 7, 3, 277–282.
- [88] Hochrein, H., Schlatter, B., O’Keeffe, M., Wagner, C., Schmitz, F., Schiemann, M., Bauer, S., Suter, M., and Wagner, H. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 31, 11416–11421.
- [89] Hof, H. and Dörries, R. 2005. *Medizinische Mikrobiologie. 198 Tabellen ; [nach neuer AO - mit den Fächern: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, klinische Infektiologie, Hygiene]*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- [90] Hoffmann, S., Walter, S., Blume, A.-K., Fuchs, S., Schmidt, C., Scholz, A., and Gerlach, R. G. 2018. High-Throughput Quantification of Bacterial-Cell Interactions Using Virtual Colony Counts. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 8, 43.

-
- [91] Hoppe, S., Bier, F. F., Nickisch-Rosenegk, M. v., and Rodrigues, M. M. 2013. Rapid Identification of Novel Immunodominant Proteins and Characterization of a Specific Linear Epitope of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE* 8, 5, e65837.
- [92] Hoppe, S., Bier, F. F., and Nickisch-Rosenegk, M. von. 2012. Microarray-based method for screening of immunogenic proteins from bacteria. *J Nanobiotechnol* 10, 1, 12.
- [93] Hoppe, S., Bier, F. F., and Nickisch-Rosenegk, M. von. 2014. Identification of antigenic proteins of the nosocomial pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE* 9, 10, e110703.
- [94] Hu, B., Lara-Tejero, M., Kong, Q., Galán, J. E., and Liu, J. 2017. In Situ Molecular Architecture of the *Salmonella* Type III Secretion Machine. *Cell* 168, 6, 1065-1074.e10.
- [95] Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., Mering, C. von, and Bork, P. 2016. eggNOG 4.5. A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 44, D1, D286-93.
- [96] Humphries, A., Deridder, S., and Bäuml, A. J. 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice. *Infection and Immunity* 73, 9, 5329–5338.
- [97] Ibarra, J. A. and Steele-Mortimer, O. 2009. *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology* 11, 11, 1579–1586.
- [98] Jahn, K. A., Biazik, J. M., and Braet, F. 2011. GM1 expression in caco-2 cells. Characterisation of a fundamental passage-dependent transformation of a cell line. *Journal of pharmaceutical sciences* 100, 9, 3751–3762.
- [99] Jain, R., Rivera, M. C., and Lake, J. A. 1999. Horizontal gene transfer among genomes. The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7, 3801–3806.
- [100] Jepson, M. A. and Clark, M. A. 2001. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes and infection* 3, 14-15, 1183–1190.
- [101] Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G. C. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 39, 15064–15069.
- [102] John, M., Kudva, I. T., Griffin, R. W., Dodson, A. W., McManus, B., Krastins, B., Sarracino, D., Progulski-Fox, A., Hillman, J. D., Handfield, M., Tarr, P. I., and Calderwood, S. B. 2005. Use of in vivo-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection. *Infection and Immunity* 73, 5, 2665–2679.
- [103] Johnson, M. 2013. Detergents. Triton X-100, Tween-20, and More. *MATER METHODS* 3.
- [104] Kaba, H. E. J., Maier, N., Schliebe-Ohler, N., Mayer, Y., Müller, P. P., van den Heuvel, J., Schuchhardt, J., Hanack, K., and Bilitewski, U. 2015. Identification of whole pathogenic cells by monoclonal antibodies generated against a specific peptide from an immunogenic cell wall protein. *Journal of microbiological methods* 108, 61–69.
- [105] Kamdar, K., Nguyen, V., and DePaolo, R. W. 2013. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity. *Virulence* 4, 3, 207–212.
- [106] Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. 2017. KEGG. New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D1, D353-D361.
- [107] Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 4, 549–559.
- [108] Karaji, N. and Sattentau, Q. J. 2017. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. *Frontiers in immunology* 8, 1863.
- [109] Karlin, S., Brocchieri, L., Trent, J., Blaisdell, B.E., and Mrázek, J. 2002. Heterogeneity of Genome and Proteome Content in Bacteria, Archaea, and Eukaryotes. *Theoretical Population Biology* 61, 4, 367–390.
- [110] KAUFFMANN, F. 1957. Das Kauffmann-White-Schema; diagnostisches *Salmonella*-Antigenschema. *Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie* 30, 160–216.
- [111] Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., and Drummond, A. 2012.
-

- Geneious Basic. An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28, 12, 1647–1649.
- [112] Kestra, A. M., Zoete, M. R. de, van Aubel, R. A. M. H., and van Putten, J. P. M. 2008. Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Molecular immunology* 45, 5, 1298–1307.
- [113] Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G. P., Pettersson, S., and Conway, S. 2004. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nature immunology* 5, 1, 104–112.
- [114] Kersting, S., Rausch, V., Bier, F. F., and Nickisch-Roseneck, M. von. 2014. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malaria journal* 13, 99.
- [115] Khan, C. M. A. 2014. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *International scholarly research notices* 2014, 846049.
- [116] Kim, S., Park, M. K., and Yu, H. S. 2015. Toll-Like Receptor Gene Expression during *Trichinella spiralis* Infection. *The Korean journal of parasitology* 53, 4, 431–438.
- [117] Klein, J. A., Grenz, J. R., Schlauch, J. M., and Knodler, L. A. 2017. Controlled Activity of the *Salmonella* Invasion-Associated Injectisome Reveals Its Intracellular Role in the Cytosolic Population. *mBio* 8, 6.
- [118] Klemm, E. J., Gkrania-Klotsas, E., Hadfield, J., Forbester, J. L., Harris, SR, Hale, C., Heath, J. N., Wileman, T., Clare, S., Kane, L., Goulding, D., Otto, T. D., Kay, S., Doffinger, R., Cooke, F. J., Carmichael, A., Am Lever, Parkhill, J., MacLennan, C. A., Kumararatne, D., Dougan, G., and Kingsley, R. A. 2016. Emergence of host-adapted *Salmonella* Enteritidis through rapid evolution in an immunocompromised host. *Nat Microbiol* 1, 3.
- [119] Knodler, L. A., Vallance, B. A., Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M., and Steele-Mortimer, O. 2010. Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 41, 17733–17738.
- [120] Knuff, K. and Finlay, B. B. 2017. What the SIF Is Happening-The Role of Intracellular *Salmonella*-Induced Filaments. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 335.
- [121] Kohli, N., Crisp, Z., Riordan, R., Li, M., Alaniz, R. C., and Jayaraman, A. 2018. The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence. Involvement of the PhoPQ two-component system. *PLoS ONE* 13, 1.
- [122] Kolodziejek, A. M. and Miller, S. I. 2015. *Salmonella* modulation of the phagosome membrane, role of SseJ. *Cellular Microbiology* 17, 3, 333–341.
- [123] Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Aravind, L. 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes. Quantification and classification. *Annual review of microbiology* 55, 709–742.
- [124] Kutsukake, K. and Iino, T. 1980. A trans-acting factor mediates inversion of a specific DNA segment in flagellar phase variation of *Salmonella*. *Nature* 284, 5755, 479–481.
- [125] Kutsukake, K., Nakashima, H., Tominaga, A., and Abo, T. 2006. Two DNA invertases contribute to flagellar phase variation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2. *Journal of Bacteriology* 188, 3, 950–957.
- [126] Lai, X.-H., Xu, Y., Chen, X.-M., and Ren, Y. 2015. Macrophage cell death upon intracellular bacterial infection. *Macrophage* 2, e779.
- [127] Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Penadés, J. R., and Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol. Microbiol.* 58, 5, 1322–1339.
- [128] Le, A. V.-P., Huang, D., Blick, T., Thompson, E. W., and Dobrovic, A. 2015. An optimised direct lysis method for gene expression studies on low cell numbers. *Scientific Reports* 5, 12859.
- [129] Lê-Bury, G. and Niedergang, F. 2018. Defective Phagocytic Properties of HIV-Infected Macrophages. How Might They Be Implicated in the Development of Invasive *Salmonella* Typhimurium? *Frontiers in immunology* 9, 531.

-
- [130] Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y., and Chang, Y. 2011. FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnol* 11, 1, 92.
- [131] Lilic, M., Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Egelman, E. H., and Stebbins, C. E. 2003. Salmonella SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms. *Science (New York, N.Y.)* 301, 5641, 1918–1921.
- [132] Liss, V., Swart, A. L., Kehl, A., Hermanns, N., Zhang, Y., Chikkaballi, D., Böhles, N., Deiwick, J., and Hensel, M. 2017. Salmonella enterica Remodels the Host Cell Endosomal System for Efficient Intravacuolar Nutrition. *Cell host & microbe* 21, 3, 390–402.
- [133] Liu, Q., Liu, Q., Yi, J., Liang, K., Hu, B., Zhang, X., Curtiss, R., and Kong, Q. 2016. Outer membrane vesicles from flagellin-deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium induce cross-reactive immunity and provide cross-protection against heterologous Salmonella challenge. *Scientific Reports* 6, 34776.
- [134] Liu, Q., Yi, J., Liang, K., Zhang, X., and Liu, Q. 2017. Outer Membrane Vesicles Derived from Salmonella Enteritidis Protect against the Virulent Wild-Type Strain Infection in a Mouse Model. *Journal of microbiology and biotechnology* 27, 8, 1519–1528.
- [135] Locatelli-Hoops, S., Sheen, F. C., Zoubak, L., Gawrisch, K., and Yeliseev, A. A. 2013. Application of HaloTag technology to expression and purification of cannabinoid receptor CB2. *Protein Expression and Purification* 89, 1, 62–72.
- [136] Lorkowski, M., Felipe-López, A., Danzer, C. A., Hansmeier, N., and Hensel, M. 2014. Salmonella enterica invasion of polarized epithelial cells is a highly cooperative effort. *Infection and Immunity* 82, 6, 2657–2667.
- [137] Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., and Wood, K. V. 2008. HaloTag. A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS chemical biology* 3, 6, 373–382.
- [138] Lv, S., Si, W., Yu, S., Li, Z., Wang, X., Chen, L., Zhang, W., and Liu, S. 2015. Characteristics of invasion-reduced hilA gene mutant of Salmonella Enteritidis in vitro and in vivo. *Research in veterinary science* 101, 63–68.
- [139] Macpherson, A. J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science (New York, N.Y.)* 288, 5474, 2222–2226.
- [140] Mandell, G. L. 1973. Interaction of intraleukocytic bacteria and antibiotics. *The Journal of clinical investigation* 52, 7, 1673–1679.
- [141] Margot, H., Stephan, R., Guarino, S., Jagadeesan, B., Chilton, D., O'Mahony, E., and Iversen, C. 2013. Inclusivity, exclusivity and limit of detection of commercially available real-time PCR assays for the detection of Salmonella. *International journal of food microbiology* 165, 3, 221–226.
- [142] Marsh, J. W., Humphrys, M. S., and Myers, G. S. A. 2017. A Laboratory Methodology for Dual RNA-Sequencing of Bacteria and their Host Cells In Vitro. *Frontiers in microbiology* 8, 1830.
- [143] Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S.-G., Seo, J., Koblansky, A., Hayden, M. S., and Ghosh, S. 2012. A mouse model of Salmonella typhi infection. *Cell* 151, 3, 590–602.
- [144] McCormack, R., Armas, L. R. de, Shiratsuchi, M., Ramos, J. E., and Podack, E. R. 2013. Inhibition of intracellular bacterial replication in fibroblasts is dependent on the perforin-like protein (perforin-2) encoded by macrophage-expressed gene 1. *Journal of innate immunity* 5, 2, 185–194.
- [145] McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., and Koronakis, V. 2009. Salmonella takes control. Effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology* 12, 1, 117–124.
- [146] McQuate, S. E., Young, A. M., Silva-Herzog, E., Bunker, E., Hernandez, M., Chaumont, F. de, Liu, X., Detweiler, C. S., and Palmer, A. E. 2017. Long-term live-cell imaging reveals new roles for Salmonella effector proteins SseG and SteA. *Cellular Microbiology* 19, 1.
-

- [147] Mellata, M., Mitchell, N. M., Schödel, F., Curtiss, R., and Pier, G. B. 2016. Novel vaccine antigen combinations elicit protective immune responses against *Escherichia coli* sepsis. *Vaccine* 34, 5, 656–662.
- [148] Méthot, P.-O. and Alizon, S. 2014. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 5, 8, 775–785.
- [149] Metsalu, T. and Vilo, J. 2015. ClustVis. A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W1, W566–70.
- [150] Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T., and Aizawa, S.-i. 2008. Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* 190, 13, 4624–4631.
- [151] Morgan, E., Bowen, A. J., Carnell, S. C., Wallis, T. S., and Stevens, M. P. 2007. SiiE Is Secreted by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 4-Encoded Secretion System and Contributes to Intestinal Colonization in Cattle. *Infection and Immunity* 75, 3, 1524–1533.
- [152] Moriel, D. G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., Pastorello, I., Corea, V. A. M., Torricelli, G., Cartocci, E., Savino, S., Scarselli, M., Dobrindt, U., Hacker, J., Tettelin, H., Tallon, L. J., Sullivan, S., Wieler, L. H., Ewers, C., Pickard, D., Dougan, G., Fontana, M. R., Rappuoli, R., Pizza, M., and Serino, L. 2010. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *PNAS* 107, 20, 9072–9077.
- [153] 2017. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8, MLVA profile 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections. *EFS3* 14, 3, 289.
- [154] Murray, R. A. and Lee, C. A. 2000. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar typhimurium to breach the intestinal epithelium. Evidence that salmonella pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infection and Immunity* 68, 9, 5050–5055.
- [155] Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. 2000. Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes. Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 164, 11, 5998–6004.
- [156] N Peterson, S. and Kwon, K. 2012. The HaloTag: Improving Soluble Expression and Applications in Protein Functional Analysis. *Curr Chem Genomics* 6, 8–17.
- [157] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, 12, E63.
- [158] Novakowski, K. E., Loukov, D., Chawla, V., and Bowdish, D. M. E. 2017. Bacterial Binding, Phagocytosis, and Killing. Measurements Using Colony Forming Units. *Methods Mol. Biol.* 1519, 297–309.
- [159] Nuzzo, I., Sanges, M.R., Folgore, A., and Carratelli, C.R. 2000. Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 27, 3, 235–240.
- [160] Ohana, R. F., Encell, L. P., Zhao, K., Simpson, D., Slater, M. R., Urh, M., and Wood, K. V. 2009. HaloTag7. A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expr. Purif.* 68, 1, 110–120.
- [161] Ohlson, M. B., Huang, Z., Alto, N. M., Blanc, M.-P., Dixon, J. E., Chai, J., and Miller, S. I. 2008. Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. *Cell host & microbe* 4, 5, 434–446.
- [162] Paquola, A. C. M., Asif, H., Pereira, C. A. d. B., Feltes, B. C., Bonatto, D., Lima, W. C., and Menck, C. F. M. 2018. Horizontal Gene Transfer Building Prokaryote Genomes. Genes Related to Exchange Between Cell and Environment are Frequently Transferred. *J Mol Evol* 86, 3-4, 190–203.
- [163] Peretz, A., Simsolo, C., Farber, E., Roth, A., Brodsky, D., and Nakhoul, F. 2013. A rare bacteremia caused by *Cedecea davisae* in patient with chronic renal disease. *The American journal of case reports* 14, 216–218.
- [164] Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 4, 715–727.

- [165] Polz, M. F. and Cavanaugh, C. M. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology* 64, 10, 3724–3730.
- [166] Popp, J., Noster, J., Busch, K., Kehl, A., Zur Hellen, G., and Hensel, M. 2015. Role of host cell-derived amino acids in nutrition of intracellular *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity* 83, 12, 4466–4475.
- [167] Quan, J. and Tian, J. 2011. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc* 6, 2, 242–251.
- [168] Raffatellu, M., Wilson, R. P., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H., Tran, Q. T., Lawhon, S., Khare, S., Adams, L. G., and Bäumlner, A. J. 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity* 73, 1, 146–154.
- [169] Raspoet, R., Appia-Ayme, C., Shearer, N., Martel, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., THOMPSON, A., and van Immerseel, F. 2014. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis genes involved in chicken reproductive tract colonization. *Applied and environmental microbiology* 80, 24, 7710–7716.
- [170] Reis, R. S. D. and Horn, F. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. Cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. *Gut pathogens* 2, 1, 8.
- [171] Reißig, S., Tang, Y., Nikolaev, A., Gerlach, K., Wolf, C., Davari, K., Gallus, C., Masri, J., Mufazalov, I. A., Neurath, M. F., Wunderlich, F. T., Schattenberg, J. M., Galle, P. R., Weigmann, B., Waisman, A., Glasmacher, E., and Hövelmeyer, N. 2017. Elevated levels of Bcl-3 inhibits Treg development and function resulting in spontaneous colitis. *Nature communications* 8, 15069.
- [172] Ribet, D. and Cossart, P. 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and infection* 17, 3, 173–183.
- [173] Richter, E., Mostertz, J., and Hochgräfe, F. 2016. Proteomic discovery of host kinase signaling in bacterial infections. *Proteomics. Clinical applications* 10, 9-10, 994–1010.
- [174] Robey, M. and Cianciotto, N. P. 2002. *Legionella pneumophila* feoAB Promotes Ferrous Iron Uptake and Intracellular Infection. *Infection and Immunity* 70, 10, 5659–5669.
- [175] Rosa, A. C.P., Vieira, M. A.M., Tibana, A., Gomes, T. A.T., and Andrade, J. R.C. 2001. Interactions of *Escherichia coli* strains of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack the EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiology Letters* 200, 1, 117–122.
- [176] Rosselin, M., Virlogeux-Payant, I., Roy, C., Bottreau, E., Sizaret, P.-Y., Mijouin, L., Germon, P., Caron, E., Velge, P., and Wiedemann, A. 2010. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar *enteritidis*, mediates zipper-like internalization. *Cell research* 20, 6, 647–664.
- [177] Rozen, S. and Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- [178] Ruckdeschel, K. and Richter, K. 2002. Lipopolysaccharide Desensitization of Macrophages Provides Protection against *Yersinia enterocolitica*-Induced Apoptosis. *Infection and Immunity* 70, 9, 5259–5264.
- [179] Ruiz-Albert, J., Yu, X.-J., Beuzón, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E., and Holden, D. W. 2002. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol. Microbiol.* 44, 3, 645–661.
- [180] Rychlik, I., Karasova, D., Sebkova, A., Volf, J., Sisak, F., Havlickova, H., Kummer, V., Imre, A., Szmolka, A., and Nagy, B. 2009. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* for chickens. *BMC microbiology* 9, 268.
- [181] Sambuy, Y., Angelis, I. de, Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., and Zucco, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier. Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell biology and toxicology* 21, 1, 1–26.
- [182] Santos, R. L., Raffatellu, M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tükel, C., Tsolis, R. M., and Bäumlner, A. J. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol.* 17, 11, 498–506.
- [183] Santos, R. L., Tsolis, R. M., Bäumlner, A. J., Smith, R., and Adams, L. G. 2001. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* induces cell death in bovine monocyte-derived macrophages by early sipB-dependent and delayed sipB-independent mechanisms. *Infection and Immunity* 69, 4, 2293–2301.

- [184] Schauffler, K., Semmler, T., Pickard, D. J., Toro, M. de, La Cruz, F. de, Wieler, L. H., Ewers, C., and Guenther, S. 2016. Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Plasmids Does Not Reduce Fitness but Enhances Virulence in Some Strains of Pandemic *E. coli* Lineages. *Frontiers in microbiology* 7, 336.
- [185] Schumacher, S., Sartorius, D., Ehrentreich-Förster, E., and Bier, F. F. 2012. Miniaturization for Point-of-Care Analysis. Platform Technology for Almost Every Biomedical Assay. *EJIFCC* 23, 3, 70–75.
- [186] Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A., and Horejs-Hoeck, J. 2014. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c⁺ dendritic cells. *PLoS ONE* 9, 12, e113840.
- [187] Sekirov, I. and Finlay, B. B. 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *The Journal of physiology* 587, Pt 17, 4159–4167.
- [188] Selbitz, H.-J. 1992. *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Mit 47 Tabellen*. G. Fischer, Jena.
- [189] Selbitz, H.-J., Truyen, U., and Valentin-Weigand, P., Eds. 2013. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke, s.l.
- [190] Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M., and Raoult, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology. Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 49, 4, 543–551.
- [191] Seo, G. J., Kim, C., Shin, W.-J., Sklan, E. H., Eoh, H., and Jung, J. U. 2018. TRIM56-mediated monoubiquitination of cGAS for cytosolic DNA sensing. *Nature communications* 9, 1, 613.
- [192] Sha, J., Agar, S. L., Baze, W. B., Olano, J. P., Fadl, A. A., Erova, T. E., Wang, S., Foltz, S. M., Suarez, G., Motin, V. L., Chauhan, S., Klimpel, G. R., Peterson, J. W., and Chopra, A. K. 2008. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of yersiniae. Potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. *Infection and Immunity* 76, 4, 1390–1409.
- [193] Sha, J., Fadl, A. A., Klimpel, G. R., Niesel, D. W., Popov, V. L., and Chopra, A. K. 2004. The two murein lipoproteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium contribute to the virulence of the organism. *Infection and Immunity* 72, 7, 3987–4003.
- [194] Sha, J., Kirtley, M. L., van Lier, C. J., Wang, S., Erova, T. E., Kozlova, E. V., Cao, A., Cong, Y., Fitts, E. C., Rosenzweig, J. A., and Chopra, A. K. 2013. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infection and Immunity* 81, 3, 815–828.
- [195] Shah, D. H., Zhou, X., Kim, H.-Y., Call, D. R., and Guard, J. 2012. Transposon Mutagenesis of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Identifies Genes That Contribute to Invasiveness in Human and Chicken Cells and Survival in Egg Albumen. *Infection and Immunity* 80, 12, 4203–4215.
- [196] Sheydina, A., Eberhardt, R. Y., Rigden, D. J., Chang, Y., Li, Z., Zmasek, C. C., Axelrod, H. L., and Godzik, A. 2014. Structural genomics analysis of uncharacterized protein families overrepresented in human gut bacteria identifies a novel glycoside hydrolase. *BMC bioinformatics* 15, 112.
- [197] Sindhvani, A., Arya, S. B., Kaur, H., Jagga, D., Tuli, A., and Sharma, M. 2017. *Salmonella* exploits the host endolysosomal tethering factor HOPS complex to promote its intravacuolar replication. *PLoS pathogens* 13, 10, e1006700.
- [198] Smith, A., AF Parkes, M., K Atkin-Smith, G., Tixeira, R., and KH Poon, I. 2017. Cell disassembly during apoptosis. *Wiki J Med* 4, 1.
- [199] Smith, C., Stringer, A. M., Mao, C., Palumbo, M. J., and Wade, J. T. 2016. Mapping the Regulatory Network for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion. *mBio* 7, 5.
- [200] Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., and Galán, J. E. 2016. A Bacterial Pathogen Targets a Host Rab-Family GTPase Defense Pathway with a GAP. *Cell host & microbe* 19, 2, 216–226.
- [201] Srikumar, S., Kröger, C., Hébrard, M., Colgan, A., Owen, S. V., Sivasankaran, S. K., Cameron, A. D. S., Hokamp, K., and Hinton, J. C. D. 2015. RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS pathogens* 11, 11, e1005262.

- [202] Steele-Mortimer, O. 2008. Infection of Epithelial Cells With *Salmonella enterica*. In *Bacterial pathogenesis. Methods and protocols*, F. Deleo, Ed. Methods in molecular biology 431. Humana Press, Totowa, NJ, 201–211. DOI=10.1007/978-1-60327-032-8_16.
- [203] Steele-Mortimer, O. 2008. The *Salmonella*-containing vacuole. Moving with the times. *Current Opinion in Microbiology* 11, 1, 38–45.
- [204] Steele-Mortimer, O., Méresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H., and Finlay, B. B. 1999. Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cellular Microbiology* 1, 1, 33–49.
- [205] Subashchandrabose, S. and Mobley, H. 2014. Gentamicin Protection Assay to Determine Bacterial Survival within Macrophages. *BIO-PROTOCOL* 4, 18.
- [206] Suez, J., Porwollik, S., Dagan, A., Marzel, A., Schorr, Y. I., Desai, P. T., Agmon, V., McClelland, M., Rahav, G., and Gal-Mor, O. 2013. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS ONE* 8, 3, e58449.
- [207] Szeto, J., Namolovan, A., Osborne, S. E., Coombes, B. K., and Brumell, J. H. 2009. *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. *Infection and Immunity* 77, 3, 996–1007.
- [208] Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., and Mering, C. von. 2015. STRING v10. Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43, Database issue, D447-52.
- [209] Tang, D., Tang, J., Su, B., and Chen, G. 2010. Ultrasensitive electrochemical immunoassay of staphylococcal enterotoxin B in food using enzyme-nanosilica-doped carbon nanotubes for signal amplification. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 20, 10824–10830.
- [210] Tennant, S. M., Zhang, Y., Galen, J. E., Geddes, C. D., and Levine, M. M. 2011. Ultra-fast and sensitive detection of non-typhoidal *Salmonella* using microwave-accelerated metal-enhanced fluorescence ("MAMEF"). *PLoS ONE* 6, 4, e18700.
- [211] Teplitski, M., Goodier, R. I., and Ahmer, B. M. M. 2003. Pathways Leading from BarA/SirA to Motility and Virulence Gene Expression in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology* 185, 24, 7257–7265.
- [212] 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFS2* 16, 2, e0136052.
- [213] 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFS2* 15, 12, 148.
- [214] Thomson, N. R., Clayton, D. J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M. A., Stevens, M., Jones, M. A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingsley, R. A., Bignell, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdellah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norberczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Sanders, M., Whitehead, S., Chabalgoity, J. A., Maskell, D., Humphrey, T., Roberts, M., Barrow, P. A., Dougan, G., and Parkhill, J. 2008. Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome research* 18, 10, 1624–1637.
- [215] Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., and Euzéby, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55, Pt 1, 521–524.
- [216] Tomljenovic-Berube, A. M., Henriksbo, B., Porwollik, S., Cooper, C. A., Tuinema, B. R., McClelland, M., and Coombes, B. K. 2013. Mapping and regulation of genes within *Salmonella* pathogenicity island 12 that contribute to in vivo fitness of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* 81, 7, 2394–2404.
- [217] Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., and Hooper, L. V. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 52, 20858–20863.
- [218] van der Velden, A. W., Lindgren, S. W., Worley, M. J., and Heffron, F. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infection and Immunity* 68, 10, 5702–5709.

- [219] 2013. Verlauf einer Infektion, Virulenzfaktoren und Pathogenität. In *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, U. Groß, Ed. Thieme, Stuttgart. DOI=10.1055/b-0034-96627.
- [220] Verreck, F. A. W., Boer, T. de, Langenberg, D. M. L., van der Zanden, L., and Ottenhoff, T. H. M. 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *Journal of leukocyte biology* 79, 2, 285–293.
- [221] Villamizar-Rodríguez, G., Fernández, J., Marín, L., Muñoz, J., González, I., and Lombó, F. 2015. Multiplex detection of nine food-borne pathogens by mPCR and capillary electrophoresis after using a universal pre-enrichment medium. *Frontiers in microbiology* 6, 1194.
- [222] Viswanathan, S., Rani, C., and Ho, J.-a. A. 2012. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode. *Talanta* 94, 315–319.
- [223] Wagner, C., Barlag, B., Gerlach, R. G., Deiwick, J., and Hensel, M. 2014. The Salmonella enterica giant adhesin SiiE binds to polarized epithelial cells in a lectin-like manner. *Cellular Microbiology* 16, 6, 962–975.
- [224] Wang, Y. and Salazar, J. K. 2016. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY* 15, 1, 183–205.
- [225] Wasylnka, J. A., Bakowski, M. A., Szeto, J., Ohlson, M. B., Trimble, W. S., Miller, S. I., and Brumell, J. H. 2008. Role for myosin II in regulating positioning of Salmonella-containing vacuoles and intracellular replication. *Infection and Immunity* 76, 6, 2722–2735.
- [226] Webber, M. A., Bailey, A. M., Blair, J. M. A., Morgan, E., Stevens, M. P., Hinton, J. C. D., Ivens, A., Wain, J., and Piddock, L. J. V. 2009. The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in Salmonella enterica includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *Journal of Bacteriology* 191, 13, 4276–4285.
- [227] Wellenreuther, R., Schupp, I., Poustka, A., and Wiemann, S. 2004. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. *BMC Genomics* 5, 1, 36.
- [228] Westermann, A. J., Förstner, K. U., Amman, F., Barquist, L., Chao, Y., Schulte, L. N., Müller, L., Reinhardt, R., Stadler, P. F., and Vogel, J. 2016. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature* 529, 7587, 496–501.
- [229] Wiedemann, A., Mijouin, L., Ayoub, M. A., Barilleau, E., Canepa, S., Teixeira-Gomes, A. P., Le Vern, Y., Rosselin, M., Reiter, E., and Velge, P. 2016. Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for Salmonella Rck-dependent invasion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30, 12, 4180–4191.
- [230] Wille, T., Wagner, C., Mittelstädt, W., Blank, K., Sommer, E., Malengo, G., Döhler, D., Lange, A., Sourjik, V., Hensel, M., and Gerlach, R. G. 2014. SiiA and SiiB are novel type I secretion system subunits controlling SPI4-mediated adhesion of Salmonella enterica. *Cellular Microbiology* 16, 2, 161–178.
- [231] Winnen, B., Schlumberger, M. C., Sturm, A., Schüpbach, K., Siebenmann, S., Jenny, P., and Hardt, W.-D. 2008. Hierarchical effector protein transport by the Salmonella Typhimurium SPI-1 type III secretion system. *PLoS ONE* 3, 5, e2178.
- [232] Wu, J., Pugh, R., Laughlin, R. C., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., Bäumlner, A. J., and Adams, L. G. 2014. High-throughput assay to phenotype Salmonella enterica Typhimurium association, invasion, and replication in macrophages. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 90, e51759.
- [233] Wyckoff, E. E., Mey, A. R., Leimbach, A., Fisher, C. F., and Payne, S. M. 2006. Characterization of ferric and ferrous iron transport systems in Vibrio cholerae. *Journal of Bacteriology* 188, 18, 6515–6523.
- [234] Yi, H., Cho, Y.-J., Won, S., Lee, J.-E., Jin Yu, H., Kim, S., Schroth, G. P., Luo, S., and Chun, J. 2011. Duplex-specific nuclease efficiently removes rRNA for prokaryotic RNA-seq. *Nucleic Acids Res.* 39, 20, e140.
- [235] Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S. C., Ester, M., Foster, L. J., and Brinkman, F. S. L. 2010. PSORTb 3.0. Improved protein subcellular

- localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26, 13, 1608–1615.
- [236] Zanolli, L. M. and Spoto, G. 2013. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. *Biosensors* 3, 1, 18–43.
- [237] Zhang, Y., Higashide, W. M., McCormick, B. A., Chen, J., and Zhou, D. 2006. The inflammation-associated Salmonella SopA is a HECT-like E3 ubiquitin ligase. *Mol. Microbiol.* 62, 3, 786–793.
- [238] Zhao, Q. and Elson, C. O. 2018. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology* 154, 1, 28–37.
- [239] Zhao, W., Moest, T., Zhao, Y., Guilhon, A.-A., Buffat, C., Gorvel, J.-P., and Méresse, S. 2015. The Salmonella effector protein SifA plays a dual role in virulence. *Scientific Reports* 5, 12979.
- [240] Zhao, Y., Park, S., Kreiswirth, B. N., Ginocchio, C. C., Veyret, R., Laayoun, A., Troesch, A., and Perlin, D. S. 2009. Rapid real-time nucleic Acid sequence-based amplification-molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 47, 7, 2067–2078.
- [241] Zheng, J. H. and Min, J.-J. 2016. Targeted Cancer Therapy Using Engineered Salmonella typhimurium. *Chonnam medical journal* 52, 3, 173–184.
- [242] Zhou, L. and Pollard, A. J. 2010. A fast and highly sensitive blood culture PCR method for clinical detection of Salmonella enterica serovar Typhi. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 9, 14.
- [243] Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R., and Siebert, P. D. 2001. Reverse transcriptase template switching. A SMART approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* 30, 4, 892–897.
- [244] Zhulidov, P. A., Bogdanova, E. A., Shcheglov, A. S., Vagner, L. L., Khaspekov, G. L., Kozhemyako, V. B., Matz, M. V., Meleshkevitch, E., Moroz, L. L., Lukyanov, S. A., and Shagin, D. A. 2004. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Res.* 32, 3, e37.

Anhang

Anhang A: Untersuchung von Homologien innerhalb der immundominanten Proteine, des richtigen Leserasters, aller Bibliotheken.

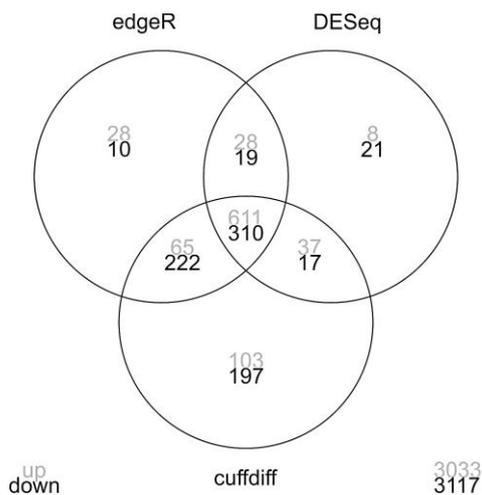
Mithilfe von NCBI Protein Clusters wurden die Proteine untersucht und die Homologie innerhalb der taxonomischen Klasse zugeordnet. Für eine erleichterte Suche wurde die NCBI Identifikationsnummer (NCBI ID) angegeben.

Name	Locus-Tag	Homologie	NCBI-ID
Immundominante Proteine der CI Bibliothek			
ssaN	SEN1630	Proteobacteria	PCLA_210659
cypD	SEN0434	Proteobacteria	PCLA_431025
SEN1798	SEN1798	Gammaproteobacteria	PCLA_3438621
apaG	SEN0091	Bacteria	PCLA_209331
aspS	SEN1102	Bacteria	PCLA_3083665
thrS	SEN1711	Bacteria	PCLA_414099
yhjH	SEN3434	Bacteria	PCLA_431701
Immundominante Proteine der CI Nr. 2 Bibliothek			
ybbN	SEN0485	Proteobacteria	PCLA_879684
alkB	SEN2247	Proteobacteria	PCLA_3275202
melR	SEN4068	Proteobacteria	PCLA_430638
nuoL	SEN2300	Proteobacteria	PCLA_417855
SEN_p0048	SEN_p0048	Gammaproteobacteria	PCLA_888398
gpmA	SEN0717	cellular organisms	PCLA_2502190
mopA	SEN4100	cellular organisms	PCLA_413926
feoA	SEN3331	Bacteria	PCLA_419649
nuoC	SEN2308	Bacteria	PCLA_431800
rplA	SEN3934	Bacteria	PCLA_209296
arcA	SEN4354	Bacteria	PCLA_431363
rbsR	SEN3700	Bacteria	PCLA_430944
SEN_p0041	SEN_p0041	Bacteria	PCLA_5653183
SEN1679	SEN1679	Bacteria	PCLA_430527
nuoF	SEN2306	Bacteria	PCLA_989422
galT	SEN0720	Bacteria	PCLA_431792
Immundominante Proteine der CN Bibliothek			
SEN1810	SEN1810	Salmonella	PCLA_894207
SEN1497	SEN1497	Proteobacteria	PCLA_894129
cheA	SEN1082	Proteobacteria	PCLA_3365211
rfaB	SEN3541	Enterobacteriales	PCLA_430219
dapA	SEN2478	cellular organisms	PCLA_430960
lepA	SEN2563	Bacteria	PCLA_4875006
aroC	SEN2366	Bacteria	PCLA_209255
fusA	SEN3274	Bacteria	PCLA_624558
ptsI	SEN2413	Bacteria	PCLA_2967489
lgt	SEN2844	Bacteria	PCLA_2812845
rplL	SEN3936	Bacteria	PCLA_414048
ilvY9	SEN3714	Bacteria	PCLA_431789
fliG	SEN1039	Bacteria	PCLA_209531
uvrD	SEN3748	Bacteria	PCLA_431818
tdcC	SEN3084	Bacteria	PCLA_3577829
cytR	SEN3884	Bacteria	PCLA_3491082
motB	SEN1081	Bacteria	PCLA_212870
ribF	SEN0045	Bacteria	PCLA_4878505
pntA	SEN1570	Bacteria	PCLA_419569

Name	Locus-Tag	Homologie	NCBI-ID
Immundominante Proteine der IV Bibliothek			
pspA	SEN1343	Proteobacteria	PCLA_430939
SEN1387	SEN1387	Proteobacteria	PCLA_512088
cbiO	SEN2018	Gammaproteobacteria	PCLA_989462
ftsK	SEN0864	Enterobacteriaceae	PCLA_6083376
dnaK	SEN0011	cellular organisms	PCLA_123129
yjgF	SEN4209	cellular organisms	PCLA_431523
nuoJ	SEN2302	Bacteria	PCLA_417898
thrS	SEN1711	Bacteria	PCLA_414099
sufC	SEN1674	Bacteria	PCLA_419670
lon	SEN0432	Bacteria	PCLA_431024
SEN0141 *	SEN0141	Bacteria	PCLA_377945
rfbB	SEN2093	Bacteria	PCLA_430496
gntR	SEN3366	Bacteria	PCLA_2846102
uvrY	SEN1059	Bacteria	PCLA_419601
pepT	SEN1822	Bacteria	PCLA_2548626
imp *	SEN0095	Bacteria	PCLA_416090
gltA	SEN0680	Bacteria	PCLA_417201
SEN3403	SEN3403	Bacteria	PCLA_431717
thiC	SEN3950	Bacteria	PCLA_213111
hflX	SEN4129	Bacteria	PCLA_431270
yabB	SEN0120	Bacteria	PCLA_123164
bgIX	SEN2160	Bacteria	PCLA_2846213

Anhang B: Venn-Diagramm zur Darstellung der DEG von CI zu CN mittels EdgeR, DESeq und Cufflinks cuffdiff.

Die Unterscheidung erfolgte in positiv (hellgrau) und negativ (schwarz) regulierte Gene. Die globale Analyse der Daten erfolgte mittels DESeq, da diese die größte Schnittmenge zu den anderen Programmen aufweist ohne eine erhöhte Anzahl an DEGs allein in DESeq zu beinhalten.



Anhang C: Auflistung aller 50 CI/CN/IV-gemeinsamer DEG unter Angabe des Transkriptes, dem Locus-Tag, der COG-Kategorie, dem kodierenden Typ, der Art der Regulation und das entstehende Produkt

Die COG-Kategorien geben Auskunft über die Funktionalität der Proteine: C (Energy production and conversion), E (Amino acid transport and metabolism), F (Nucleotide metabolism and transport), G (Carbohydrate transport and metabolism), H (Coenzyme metabolism), K (Transcription), M (Cell wall/membrane/envelope biogenesis), O (Post-translational modification, protein turnover, and chaperones), P (Inorganic ion transport and metabolism), V (Defense mechanisms), S (Function unknown).

Gen/Locus-Tag	COG	Typ	Regulation	Produkt
orfX	-	protein	down	hypothetical protein
CsrC	-	sRNA	down	post-transcriptionally regulates central carbon flux, biofilm formation and motility
fimS	-	sRNA	down	family of Hfq-binding small RNA, upregulated in response to anaerobicity
STnc130	-	sRNA	down	Enterobacteria sRNA
dmsA	C	protein	down	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase
napA,napD, napF	C	protein	down	nitrate reductase, periplasmic nitrate reductase, ferredoxin-type protein
hypO	C	protein	down	hydrogenase 2 small subunit
nirB,nirD	C	protein	down	nitrite reductase large subunit, nitrite reductase small subunit
fdhE,fdoH, fdoI	C,O	protein	down	formate dehydrogenase, formate dehydrogenase-O subunit beta, and gamma
ynfK	H	protein	down	dithiobiotin synthetase DTB synthetase
menD,yfbB	H	protein	down	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate synthase, acyl-CoA thioester hydrolase
thiG,thiH	H	protein	down	thiazole synthase , thiamine biosynthesis protein
caiF	K	protein	down	DNA-binding transcriptional activator
pocR	K	protein	down	pdu/cob regulatory protein PocR
tdcA	K	protein	down	DNA-binding transcriptional activator TdcA
SEN2875	M	protein	down	outer membrane protein
spy	N, P, T, U	protein	down	hypothetical periplasmic protein
fimC	O	protein	down	fimbrial chaperone protein
hypA	O	protein	down	hydrogenase nickel incorporation protein
yhbU	O	protein	down	protease
yjJ,yjW	O,S	protein	down	hypothetical protein
SEN3636	P	protein	down	cytochrome c peroxidase
fimA	S	protein	down	type-1 fimbrial protein subunit a
fimI	S	protein	down	major pilin protein
SEN1936	S	protein	down	phage major capsid protein
leuL	-	protein	up	leu operon leader peptide
SEN1163	-	protein	up	phage membrane protein
SEN1801	-	protein	up	hypothetical protein
SEN1990	-	protein	up	DNA-binding protein
yejG	-	protein	up	hypothetical protein
umuC	-	Pseudogen	up	
RyhB	-	sRNA	up	down-regulates a set of iron-storage and iron-using proteins when iron is limiting
iroB	C,G	protein	up	glycosyltransferase
lysA	E	protein	up	diaminopimelate decarboxylase

Gen/Locus-Tag	COG	Typ	Regulation	Produkt
livJ	E	protein	up	leu/ile/val/thr-binding protein
SEN0806	E,G	protein	up	inner membrane protein
nrdE, nrdH, nrdI	F	protein	up	ribonucleotide-diphosphate reductase SU α , glutaredoxin-like protein, ribonucleotide reductase stimulatory protein
nrdF	F	protein	up	ribonucleotide-diphosphate reductase
ycaD	G	protein	up	MFS family transporter protein
ycfR	M	protein	up	hypothetical protein
foxA	P	protein	up	ferrioxamine B receptor
sfbB,sfbC	P	protein	up	ABC transporter ATP-binding protein,
iroD	P	protein	up	ferric enterochelin esterase
iroN	P	protein	up	outer membrane receptor of ferric enterobactin and colicins B and D
ygjT	P	protein	up	drug efflux protein
mgtA	P	protein	up	magnesium-transporting ATPase
iroE	S	protein	up	hypothetical protein
yjcB	S	protein	up	hypothetical protein
SEN4317	S	protein	up	hypothetical protein
iroC	V	protein	up	ABC transporter

Anhang D: Auflistung aller 114 CI-spezifischen DEG unter Angabe des Transkriptes, dem Locus-Tag, dem kodierenden Typ und das Produkt

Gen/Locus-Tag	Typ	Produkt
sseI	protein	type III secreted protein
pipB	protein	pathogenicity island protein
isrI	sRNA	
SEN1063	Pseudogen	
mig-3	Pseudogen	
SEN1171	Pseudogen	
SEN1171B	Pseudogen	
SEN1172	protein	hypothetical protein
SEN1173	protein	inner membrane protein
pagO	protein	inner membrane protein PagO regulated by PhoPQ
leuD	protein	isopropylmalate isomerase small subunit
leuC	protein	isopropylmalate isomerase large subunit dehydratase
leuA,leuB	protein	2-isopropylmalate synthase, 3-isopropylmalate dehydrogenase
SEN1335	protein	hypothetical protein
pspA	protein	phage shock protein PspA
pspB	protein	phage shock protein B
pspD	protein	peripheral inner membrane phage-shock protein
SEN1417, SEN1418	protein	amino acid ABC transporter, ABC transporter ATP-binding protein
SEN1419	protein	amino acid ABC transporter permease
SEN1420	protein	amino acid-binding protein
sseJ	protein	translocated effector protein SseJ
SEN1423	protein	hypothetical protein
sifB	protein	secreted effector protein translocated by the T3SS-2
ugtL	protein	hypothetical protein
smvA	protein	methyl viologen resistance protein SmvA
SEN1502	Pseudogen	Pseudogen
SEN1564A	protein	acid shock protein
ssaT,ssaU	protein	T3SS secretion protein, secretion system apparatus

Gen/Locus-Tag	Typ	Produkt
ssaR,ssaS	protein	type III secretion system protein
ssaM,ssaN,ssaV	protein	pathogenicity island protein, type III secretion system ATPase, secretion system apparatus protein
SEN1635,ssaK,ssaL	protein	pathogenicity island protein, pathogenicity island protein, secretion system protein
ssaI,ssaJ	protein	pathogenicity island protein, pathogenicity island lipoprotein
ssaH	protein	pathogenicity island protein
ssaG	protein	pathogenicity island protein
sseF,sseG	protein	pathogenicity island effector protein
sscB	protein	pathogenicity island protein
sseE	protein	pathogenicity island effector protein
sseD	protein	pathogenicity island effector protein
sseC	protein	pathogenicity island effector protein
sscA,sseB	protein	T3SS chaperone protein, secreted effector protein
sseA	protein	pathogenicity island protein
ssaE	protein	secretion system protein
ssaC,ssaD	protein	secretory protein, pathogenicity island protein
ssaB	protein	pathogenicity island 2 secreted effector protein
SEN1784	Pseudogen	
STnc510	sRNA	Enterobacterial sRNA
SEN1920	protein	phage protein
SEN2134	protein	hypothetical protein
SEN2172	protein	n-hydroxybenzoate transporter
SEN2173	protein	transcriptional regulator
sspH2	protein	secreted effector protein
SEN2225	Pseudogen	
SEN2226	Pseudogen	
SEN2227	protein	hypothetical protein
SEN2228	protein	exported protein
isrH	sRNA	
SEN2269	protein	deubiquitinase similar to ElaD
pgtP	protein	phosphoglycerate transporter protein
ygbA	protein	hypothetical protein
cysC,cysN	protein	adenylylsulfate kinase, sulfate adenylyltransferase
cysD	protein	sulfate adenylyltransferase subunit 2
SEN2926	protein	oxidoreductase
SEN2967	protein	LysR family transcriptional regulator
SEN0288	protein	hypothetical protein
yafH	protein	acyl-CoA dehydrogenase
SEN0297, prfH	protein	hypothetical protein ,peptide chain release factor-like protein
STnc361	sRNA	Salmonella enterica sRNA
lldD,lldP,lldR	protein	L-lactate dehydrogenase, L-lactate permease, DNA-binding transcriptional repressor
mgtB	protein	Magnesium transport ATPase
mgtC	protein	Mg(2+) transport ATPase protein C
SEN3593	protein	putative PTS system protein
SEN3594	protein	PTS system protein
uhpT	protein	sugar phosphate antiporter cytoplasmic membrane protein that functions as a monomer
ibpB	protein	heat shock chaperone IbpB 16 kDa heat shock protein B
ibpA	protein	heat shock protein
prpR	protein	propionate catabolism operon regulatory protein
metR	protein	trans-activator of metE and metH

Gen/Locus-Tag	Typ	Produkt
SEN3819	protein	hypothetical protein
sbp	protein	sulfate transporter subunit
yjbA	protein	phosphate-starvation-inducible protein PsiE
yjbO	protein	putative membrane protein
soxS	protein	DNA-binding transcriptional for oxidative stress
SEN4189	protein	hypothetical protein
argI	protein	ornithine carbamoyltransferase subunit I
SEN4263	protein	hypothetical protein
SEN4264	protein	hypothetical protein
yjiS	protein	hypothetical protein
phnS	protein	periplasmic binding component of 2-aminoethylphosphonate transporter
glnK	protein	nitrogen regulatory protein P-II 2 indirectly regulates nitrogen metabolism
rpmE2	protein	large subunit ribosomal protein L31
SEN0537A	protein	copper-binding protein
citT	protein	citrate carrier
citF	protein	citrate lyase subunit alpha
citC, citD, citE	protein	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase; citrate lyase subunit gamma acyl carrier protein; citrate lyase subunit beta
SEN0805	protein	LysR transcriptional regulator
artJ	protein	arginine-binding periplasmic protein 2
STnc470	sRNA	Salmonella enterica sRNA
SEN0084	protein	hypothetical protein
SEN0876	protein	sopD2 type III secretion system effector protein
fliE	protein	flagellar hook-basal body protein
fdnG	protein	anaerobic formate dehydrogenase major subunit
fdnH, fdnI	protein	formate dehydrogenase-N beta subunit; formate dehydrogenase-N subunit gamma
SEN1933,SEN1934,SEN1935,SEN1935A	Phagenprotein	phage protein
SEN1941	Phagenprotein	5-methylcytosine-specific restriction enzyme A
SEN1942, SEN1943	protein	exported phage protein, phage encoded lysozyme
yadI	protein	PTS system transporter subunit IIA
asrA	protein	anaerobic sulfite reductase subunit A
yfiD	protein	autonomous glycyl radical cofactor
spaQ	protein	type III secretion system export apparatus protein
invB,invC,invI,invJ,spaO,spaP	protein	secretory protein, ATP synthase SpaL, Invasion protein InvC, secretory protein, surface presentation of antigens protein, type III secretion protein Q, type III secretion system export apparatus protein
sdaB	protein	L-serine dehydratase 2
nirC	protein	nitrite transporter
dcuB	protein	anaerobic C4-dicarboxylate transporter
SEN4248	protein	fimbrial chaperone protein

Anhang E: Auflistung aller Gene der CN-Bibliothek kombiniert mit der Transkriptom-Analyse.
Mithilfe, wie der relativen Transkriptzahl (DESeq-Anzahl) für die CN und IV, der log₂FC Wert, der p-Wert und der x-fache Faktor (FC= fold change) des Verhältnis CN/IV. Die Nummerierung der Gene erfolgt nach aufsteigender Sortierung des Locus-Tags, wodurch die Zuordnung zu Abbildung 4.22 (S.67) getroffen werden kann. Anhand des FC-Wertes wurde die Art der Regulation definiert: > 1 entspricht einer positiven Regulation, < 1 und > -1 entspricht einer nicht-Regulation und < -1 entspricht einer negativen Regulation. In der Transkriptom-Analyse wurde nur chromosomale DNA zugeordnet, daher wurden SEN_p Gene nicht eingeschlossen.

Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CN	Anzahl-IV	log ₂ FC	p-Wert	FC(CN/IV)
1		SEN0037	42	21	1,01	0,119	2,0
2	ribF	SEN0045	2634	1613	0,71	0,160	1,6
3	imp	SEN0095	9269	7323	0,34	0,511	1,3
4	polB	SEN0099	865	438	0,98	0,047	2,0
5	pdhR	SEN0155	6273	703	3,16	0,000	8,9
6	fhuA	SEN0196	16982	303	5,81	0,000	56,0
7	yajD	SEN0394	1190	608	0,97	0,045	2,0
8	ybeF	SEN0603	532	2729	-2,36	0,000	0,195
9	rlpB	SEN0616	1055	1160	-0,14	0,700	0,909
10	moeB	SEN0791	1183	1101	0,10	1,000	1,1
11	moeA	SEN0792	1183	1101	0,10	1,000	1,1
12	ybjX	SEN0848	8494	8315	0,03	0,921	1,0
13	cspB	SEN1014	1850	79	4,55	0,000	23,5
14	fliG	SEN1039	8731	4324	1,01	0,070	2,0
15	motA	SEN1081	2568	3839	-0,58	0,160	0,669
16	cheA	SEN1082	2449	3989	-0,70	0,055	0,614
17	cheA	SEN1082	2449	3989	-0,70	0,055	0,614
18	cheW	SEN1083	817	1213	-0,57	0,104	0,674
19	flhB	SEN1089	2163	782	1,47	0,006	2,8
20	flhA	SEN1090	2163	782	1,47	0,006	2,8
21	rnb	SEN1330	5644	2249	1,33	0,008	2,5
22	yciW	SEN1331	375	177	1,08	0,035	2,1
23		SEN1360A	735	5211	-2,83	0,000	0,141
24	ansP	SEN1471	4207	158	4,74	0,000	26,7
25		SEN1497	304	16954	-5,80	0,000	0,018
26	pntA	SEN1570	2555	3863	-0,60	0,140	0,661
27	gst	SEN1596	696	3800	-2,45	0,000	0,183
28	astA	SEN1739	182	4615	-4,66	0,000	0,040
29		SEN1809	39	18	1,14	0,077	2,2
30		SEN1810	584	647	-0,15	1,000	0,903
31	flgD	SEN1872	2525	2235	0,18	0,973	1,1
32	flgC	SEN1873	650	419	0,63	0,361	1,6
33	solA	SEN1888	537	982	-0,87	0,045	0,547
34	asmA	SEN2116	1765	1101	0,68	0,173	1,6
35	rtn	SEN2208	1476	992	0,57	0,237	1,5
36	ackA	SEN2319	12965	7644	0,76	0,123	1,7
37	aroC	SEN2366	1916	1141	0,75	0,151	1,7
38	ptsI	SEN2413	36060	30757	0,23	0,717	1,2
39		SEN2427	1412	1507	-0,09	0,813	0,937
40	dapA	SEN2468	5369	4817	0,16	0,803	1,1
41	hisS	SEN2502	5327	3046	0,81	0,116	1,7
42	lepA	SEN2563	5110	2016	1,34	0,007	2,5
43	lepA	SEN2563	5110	2016	1,34	0,007	2,5
44	yfiH	SEN2584	4359	3141	0,47	0,350	1,4
45	yfiO	SEN2586	6936	2599	1,42	0,005	2,7

Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CN	Anzahl-IV	log2FC	p-Wert	FC(CN/IV)
46	yfjD	SEN2600	1190	687	0,79	0,120	1,7
47		SEN2601	611	433	0,50	0,300	1,4
48	cysC	SEN2772	270	270	0,00	1,000	1,0
49	lgt	SEN2844	1237	812	0,61	0,236	1,5
50	lysR	SEN2857	189	186	0,03	0,915	1,0
51		SEN2865	1167	165	2,82	0,000	7,1
52	parE	SEN3024	3107	1828	0,77	0,126	1,7
53	yqjA	SEN3068	1445	1181	0,29	0,562	1,2
54	tdcC	SEN3084	116	1120	-3,27	0,000	0,103
55	folP	SEN3128	2341	2058	0,19	0,755	1,1
56	rplQ	SEN3242	31648	6825	2,21	0,000	4,6
57	rpoA	SEN3243	106462	23664	2,17	0,000	4,5
58	fusA	SEN3274	150272	37984	1,98	0,000	4,0
59	fkpA	SEN3281	14698	6452	1,19	0,014	2,3
60	feoA	SEN3331	1208	312	1,95	0,000	3,9
61	feoB	SEN3332	6386	1819	1,81	0,000	3,5
62	glpG	SEN3349	945	386	1,29	0,010	2,5
63	glpE	SEN3350	318	137	1,22	0,030	2,3
64	ftsX	SEN3392	1725	1365	0,34	0,515	1,3
65		SEN3418	207	925	-2,16	0,000	0,224
66	cspA	SEN3472	131889	4757	4,79	0,000	27,7
67	rfaI	SEN3540	1800	813	1,15	0,019	2,2
68	rfaB	SEN3541	1920	733	1,39	0,005	2,6
69		SEN3713	210	161	0,38	0,421	1,3
70	ilvY	SEN3714	193	228	-0,24	0,526	0,845
71	uvrD	SEN3748	2481	1711	0,54	0,274	1,5
72	yihI	SEN3791	1256	759	0,73	0,158	1,7
73	hemN	SEN3792	2028	2331	-0,20	0,620	0,870
74	cytR	SEN3884	1410	1912	-0,44	0,273	0,737
75	secE	SEN3931	3447	840	2,04	0,000	4,1
76	rplL	SEN3936	35324	7824	2,17	0,000	4,5
77	iclR	SEN3969	577	692	-0,26	0,408	0,833
78		SEN4030	12989	5230	1,31	0,005	2,5
79	dsbD	SEN4094	640	1246	-0,96	0,021	0,514
80	cybC	SEN4188	823	1574	-0,94	0,036	0,523
81	treR	SEN4206	267	137	0,96	0,065	2,0
		SEN_p0018	58687	48932	0,3	0,130	1,2
		SEN_p0050	17560	42590	-1,3	0,000	-2,4

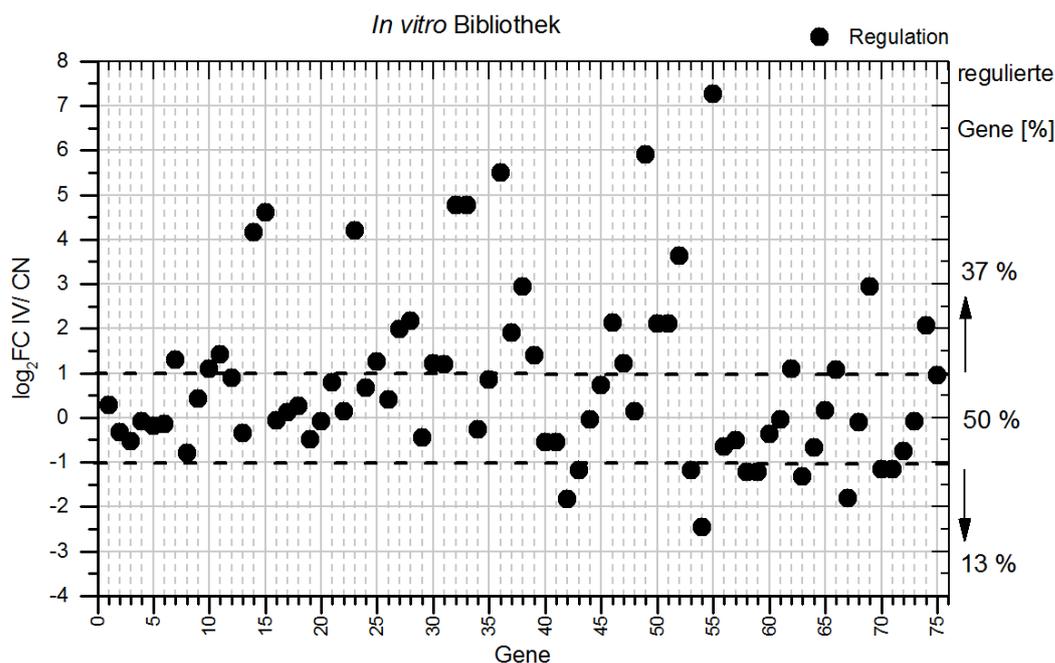
Anhang F: Auflistung aller Gene der CI-Bibliothek kombiniert mit der Transkriptom-Analyse.
 Mithilfe der relativen Transkriptzahl (DESeq-Anzahl) für die CI und IV, der \log_2FC Wert, der p-Wert und der x-fache Faktor (FC= Fold Change) des Verhältnisses (CI/IV). Die Nummerierung der Gene erfolgt nach aufsteigender Sortierung des Locus-Tags, wodurch die Zuordnung zu Abbildung 4.22 getroffen werden kann. Anhand des \log_2FC -Wertes wurde die Art der Regulation definiert: > 1 entspricht einer positiven Regulation, < 1 und > -1 entspricht einer nicht-Regulation und < -1 entspricht einer negativen Regulation. In der Transkriptom-Analyse wurde nur chromosomale DNA zugeordnet, daher wurden SEN_p Gene nicht eingeschlossen.

Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CI	Anzahl-IV	\log_2FC	p-Wert	FC (CI/IV)
1	apaG	SEN0091	1573	1630	-0,05	0,852	1,0
2	surA	SEN0094	17298	21249	-0,30	0,650	0,8
3	leuD	SEN0111	1449	224	2,69	0,002	6,5
4	ftsW	SEN0128	3110	4233	-0,45	0,512	0,7
5	murG	SEN0129	3110	4233	-0,45	0,512	0,7
6	murG	SEN0129	3110	4233	-0,45	0,512	0,7
7	murC	SEN0130	4653	7790	-0,74	0,329	0,6
8	aceF	SEN0157	14246	11144	0,35	0,834	1,3
9	yadS	SEN0210	3910	1177	1,73	0,075	3,3
10	yafS	SEN0264	1636	1336	0,29	0,798	1,2
11	rnhA	SEN0265	813	647	0,33	0,739	1,3
12	yafH	SEN0292	31117	2802	3,47	0,006	11,1
13	cypD	SEN0434	7834	14062	-0,84	0,296	0,6
14	ybbN	SEN0485	4871	6113	-0,33	0,613	0,8
15	cstA	SEN0569	8447	13480	-0,67	0,387	0,6
16	nagE	SEN0649	10464	8975	0,22	0,938	1,2
17	nagE	SEN0649	10464	8975	0,22	0,938	1,2
18	gpmA	SEN0717	30228	20391	0,57	0,705	1,5
19	galK	SEN0719	4870	18912	-1,96	0,026	0,26
20	galT	SEN0720	1072	2561	-1,26	0,075	0,4
21	hutI	SEN0732	4942	5535	-0,16	0,747	0,9
22	ybhB	SEN0737	1465	1802	-0,30	0,614	0,8
23	bioA	SEN0738	5263	1246	2,08	0,040	4,2
24	ybjE	SEN0846	1091	905	0,27	0,797	1,2
25		SEN0986A	9737	20434	-1,07	0,205	0,5
26	aspS	SEN1102	8560	12355	-0,53	0,476	0,7
27	manY	SEN1206	5466	10648	-0,96	0,229	0,5
28	manX	SEN1207	14131	25086	-0,83	0,316	0,6
29	purU	SEN1280	3886	5471	-0,49	0,488	0,7
30	trpH	SEN1312	1820	2492	-0,45	0,488	0,7
31		SEN1387	18394	17110	0,10	1,000	1,1
32	hrpA	SEN1411	5307	7040	-0,41	0,554	0,8
33	ydfG	SEN1540	4264	8346	-0,97	0,221	0,5
34	ydfH	SEN1541	3592	3138	0,19	0,929	1,1
35	ydgR	SEN1595	13600	7984	0,77	0,529	1,7
36	ssaO	SEN1629	1821	491	1,89	0,030	3,7
37	ssaN	SEN1630	7139	810	3,14	0,004	8,8
38	orf319	SEN1656	14527	32807	-1,18	0,181	0,4
39	ydiH	SEN1678	2183	2306	-0,08	0,821	0,9
40		SEN1679	7330	8359	-0,19	0,732	0,9
41	ydiE	SEN1698	1401	625	1,16	0,170	2,2
42	ydiU	SEN1699	8954	7898	0,18	0,962	1,1
43	infC	SEN1710	50304	38463	0,39	0,855	1,3
44	infC	SEN1710	50304	38463	0,39	0,855	1,3
45	thrS	SEN1711	30104	59470	-0,98	0,275	0,5

Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CI	Anzahl-IV	log2FC	p-Wert	FC (CI/IV)
46	thrS	SEN1711	30104	59470	-0,98	0,275	0,5
47		SEN1798	5039	5406	-0,10	0,797	0,9
48		SEN1799	1672	763	1,13	0,193	2,2
49	yceL	SEN1882	881	375	1,23	0,131	2,4
50	alkB	SEN2247	106	263	-1,30	0,047	0,4
51	ada	SEN2248	395	940	-1,25	0,056	0,4
52	nuoL	SEN2300	3757	25655	-2,77	0,003	0,15
53	nuoK	SEN2301	3757	25655	-2,77	0,003	0,15
54	nuoG	SEN2305	6068	36674	-2,60	0,006	0,17
55	nuoF	SEN2306	5005	29431	-2,56	0,006	0,17
56	nuoC	SEN2308	9038	41545	-2,20	0,019	0,22
57	ddg	SEN2387	10708	828	3,69	0,001	12,9
58		SEN2420	2585	1173	1,14	0,215	2,2
59	guaB	SEN2491	3361	3798	-0,18	0,734	0,9
60	pheA	SEN2588	14409	8411	0,78	0,520	1,7
61	sitA	SEN2703	84491	2638	5,00	0,001	32,0
62	serA	SEN2905	8214	3225	1,35	0,206	2,5
63	yggN	SEN2950	7442	5035	0,56	0,645	1,5
64	yqhC	SEN3006	833	565	0,56	0,520	1,5
65	sufI	SEN3015	1313	1492	-0,18	0,721	0,9
66	yhbJ	SEN3156	4928	7380	-0,58	0,429	0,7
67	ptsO	SEN3157	4928	7380	-0,58	0,429	0,7
68		SEN3195	998	849	0,23	0,842	1,2
69	yhcO	SEN3196	495	2026	-2,03	0,004	0,24
70	envZ	SEN3327	800	2953	-1,88	0,010	0,27
71	feoA	SEN3331	2688	767	1,81	0,050	3,5
72	feoB	SEN3332	22418	4475	2,32	0,048	5,0
73	yhjH	SEN3434	2213	3104	-0,49	0,465	0,7
74	yidC	SEN3659	13384	13912	-0,06	0,833	1,0
75	rbsR	SEN3700	1608	3884	-1,27	0,085	0,4
76	wzzE	SEN3724	3957	4083	-0,04	0,856	1,0
77	trkH	SEN3780	1233	1466	-0,25	0,660	0,8
78	tufA	SEN3930	24324	31763	-0,38	0,590	0,8
79	rplA	SEN3934	23010	15826	0,54	0,712	1,5
80	rsd	SEN3951	6110	2681	1,19	0,255	2,3
81	aceK	SEN3967	805	1112	-0,47	0,452	0,7
82	iclR	SEN3969	1823	1703	0,10	0,995	1,1
83	SiiE	SEN4030	13197	12864	0,04	1,000	1,0
84	melR	SEN4068	3141	7148	-1,19	0,130	0,4
85	mopA	SEN4100	31890	36863	-0,21	0,713	0,9
86	yjfO	SEN4145	5005	14584	-1,54	0,068	0,34
87		SEN4314	2906	1509	0,95	0,323	1,9
88	deoA	SEN4329	2374	2686	-0,18	0,728	0,9
89	arcA	SEN4354	22501	36807	-0,71	0,392	0,6
		SEN_p0041	172637	279242	-0,7	0,000	-1,6
		SEN_p0047	10859	7104,8	0,6	0,150	1,5
		SEN_p0048	17066	55075	-1,7	0,000	-3,2

Anhang G: Relative Genexpression von 75 Genen, der in vitro Expressionsbibliothek.

Es wurden die Genexpressionsdaten der Transkriptom-Analyse zwischen den in vitro Bedingungen und des Infektionsmodells (CN) bestimmt. Hierfür wurde das Verhältnis der relativen Transkriptanzahl (\log_2FC DESeq) eines Gens zwischen IV/ CN berechnet. Ein Verhältnis > 1 entspricht einer positiven Regulation, < 1 und > -1 keiner Regulation und < -1 entspricht einer negativen Regulation. 37 % der 75 Gene waren hochreguliert und 13 % negativ reguliert. Mit 50 % war der größte Teil der Gene nicht oder nur kaum reguliert. Und entspricht dem gleichen Muster der Infektionsbibliotheken. Die Nummerierung der Gene erfolgt nach aufsteigender Sortierung des Locus-Tags, wodurch die Zuordnung anhand der untenstehenden Tabelle getroffen werden kann.



Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CN	Anzahl-IV	log2FC	p-Wert	FC (IV/CN)
1	dnaK	SEN0011	5899	7139	0,28	0,374	1,2
2	imp	SEN0095	9269	7323	-0,34	0,511	0,8
3	yabB	SEN0120	1763	1223	-0,53	0,283	0,7
4	yabC	SEN0121	3363	3146	-0,10	0,943	0,9
5		SEN0141	626	552	-0,18	0,732	0,9
6	yacG	SEN0142	95	86	-0,15	0,810	0,9
7	aroM	SEN0373	452	1108	1,29	0,005	2,5
8	secF	SEN0391	2228	1288	-0,79	0,123	0,6
9	lon	SEN0432	4492	6036	0,43	0,255	1,3
10	cstA	SEN0569	2577	5481	1,09	0,012	2,1
11	ybdD	SEN0570	374	1003	1,42	0,002	2,7
12	pagP	SEN0597	973	1805	0,89	0,042	1,9
13	ybeD	SEN0605	1090	861	-0,34	0,558	0,8
14	gltA	SEN0680	1728	30898	4,16	0,000	17,9
15	sucA	SEN0686	1960	47419	4,60	0,000	24,2
16	tolB	SEN0698	3811	3653	-0,06	0,971	1,0
17	pal	SEN0699	8493	9191	0,11	0,747	1,1
18	ybiJ	SEN0769	170	203	0,26	0,622	1,2
19	grxA	SEN0818	1973	1395	-0,50	0,374	0,7
20	ftsK	SEN0864	5785	5463	-0,08	0,921	0,9
21	uvrY	SEN1059	3555	6154	0,79	0,066	1,7

Nr	Gen	Locus-Tag	Anzahl-CN	Anzahl-IV	log2FC	p-Wert	FC (IV/CN)
22	argS	SEN1094	1672	1833	0,13	0,636	1,1
23	yebF	SEN1122	166	3031	4,19	0,000	18,2
24		SEN1152	228	359	0,66	0,160	1,6
25	pspA	SEN1343	272	652	1,26	0,005	2,4
26		SEN1387	5303	6957	0,39	0,293	1,3
27		SEN1512	103	407	1,98	0,000	3,9
28	ttrR	SEN1658	725	3243	2,16	0,000	4,5
29	lpp	SEN1668	40162	29245	-0,46	0,340	0,7
30	sufC	SEN1674	3483	8119	1,22	0,003	2,3
31	sufB	SEN1675	2511	5770	1,20	0,004	2,3
32	pps	SEN1695	449	12262	4,77	0,000	27,3
33	pps	SEN1695	449	12262	4,77	0,000	27,3
34	thrS	SEN1711	29119	24179	-0,27	0,544	0,8
35	ydjA	SEN1747	482	864	0,84	0,047	1,8
36		SEN1790	63	2838	5,50	0,000	45,2
37		SEN1821	338	1257	1,90	0,000	3,7
38	pepT	SEN1822	270	2074	2,94	0,000	7,7
39	cbiO	SEN2018	336	890	1,41	0,002	2,7
40	rfbD	SEN2092	5155	3513	-0,55	0,282	0,7
41	rfbB	SEN2093	5155	3513	-0,55	0,282	0,7
42		SEN2150	188	53	-1,84	0,001	0,3
43	yehS	SEN2151	977	433	-1,17	0,021	0,4
44	yehT	SEN2152	1291	1257	-0,04	0,903	1,0
45	bglX	SEN2160	770	1280	0,73	0,074	1,7
46	yeiG	SEN2187	850	3721	2,13	0,000	4,4
47		SEN2188	73	168	1,20	0,010	2,3
48	yejA	SEN2209	876	966	0,14	0,707	1,1
49	elaB	SEN2293	203	12127	5,90	0,000	59,6
50	nuoK	SEN2301	2432	10431	2,10	0,000	4,3
51	nuoJ	SEN2302	2432	10431	2,10	0,000	4,3
52	csiE	SEN2533	298	3681	3,63	0,000	12,4
53	era	SEN2560	7132	3127	-1,19	0,016	0,4
54	trmD	SEN2595	59188	10676	-2,47	0,000	0,2
55	ygaU	SEN2639	94	14332	7,25	0,000	152,7
56	xerD	SEN2887	1166	743	-0,65	0,194	0,6
57	fldB	SEN2888	1212	848	-0,51	0,303	0,7
58	yggV	SEN2946	3495	1499	-1,22	0,014	0,4
59	yggW	SEN2947	3495	1499	-1,22	0,014	0,4
60		SEN2995	370	287	-0,36	0,608	0,8
61	yrdD	SEN3231	814	787	-0,05	0,933	1,0
62	smg	SEN3232	2111	4482	1,09	0,014	2,1
63	dam	SEN3310	2943	1178	-1,32	0,007	0,4
64	gntR	SEN3366	931	585	-0,67	0,183	0,6
65		SEN3403	1059	1180	0,16	0,707	1,1
66	uspA	SEN3414	5780	12124	1,07	0,019	2,1
67	lpfD	SEN3460	321	91	-1,82	0,001	0,3
68	yiiU	SEN3878	2546	2354	-0,11	1,000	0,9
69	thiC	SEN3950	1233	9465	2,94	0,000	7,7
70	yjaH	SEN3957	1433	638	-1,17	0,025	0,4
71	yjaH	SEN3957	1433	638	-1,17	0,025	0,4
72	yjeP	SEN4117	1538	908	-0,76	0,117	0,6
73	hflX	SEN4129	4089	3875	-0,08	0,931	0,9
74	yjgF	SEN4209	1854	7793	2,07	0,000	4,2
75	dnaK	SEN0011	1041	2021	0,96	0,027	1,9
		SEN_p0003	25461	17520	-0,5	0,078	0,7

Anhang H: Top 96 der Genexpressionsdaten für jede Bedingung (CI,CN,IV) bezogen auf die 96 häufigsten Gene (bezogen auf Transkriptanzahl) und die 96 höchst reguliertesten Gene

Gene, die sowohl zu den häufigsten Transkripten als auch zu den höchst reguliertesten Genen innerhalb einer Bibliothek gehören wurden mit grau hinterlegt. Transkripte, die zwischen zwei Bibliotheken gemeinsam waren, wurden durch einen Rahmen markiert. Nur zwischen CI und CN Gemeinsamkeiten.

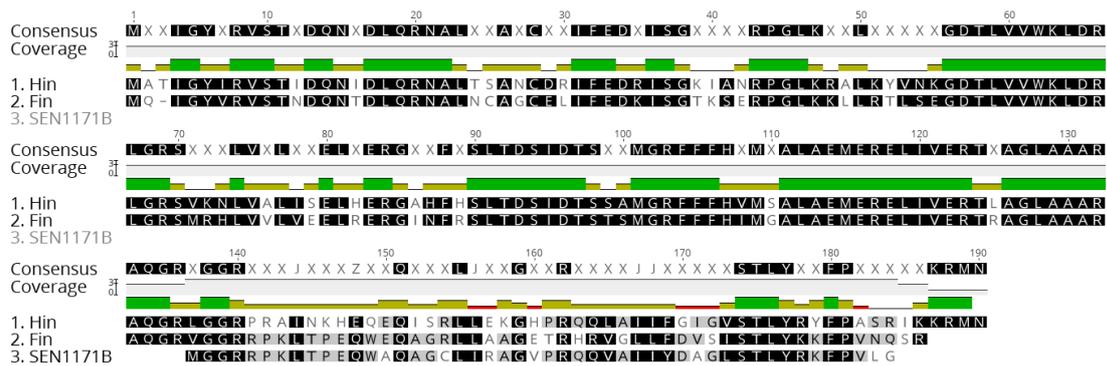
Nr	CI-top96-Anzahl	CI-top96-Regulation	CN-top96-Anzahl	CN-top96-Regulation	IV-top96-Anzahl	IV-top96-Regulation
1	yfiA	ssaE	rpsA	entE	ompA	yfiG
2	tmRNA	ssaH	fusA	ybdA	CsrB	yfiF
3	fljB	iroB	cspA	entA,entB	tmRNA	yfiE
4	ompA	ssaG	rpoA	entC	yfiA	SEN1303
5	RNaseP_bact	fes	tmRNA	fepA	ompC	fbaB
6	iroN	iroN	secY	cirA	fljB	SEN1538
7	fusA	SEN4317	CsrB	fes	CsrC	ybgS
8	cspA	iroC	nmpC	SEN1469	RNaseP_bact	ymdF
9	rpsA	entF,ybdZ	RNaseP_bact	fhuA	gapA	katE
10	nlpD	nrdE,nrdH,nrdI	aceE	SEN1805	dps	dps
11	sitA,sitB,sitC,sitD	cysD	SEN3273	fepB	aspA	osmY
12	rpoA	sseA	trmD	fhuE	SEN1303	SEN4280
13	secY	sseJ	rplM	ybdB	nmpC	ygaM
14	gapA	mgtC	rplJ	entD	sucA	aldB
15	lpp	cirA	rplD,rplW	entF,ybdZ	osmY	ygaU
16	virK	entE	rpsD	yqjH	nlpD	SEN2976
17	rplD,rplW	iroE	rpsJ	SEN4091	yfiE	ygdI
18	uspA	fepB	rplB	fhuF	rpsA	osmC
19	CsrB	sscB	rplK	bfd	yfiF	SEN1495,SEN1496
20	mdh	fhuE	rpsM	SEN3940	fusA	ydeI
21	mig-14	fepA	SEN0222A,rpsB	sitA,sitB,sitC,sitD	fbaB	SEN3596
22	cspE	ssaI,ssaJ	infC	yjiY	ygdI	yahO
23	rpsJ	SEN1469	rpsH	STnc240	yfiG	yeaG
24	aceE	SEN2269	rplP,rpmC,rpsQ	cspA	gltA	treA
25	SEN2282-85,pmrF,pqaB,yfbG	bfd	gapA	STnc220	ptsI	SEN1494
26	sodA	sifB	infB	Spot_42	sucC,sucD	ymgE
27	infC	SEN1920	lpp	ansP	gcvP	wraB
28	sufC,sufD,sufS	lldD,lldP,lldR	rpsG	fhuB,fhuC,fhuD	pckA	SEN1428
29	nlpI	uhpT	rplA	cspB	lpp	SEN2975
30	hupA	sitA,sitB,sitC,sitD	tig	rhIE	rpoC	SEN0342
31	SEN1469	SEN1801	rplN	SEN4026-29	fdoG	elaB
32	fba	sseE	rplC	SEN2191	sipC	poxB
33	SEN3273	iroD	tsf	isrC	grxB	osmE
34	infB	ssaR,ssaS	rpsC	SEN1470	pflB	SEN1497
35	rplB	SEN1635,ssaK,ssaL	ptsI	suhB	fliD	yccJ
36	fadB	nrdF	rplU	SEN1141	fba	rpsV
37	rplM	ssaA,sseB	fepA	SEN4317	icdA	ompW

Nr	CI-top96-Anzahl	CI-top96-Regulation	CN-top96-Anzahl	CN-top96-Regulation	IV-top96-Anzahl	IV-top96-Regulation
38	nmpC	ybdA	rplL	fepC,fepD,fe pG	rpoS	SEN0343,SE N0344
39	ibpB	SEN1163	deaD	yeeF	thrS	yhbO
40	iroC	glnK	yceD	rpsT	yeaG	psiF
41	gltA	ycfR	fljB	yhfL	SEN2282- 85,pmrF, pqaB,yfbG	SEN2633
42	rpsH	entC	rpmI	SEN4084	rpoA	yehZ
43	adhE	entA,entB	rpoB	SEN3003,ex bB	dppA	SEN1790
44	rpsD	fhuF	rpoC	iroN	sucB	yjbJ
45	deaD	ibpB	cspE	STnc490k	katE	yiaG
46	cirA	ssaC,ssaD	cirA	iroB	ompX	SEN1783
47	icdA	ssaB	rplT	ytgA	frdA,frdB	acs
48	phoP,phoQ	isrC	rplQ	yaaY	secY	yneB
49	gltI	mgtB	SEN1469	SEN2742	osmE	adhP
50	trmD	SEN1564A	rplF	yhfC	yjbJ	SEN0081
51	SEN0222A,r psB	yjcB	nlpI	SEN2359	SEN1538	ybaY
52	ibpA	isrH	sitA,sitB,sitC ,sitD	SEN2356	napA,napD,n apF	gabD
53	rpoS	ybdB	rpsT	envF	SEN4247	ybdR
54	fepA	pgtP	thrS	SEN0267	SEN3273	SEN2609
55	ptsI	SEN2380A	rpsS	tp2	rpoB	yneA
56	rplP,rpmC,rp sQ	Spot_42	rpsL	P26	cyoB	dmsB
57	ompC	entD	rpsE	iroE	hupA	SEN1557
58	rho	STnc220	rpsN	tonB	SEN1497	sucC,sucD
59	rpoC	cspB	rplE	rplY	lpdA	SEN1785
60	rplC	fhuA	rplV	stfA	nuoC	ego,ydeY,yd eZ
61	rpsM	sseC	rpmA	SEN2380A	ybaY	otsA,otsB
62	rpsG	SEN2191	yaeT	SEN3512	mdh	tktB
63	eno	ibpA	rpsF	SEN3135	acnA	sodC
64	sufB	SEN4084	acpP	deaD	glyA	sraL
65	rpsC	ssaT,ssaU	rpsK	iroC	SEN1495,SE N1496	yeaH
66	hns	SEN2742	rimM	yjgN	sipB	ftnB
67	rplJ	STnc490k	rho	SEN0159	sodB	orf408
68	rplK	SEN1784	tufA	yhdG	adhE	SEN1558,SE N1559
69	rpoB	SEN1173	eno	fruF	SEN0385	melA
70	iroB	SEN1805	typA	iroD	infC	talA
71	rplN	ytgA	ompA	SEN1524	rpsV	mgla
72	rplE	pipB	rpmB	SEN3887	rplJ	sucB
73	mopA	SEN1335	lpdA	SEN1797	aldB	oat
74	yceD	SEN1990	rseA,rseB,rse C	fis	SEN4280	acnA
75	acpP	ygjT	yfiA	rpsO	phoP,phoQ	SEN1133
76	SEN1797	SEN0501	rplO	SEN4032	ydaA	pps
77	entF,ybdZ	SEN1172	prsA	SEN1142	acnB	SEN4218
78	pnp	yqjH	rpsP	rpsU	eno	narV,narW,n arY,narZ

Nr	CI-top96-Anzahl	CI-top96-Regulation	CN-top96-Anzahl	CN-top96-Regulation	IV-top96-Anzahl	IV-top96-Regulation
79	yafH	sseD	rplY	yaaH	mopA	chaB
80	dnaK	soxS	rpmF	SEN0278	arcA	hpaF
81	lpxC	SEN3594	adhE	fruK	atpA	yedP
82	ybjX	ycaD	rplX	SEN0029	nuoG,nuoH	astA,astB,astC,astD,astE
83	clpA	yfhP	rpsU	SEN2357,SEN2358	tpiA	ydeJ
84	gpmA	SEN2227	accC	typA	rpsD	mglB
85	thrS	sbp	pnp	sok	ygaU	potE,speF
86	rpmI	SEN0876	rplS	gtrC	aceE	dmsA
87	SEN2624	cysC,cysN	hupA	SEN4156	cydA	yodD
88	fliD	ddg	yidC	rbsD	SEN2710,SEN2712,orgA,prgJ,prgK	sucA
89	ahpC	SEN1381	rpmE	fruA	acpP	tdcB
90	tig	SEN1171	fhuA	rpsJ	sipA	ycgB
91	rplF	yjiY	rpsO	infA	gcvT	napG,napH
92	rpsE	SEN4091	aceF	SEN0331	orf319	ugpB
93	SEN1801	lysA	iroN	pdhR	proX	fumC
94	rplU	mgtA	rpsI	STnc50	SEN2609	ompC
95	tpx	sfbA	lpxC	rpmH	ompW	eutM
96	nrdE,nrdH,nrdI	SEN1171B	fba	SEN0269	tufA	ydcW

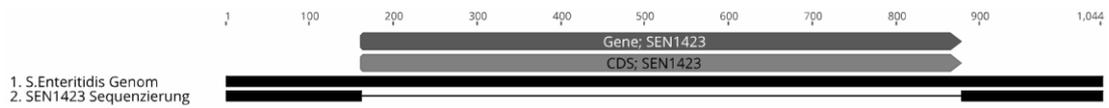
Anhang I: Sequenz-Alignment von den SEN1171B Orthologen Hin und Fin

Es wurde ein Multiple Alignment für die Proteine SEN1171B, Fin und Hin mit COBALT (NCBI) durchgeführt. Aminosäuren die in allen 3 Proteinen übereinstimmt wurde als Consensus Sequenz angegeben. Innerhalb der jeweiligen Proteinsequenz sind Aminosäuren grau hervorgehoben, die lediglich zwischen zwei Sequenzen identisch sind. Die Aminosäuresequenz von SEN1171B ist zu 44 % zu Hin bzw. 60 % zu Fin identisch.

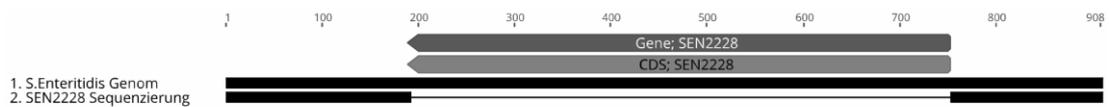


Anhang J: Konstrukte der Knockoutgenerierung nach Sequenzierung der Mutanten

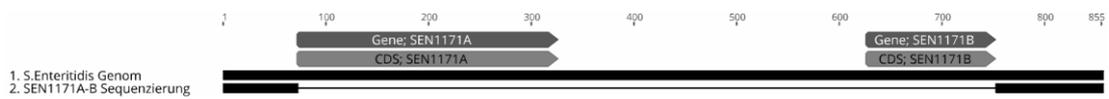
Sequenzierung der Konstrukte für Δ SEN1423 (a), Δ SEN2228 (b) und Δ SEN1171A-B (c). Die Abbildung zeigt den Genlocus (grün) und die CDS (gelb) mit der jeweiligen Annotierung für *S. Enteritidis* P125109 und den durch die Sequenzierung abgedeckten Bereichs.



(a) Sequenzierung des Konstrukts SEN1423

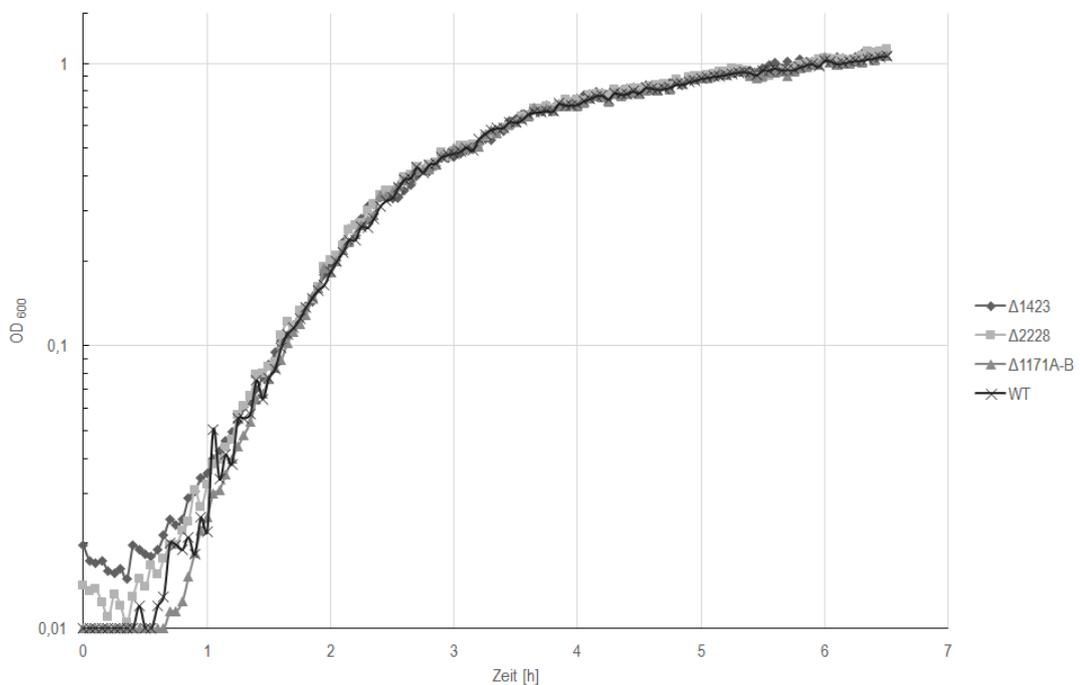


(b) Sequenzierung des Konstrukts SEN2228



(c) Sequenzierung des Konstrukts SEN1171A-B

Anhang K: Aufzeichnung des Wachstumsverhalten von *S. Enteritidis* WT und den Mutanten Δ SEN1430, Δ SEN2228 und Δ SEN1171A/B in NBS-Medium über 6,5 h bei 37 °C.



Anhang L Geräte

Name	Hersteller
Mikroskop IX71	Olympus
Centrifuge 5414 D/5415 R	Eppendorf
Centrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Rotor JS 5.3 for Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Rotor JLA 16.250 for Avanti J-26 XP	Beckman Coulter
Incubation Shaker Innova 40R	New Brunswick Scientific
Incubation Cabinet BD115	Binder
Thriller	Peqlab
Thermocycler DNA Engine Gradient Cycler	BioRad
BioDocAnalyze Digital	Analytik Jena
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab
Mini Protean II	Biorad
Genetix QArray2 Microarray spotter	Molecular Devices
2100 Bioanalyzer	Agilent
Axon Genepix 4200A	Molecular Devices
Roti®-Mag Tube Separator	Roth
ProPlate® 2-well module Grace™	Biolabs
Typhoon FLA 9500	GE Healthcare
EasyJecT Plus Electroporator	Equibio
BioPhotometer	Eppendorf
Charlotte 8 channel pipette	VistaLab Technologies
Vortex Genie2	Scientific Industries
Orbital Shaker OS-10	Biosan
Autoclave VA65	Systec
NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer	Peqlab
1.3 ml Nunc® 96 DeepWell™ Plate	Thermo Fischer

Anhang M: Oligonukleotide

Name	Sequenz
SEN1423_for	5'-TTAGGTGGTTTGGGATGGGG-3'
SEN1423_rev	5'-CGTAGTACCAGCCTCCATCA-3'
SEN1423_ko_for	5'-CTATTTTCATATTAATAATTTCTTAAGTGAGTT AACTATAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT-3'
SEN14_ko_rev	5'-TTCTGCCGTCATTTACGCTCTTGCCAACCAGCATT TACCATGGTCCATATGAATATCCTCC-3'
SEN1423_cf	5'-GTGTGCGCCTGGCTAAGGCA-3'
SEN1423_cr	5'-GCGCTCCAGTTCAACTTGGG-3'
SEN2228_ko_for	5'-CCGGTTAAAAATAACTATTGACATTGAAATGGT GGTGGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT-3'
SEN2228_ko_rev	5'-TACTCCTTCAGCCAGCAACTCGCTAATTGTTATTCA ACTCCATGGTCCATATGAATATCCTCC-3'
SEN2228_cf	5'-GAGCGTCATTCACTTATAAC-3'
SEN2228_cr	5'-GTAAATGAGTAAGCAATCTG-3'
SEN1171AB_ko_for	5'-AGTTTCAACAGTCTGTGTTTTTTGTGAAAACGAC TCGCTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT-3'
SEN1171AB_ko_rev	5'-AGCACATATTTGGGTGGCACGCACCGTGGAATAAC TGCACCATGGTCCATATGAATATCCTCC-3'
SEN1171AB_cf	5'-TCATCATTGCCGTGTTGCTC-3'
SEN1171AB_cr	5'-GTTATGGGCTAACACGGAAG-3'

Veröffentlichungen

Danckert, Hoppe et al. (2014): Rapid identification of novel antigens of *Salmonella* Enteritidis by microarray-based immunoscreening. In: *Microchim Acta*. DOI: 10.1007/s00604-014-1197-6.

Connor; Danckert et al. (2017): Epitope determination of immunogenic proteins of *Neisseria gonorrhoeae*. In: *PLoS ONE* 12 (7), DOI: 10.1371/journal.pone.0180962.

Posterpräsentationen

Determining key residues in bacterial antigens by random mutagenesis

Lena Danckert, Frank F. Bier, Markus von Nickisch-Roseneck

Potsdam, Days on Bioanalysis; 7. -8. November, 2013

In vitro Analyse von *Salmonella* Enteritidis zur Identifizierung neuer immunogener Proteine

Lena Danckert, Sebastian Hoppe, Frank F. Bier, Markus von Nickisch-Roseneck

München, Deutsches Biosensor Symposium; 11.–13. März 2015

In vitro analysis of *Salmonella* Enteritidis to identify new immunogenic proteins

Lena Danckert, Sebastian Hoppe, Frank F. Bier, Markus von Nickisch-Roseneck

Leipzig, Fraunhofer IZI Science Day; 3. Juli 2015

Infection-like analysis of *Salmonella* Enteritidis

Lena Danckert, Frank F. Bier, Eva Ehrentreich-Förster, Markus von Nickisch-Roseneck

Potsdam, Days on Bioanalysis; 4. - 5. November, 2015

Infection-like approach to identify immunogenic proteins of *Salmonella* Enteritidis

Lena Danckert, Frank F. Bier, Eva Ehrentreich-Förster, Markus von Nickisch-Roseneck

Valencia, Spanien, 7th World Congress on Microbiology; 28. -29. November 2016

Danksagung

Auch wenn ich kein Mensch der vielen Worte bin und ich noch genau weiß, wie ich vor zwei Jahren sagte: „Das schaff ich nie“. Habe ich es sehr wohl geschafft! Und nun möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei einigen Menschen für ihre Unterstützung bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bier vom Fraunhofer IZI-BB für die Betreuung der Dissertation bedanken und seine Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Zusammenhängen. Ebenso möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Markus Nickisch-Rosenegk bedanken, der mir nach der Masterarbeit die Möglichkeit gegeben hat, weiterführende Arbeiten für meine Promotion durchzuführen. Durch ein stetiges Vertrauen und Unterstützung in moralischer als auch fachlicher Hinsicht, habe ich die Gelegenheit bekommen die Kombination aus Zellkulturarbeiten und Erregerstudien durchzuführen. Wodurch ich meine wissenschaftlichen Kenntnisse weitgehend ausbauen konnte.

Dabei gilt ein besonderer Dank Dr. Sebastian Hoppe, der durch sein stetiges Interesse und Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen meine Arbeit sehr bereichert hat. Zudem hat er immer die richtigen Worte gefunden, die mich motiviert und bestätigt haben. Insbesondere danke ich ihm für seine Ausdauer beim Korrekturlesen meiner Dissertation.

Weiterhin möchte ich Martina Obry danken, die mir den Laboralltag um ein Vielfaches erleichtert hat, indem sie mich bei der Ausführung der umfangreichen Screenings unterstützt hat und mir auch immer moralisch zur Seite stand.

Ebenso möchte Dr. Daniel Connor danken, dass er mir ein Freund und Leidensgenosse war, mich immer motiviert und mich zum Lachen gebracht hat, auch in der abwegigsten Situation. Ein weiterer Dank gilt André Rostalsky, der im Rahmen seiner Masterarbeit die Knockout Versuche durchgeführt hat und dabei viel Engagement aufgebracht hat. Es war mir eine Freude ihn während seiner Abschlussarbeit zu begleiten.

Generell möchte ich mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanken, für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima, weshalb ich diese Zeit immer in positiver Erinnerung behalten werde.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Felix Jorde, Dr. Katja Uhlig und Christian Görner bedanken, die konzeptionell und durch zahlreiche Diskussionen meine Arbeit bereichert haben. Ihr wart mir nicht nur Kollegen, sondern Freunde und ohne euch hätte mir die Zeit nie so viel Freude bereitet. Es gibt unzählige Momente, an die ich mich mit Freude erinnere und die auch euch z. B. beim Schreiben von Einkaufslisten immer zum Lachen bringen werden.

Dabei gilt mein größter Dank meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Sie haben mich immer unterstützt und mich bestärkt, wodurch sie mir erst die Möglichkeit zur Promotion eingeräumt haben. Dabei möchte ich vor allem bei meinem Vater bedanken, dass er mir das naturwissenschaftliche Interesse förmlich in die Wiege gelegt und mich richtungsweisend begleitet hat. Durch eure Erziehung wurden mir alle grundlegenden Werte fürs Leben mitgegeben, die mich hierhin gebracht haben und mich auch weiterhin in meinem Leben bereichern.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Alle aus anderen Quellen oder indirekt übernommene Daten sind unter Angabe der Referenz gekennzeichnet. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation in gleicher oder ähnlicher Fassung noch keiner anderen Universität vorgelegt wurde.

Potsdam, den 14.06.2018

X

Lena Danckert