Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

# *In-vitro*-Untersuchungen zur Adhäsivität, Invasivität und intrazellulären Persistenz von *Salmonella-enterica*-Impfstämmen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
**Antje Castringius**
Tierärztin aus Bremen

Gießen 2000

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. M. Reinacher |

---

| | |
|---|---|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. Doll |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 05.12.2000 |

Meinen Eltern

**1. Einleitung ..... 1**

**2. Literaturübersicht ..... 3**

**2.1 Adhäsivität von *Salmonella* ..... 4**

2.1.1 Erscheinungsbild der Adhäsion ..... 4

2.1.2 Fimbrienadhäsine ..... 7

2.1.3 Andere Adhäsine ..... 10

2.1.4 Adhäsionsrezeptoren der Wirtszelle ..... 11

2.1.5 Regulation des adhäsiven Phänotyps ..... 12

**2.2 Invasivität von *Salmonella* ..... 12**

2.2.1 Aufbau und Funktion der *Salmonella*-Pathogenitätsinseln SPI1 und SPI2 ..... 12

2.2.2 Bedeutung der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 für die Virulenz ..... 14

2.2.3 Genereller Aufbau des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionssystems ..... 14

2.2.4 Strukturelle Komponenten des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretions-Systems ..... 15

2.2.5 Akzessorische Proteine des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionssystems ..... 16

2.2.6 Sezernierte Zielproteine des Typ-III-Sekretionsapparates ..... 18

2.2.7 Regulation der Invasion ..... 20

2.2.8 Induktion der Protein-Sekretion und Invasomen-Bildung ..... 22

2.2.9 Die Antworten der Wirtszelle ..... 30

**2.3 Intrazelluläre Persistenz und Replikation von *Salmonella* ..... 36**

2.3.1 Intrazelluläre Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von *Salmonella* in verschiedenen Zellarten ..... 36

2.3.2 Die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) ..... 40

2.3.3 Der intrazelluläre Reifungsprozeß *Salmonella*-haltiger Vakuolen ..... 42

2.3.4 *Salmonella*-induzierte filamentöse Lysosomen (Sif) in Epithelzellen ..... 45

2.3.5 Überlebensmechanismen von *Salmonella* im Inneren von Wirtszellen ..... 46

2.3.5.1 Resistenz gegenüber Defensinen ..... 47

2.3.5.2 Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffmetaboliten ..... 48

2.3.5.3 Resistenz gegenüber niedrigem pH....48
2.3.6 Auswirkung der Salmonellen-Besiedlung auf die infizierten Wirtszellen....50

**3. Eigene Untersuchungen....53**

**3.1 Material und Methoden....53**
3.1.1 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen....53
3.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme....53
3.1.1.2 Anzuchtbedingungen....53
3.1.2 Zellarten und Anzuchtbedingungen....55
3.1.2.1 Verwendete Zellarten....55
3.1.2.2 Anzuchtbedingungen....55
3.1.3 Bestimmung der Keimkonzentration....56
3.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration....57
3.1.5 Bestimmung der Vitalität von Zellkulturen (MTT-Test)....57
3.1.5.1 MTT-Test über vier Stunden....58
3.1.5.2 MTT-Test über acht Tage....58
3.1.6 Bestimmung der Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe....58
3.1.6.1 Agardiffusionstest....58
3.1.6.2 Bouillonverdünnungstest....59
3.1.6.3 Bestimmung der Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchslösung....59
3.1.7 Lichtmikroskopische Untersuchungen (Giemsa-Test)....60
3.1.8 Gentamicin-Invasionstest....61
3.1.8.1 Test auf Adhäsivität und Invasivität....61
3.1.8.2 Test auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit....63
3.1.9 Statistik....63

**3.2 Ergebnisse....64**
3.2.1 Vermehrungskinetik der verwendeten Bakterienstämme....64
3.2.1.1 Vermehrungskinetik in LB-Medium....64
3.2.1.2 Vermehrungskinetik in konditioniertem Zellkulturmedium....65

3.2.2 Optimierung des Gentamicin-Invasionstests ..... 67
3.2.2.1 Resistenzspektrum der verwendeten Bakterienstämme ..... 67
3.2.2.2 Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchskonzentration ..... 67
3.2.2.3 Zellverträglichkeit von Gentamicin ..... 71
3.2.3 Interaktion von Salmonellen mit Zellkultur-Monolayern ..... 74
3.2.3.1 Anzahl der intrazellulären Salmonellen bei einer Animpfdosis von MOI 100 ..... 74
3.2.3.2 Adhäsivität (qualitativ) ..... 76
3.2.3.3 Adhäsivität (quantitativ) ..... 84
3.2.3.4 Invasivität ..... 87
3.2.3.5 Intrazelluläre Überlebensfähigkeit ..... 92

**4. Diskussion ..... 98**

**5. Zusammenfassung ..... 108**

**6. Summary ..... 111**

**7. Literaturverzeichnis ..... 113**

**8. Anhang ..... 140**

**8.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte ..... 140**

**8.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen ..... 141**

8.2.1 Nährmedien für die Bakterienanzucht ..... 141
8.2.2 Nährmedien und Puffer für Zellkultur und Infektionsversuche ..... 142

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Aqua bidest. | Aqua bidestillata |
| AS | Aminosäure |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenosin-Tri-Phosphat |
| BME | Basal-Medium nach Eagle |
| bp | Basen-Paare |
| C+G | Cytosin+Guanosin |
| Caco-2 | humane Colon-Karzinomzellinie |
| CHO | Chinese Hamster Ovary-Zellen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat |
| EHEC | enterohämorrhagische *Escherichia coli* |
| EMBL | European Molecular Biology Laboratory |
| EPEC | enteropathogene *Escherichia coli* |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| HeLa | humane Zervixkarzinom-Zellinie |
| Henle-407 | humane embryonale Darmephithel-Zellinie |
| HEPES | (N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) |
| IE | Internationale Einheiten |
| IEC-6 | Dünndarmepithelzellinie der Ratte |
| IOC | Intestinal Organe Culture |
| i.p. | intraperitoneal |
| J774 | murine reticuloendotheliale Sarkom-Zellinie |
| KbE | Kolonie-bildende Einheiten |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KM | Knochenmark |

| | |
|---|---|
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| $LD_{50}$ | letale Dosis für 50% |
| MDa | Megadalton |
| MDBK | Madin-Darby-Bovine-Kidney |
| MDCK | Madin-Darby-Canine-Kidney |
| MG | Molekulargewicht |
| MHK | Minimale Hemm-Konzentration |
| MOI | Multiplicity Of Infection |
| | (= Anzahl der Bakterien [KbE])/Anzahl der Zielzellen) |
| MTT | 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid |
| NB I | Nährbouillon I |
| $OD_{600}$ | Optische Dichte bei 600 nm |
| OMP | Outer-Membrane-Protein |
| *P. solanacearum* | *Pseudomonas solanacearum* |
| *P. syringae* | *Pseudomonas syringae* |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| RT | Raumtemperatur |
| *S*.Cs | *Salmonella* Choleraesuis |
| *S*.Dubl | *Salmonella* Dublin |
| *S*.Ent | *Salmonella* Enteritidis |
| *S. enterica* | *Salmonella enterica* |
| *S. flexneri* | *Shigella flexneri* |
| *S*.Gall | *Salmonella* Gallinarum |
| *S*.Tm | *Salmonella* Typhimurium |
| SDS | Sodium-Dodecyl-Sulfat |
| *Staph. aureus* | *Staphylococcus aureus* |
| spp | Spezies |
| subsp | Subspezies |
| TSA | Trypticase-Soja-Agar |

| | |
|---|---|
| U937 | humane, nicht-differenzierte myelomonozytische Zellinie |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| U/ml | Units pro Milliliter |
| *V. cholerae* | *Vibrio cholerae* |
| *X. campestris* | *Xanthomonas campestris* |
| *Y. pestis* | *Yersinia pestis* |

# 1. EINLEITUNG

Die aktive Immunisierung hat bei der Bekämpfung von Salmonellen in Nutztierbeständen international zunehmende Bedeutung (MEYER *et al*., 1993; BARROW, 1997; BERBORA *et al*., 1998; ZHANG-BARBER *et al*., 1999). In vielen tierexperimentellen Untersuchungen stellte sich heraus, daß *Salmonella*-Lebendvakzinen den Inaktivat- und den Subunitvakzinen in der Wirksamkeit überlegen sind (VIELITZ *et al*., 1992; BARROW *et al*., 1990; HORMAECHE *et al*.,1990; ROBERTSSON *et al*., 1983, PARDON *et al*., 1990; MARTIN, 1992). Moderne Impfstrategien gegen Salmonellen basieren daher fast ausnahmslos auf der Anwendung von Lebendimpfstoffen aus vermehrungsfähigen Bakterien von bestimmten, stabil attenuierten *Salmonella*-Stämmen. Aufgrund guter Erfahrungen mit der Wirksamkeit und Verträglichkeit von oral verabreichten *Salmonella*-Lebendvakzinen werden solche Impfstämme auch immer häufiger als Vektoren eingesetzt, um dem Impfling Antigene anderer Organismen in optimaler Weise zu präsentieren. Auf diese Weise konnte in Probanden bereits eine gut belastbare Immunität gegen virale, bakterielle und eukaryontische Krankheitserreger erzeugt werden (CHATFIELD *et al*., 1989; LEVINE *et al*., 1996; NARDELLI-HAEFLINGER *et al*., 1997; TOEBE *et al*., 1997; GOMEZ-DUARTE *et al*., 1998).

In Deutschland sind derzeit 8 *Salmonella*-Lebendimpfstoffe zur Anwendung beim Huhn, beim Rind, beim Schwein und bei der Taube zugelassen. Bei den diesen Impfstoffen zugrunde liegenden Stämmen handelt es sich um Vertreter der Serovare Typhimurium, Enteritidis (Phagentyp 4), Dublin und Choleraesuis von *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Diese Stämme wurden durch Behandlung mit verschiedenen Substanzen ungezielt mutiert, auf phänotypische Marker vorselektiert und schließlich tierexperimentell auf verminderte Virulenz selektiert (LINDE, 1981a,b, 1982; LINDE *et al*., 1981). Die zur Impfung zugelassenen Stämme sind attenuiert und tragen stabile phänotypische Marker, an denen sie von *Salmonella*-Feldstämmen zu unterscheiden sind (u.a. Resistenz gegen Antibiotika, Empfindlichkeit gegenüber Tensiden, Auxotrophien). Für einige dieser Stämme wurden auch charakteristische genetische Eigenschaften nachgewiesen (SCHWARZ *et al*., 1995; FRECH

*et al*., 1998; LIEBISCH & SCHWARZ, 1996; BEYER & GEUE, 1992; WEIDE-BOTJES *et al*., 1996).

Neuere Arbeiten zur Pathogenese von Salmonelleninfektionen haben gezeigt, daß die Anheftung an Zellen des Wirts (Adhäsion), das aktive Eindringen in Wirtszellen (Invasion) und die Fähigkeit, in den Wirtszellen zu überleben und sich dort vermehren zu können, entscheidende Schritte in der Pathogenese von Salmonelleninfektionen sind (LEUNG & FINLAY, 1991; BARROW *et al*., 1992; RUBINO *et al*., 1993; AMIN *et al*., 1994; PENHEITER *et al*., 1997; PORTER & CURTISS III, 1997; VAN DER VELDEN *et al*., 1998; HENSEL *et al*., 1998). Adhäsion, Invasion und die wenn auch begrenzte Überlebens- und Vermehrungsfähigkeit von Salmonellen in den Zellen und lymphoretikulären Geweben des Wirtes sind auch eine Voraussetzung für die Wirksamkeit von *Salmonella*-Lebendimpfstoffen (WILSON *et al*., 1990; GERMANIER, 1972, COLLINS, 1974; MITOV *et al*., 1992).

Während die Wirksamkeit und Unschädlichkeit der *Salmonella*-Impfstämme meist recht gut dokumentiert sind, gibt es über die der Attenuierung zugrunde liegenden Mechanismen bislang nur Spekulationen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkulturtest mit Zellen vom Menschen, vom Huhn und vom Rind etabliert, um damit drei derzeit eingesetzte Impfstämme im Vergleich zu vollvirulenten Wildtypstämmen auf die veränderte Wechselwirkung mit eukaryontischen Wirtszellen zu prüfen. Gleichzeitig sollte versucht werden, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, ob die hochgradige Adaptation der Serovare Gallinarum und Dublin an die Wirtsspezies Huhn bzw. Rind mit einer verstärkten Ausprägung der genannten Virulenzeigenschaften gegenüber Zellen von diesen Wirtsspezies korreliert.

# 2. LITERATURÜBERSICHT

Das Erreichen intrazellulärer Kompartimente des Wirtes ist bei einer Vielzahl von mikrobiellen Krankheitserregern ein wichtiger Schritt im Infektionsprozeß. Invasive Erreger sind dadurch in der Lage, günstigere Nischen im Körper zu erreichen, in denen sie überleben, sich replizieren oder der Wirtsabwehr entgehen können (GINOCCHIO *et al.*, 1994).

Im Zuge der Infektion eines Wirtes invadieren Salmonellen nach vorangehender Adhäsion Enterozyten und M-Zellen des terminalen Ileums (JONES *et al.*, 1994; TAKEUCHI, 1967). Man glaubt, daß die Bakterien auf diese Weise die epitheliale Barriere durchdringen können, um eine systemische Besiedlung des Wirtsorganismus zu verursachen (BEHLAU & MILLER, 1993; GALÁN & CURTISS, 1989). Die Salmonellen erreichen dann tiefere Gewebeschichten der Darmwand und gelangen durch Phagozytose in das Innere von Makrophagen, in denen sie überleben und sich auch vermehren können (GALÁN & GINOCCHIO, 1994). Sie werden mit dem Blutstrom im Körper verteilt und reichern sich in Leber, Milz und anderen Organen an. Um den Mechanismus der bakteriellen Adhäsion und Invasion in epitheliale Zellen und ihre intrazelluläre Persistenz zu studieren, wurden Modellsysteme entwickelt, in denen Salmonellen nicht-professionell-phagozytische Zellkulturen invadieren (TANG *et al.*, 1993). Die Praxis hat gezeigt, daß viele der durch diese relativ einfachen *in-vitro*-Methoden erhaltenen Ergebnisse in Tiermodellen bestätigt werden können (GALÁN & GINOCCHIO, 1994). Eine Schlußfolgerung auf *in-vivo*-Ereignisse ist jedoch nur eingeschränkt möglich und sollte wenn möglich im Tiermodell überprüft werden (WATSON *et al.*, 1995; WORTON *et al.*, 1989). Als Standard-Tiermodell für die Salmonellose hat sich das Mausmodell etabliert. Mäuse reagieren auf eine orale Infektion mit vielen *Salmonella*-Serovaren mit Symptomen, die dem durch *S.*Typhi verursachten Typhus des Menschen sehr ähnlich sind. Man geht daher davon aus, daß die diesen Symptomen zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen vergleichbar sind. Dieses Tiermodell ist jedoch nur eingeschränkt aussagefähig, da Mäuse für eine Infektion mit *S.*Typhi sehr wenig empfänglich sind (SCHWAN & KOPECKO, 1997).

## 2.1 Adhäsivität von *Salmonella*

Die spezifische Bindung von bakteriellen Adhäsinen an Wirtszellrezeptoren wird Adhäsion genannt. Die Adhäsion an Wirtszellen ermöglicht es *Salmonella*-Keimen, im Darm zu verbleiben und mit den Enterozyten des Wirtes zu interagieren. Man geht davon aus, daß die Adhäsion die Voraussetzung für den Eintritt in Wirtszellen und somit ein wichtiger Virulenzmechanismus ist (FALKOW *et al.*, 1992; FINLAY *et al.*, 1988).

### 2.1.1 Erscheinungsbild der Adhäsion

Keime von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* können an alle bisher daraufhin untersuchten Zellarten adhärieren (Tabelle 17) und zwar gleichermaßen an lebende und an fixierte Zelloberflächen (FINLAY *et al.*, 1989). Die Adhäsion erfolgt jedoch nicht gleichmäßig. Vielmehr adhärieren Salmonellen im Zellkultur-Monolayer in einem mosaikartigen Erscheinungsbild. Während an einige Zellen bis zu 150 Keime adhärieren, sind an der Nachbarzelle keine adhärenten Bakterien zu sehen. Der Grund dafür ist derzeit noch unbekannt. Erklärungsansätze sind a) der sogenannte "Trittbretteffekt", also eine erhöhte Anziehungskraft bereits befallener Zellen für die Adhäsion weiterer *Salmonella*-Keime (FRANCIS *et al.*, 1992) und b) das sehr heterogene (ebenfalls mosaikartige) Muster der Oberflächen-Rezeptoren der Wirtszellen (GIANNASCA *et al.*, 1996).

Salmonellen benötigen augenscheinlich einen gewissen Zelldifferenzierungsgrad, da sie sich beispielsweise an konfluenten, aber maximal 7 Tage alten, und damit noch nicht ausdifferenzierten Caco-2-Monolayern kaum anzuheften vermögen (GIANNASCA *et al.*, 1996). Bei Kulturen aus isolierten Darmepithelzellen gibt es keine Adhäsions-Präferenz für Zellen des proximalen oder Zellen des distalen Darmabschnittes, sowie keine Bevorzugung der luminalen oder basolateralen Seite (LINDQUIST *et al.*, 1987). Auffallend ist jedoch eine Bevorzugung der M-Zellen (= membranous epithelial cells). So interagiert *S.*Typhimurium im Darmschlaufenmodell der Maus 34 mal stärker mit M-Zellen als mit normalen Epithelzellen (CLARK *et al.*, 1994). Auch für *S.*Typhi sind im Darmschlaufenmodell der Maus die M-Zellen die primäre Adhäsionsstelle (KOHBATA *et al.*, 1986). M-Zellen sind spezialisierte

Zellen, die mit den Peyerschen Platten assoziiert sind. Sie haben weniger Lysosomen als Enterozyten und wirken als antigensammelnde Zellen für die Lymphfollikel der Peyerschen Platten, in welchen dann die Immunantwort induziert wird (OWEN, 1994). Die M-Zellen tragen keine Microvilli und auch weniger Mucus und sind für die Bakterien möglicherweise deshalb besser erreichbar. Daher darf diese Bevorzugung wohl nicht automatisch als spezifischer Tropismus der Salmonellen für M-Zellen ausgelegt werden. Diese Zellpopulation muß wohl vielmehr als "Achilles-Sehne" des Wirtes angesehen werden (GALÁN *et al.*, 1993).

Der Vorgang der Adhäsion wurde schon früh in zwei Phasen unterteilt. Die sogenannte reversible Phase der Adhäsion, bei der die Bakterien durch kräftiges Waschen noch von der Zelloberfläche abzulösen sind und die irreversible Phase der Adhäsion, bei der dieses nicht mehr möglich ist (LINDQUIST *et al.*, 1987). Zur Ausbildung der irreversiblen Adhäsion ist eine kontinuierlich fortlaufende Proteinsynthese vonnöten, bei der mindestens 6 neue Proteine synthetisiert werden, während die Synthese von mindestens 7 Proteinen unterdrückt wird (LINDQUIST *et al.*, 1987). Eine Anlaufphase für die Adhäsion von ca. zwei Stunden, die als "lag-Periode" bezeichnet wird, wird durch diese hierfür notwendige Stoffwechselumstellung erklärt. Die Proteininduktion konnte bei der Reaktion mit MDCK- und HEp-2-Zellen nachgewiesen werden, aber nicht mit CHO-Zellen, woraus der Autor schließt, daß diese Induktion durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche hervorgerufen wird (FINLAY *et al.*, 1989). Man ging davon aus, daß die zwei Phasen der Adhäsion zeitlich direkt aufeinander folgen. Dazu im Widerspruch stehen mit der Videomikroskopie erhaltene Ergebnisse. Zwar lassen sich auch hier zwei Adhäsions-Phänotypen unterscheiden: Erstens der vorübergehende, "lockere" Phänotyp, bei dem das Bakterium sich über dem Anheftungspunkt bewegt und keine Veränderung der Wirtszelle hervorruft, sowie zweitens der "festere" und produktive Anheftungstyp, bei dem das Bakterium fest an der Wirtszelle anhaftet und die Invasion einleitet. Diese beiden Adhäsionstypen folgen jedoch nicht notwendigerweise direkt aufeinander, sondern sind vielmehr zwei unabhängige Ereignisse, wobei jedoch der erste, "lockere" Typ des öfteren in den zweiten, "festeren" Typ mündet (FRANCIS *et al.*, 1992).

TABELLE 17 Adhäsion verschiedener *Salmonella*-Serovare an verschiedene Wirtszelltypen

| **Salmonella-Serovar** | **experimentell bestätigte Adhäsionsfähigkeit an** | | |
|---|---|---|---|
| | **permanente Zellinien** | **Frischzellpräparate** | **Darmschleimhaut; *in-vivo*** |
| Typhimurium | Henle-407[1;2;3;4;5;6;7]<br>MDCK[2;7;8;9;10;11;12]<br>Caco-2[13;14;15]<br>HeLa[3;16;17;18;19]<br>T84[2;17;20;21;22]<br>HEp-2[2;3;8;23]<br>CHO[8]<br>TIB73[24]<br>J774[5] | Enterozyten Huhn[25]<br>Nierenepithelzellen Huhn[11]<br>Enterozyten Ratte[26]<br>Enterozyten Schwein[27] | Maus[28;29;30;31;32]<br>Eintagsküken[33]<br>Meerschweinchen[34]<br>Ratte[35]<br>Darm Rind[7]<br>Darm Maus[13;36;37;38]<br>Darm Kaninchen[39] |
| Enteritidis | Henle-407[1]<br>HeLa[40]<br>T84[22]<br>HEp-2[41] | Enterozyten Maus[42]<br>buccales Epithel Mensch[42]<br>Granulosa-Zellen Ovar Huhn[43] | Maus[40;44]<br>Eintagsküken[33;41;45]<br>Ratte[35] |
| Typhi | Henle-407[1;45]<br>MDCK[8]<br>Caco-2[46]<br>HeLa[47]<br>T84[22] | | Darm Maus[48] |
| Choleraesuis | Henle-407[1]<br>MDCK[8]<br>Caco-2[13]<br>HEp-2[8]<br>CHO[8] | Enterozyten Schwein[49] | |
| Dublin | Henle-407[7]<br>MDCK[7] | | Darm Rind[7] |
| Abortusovis | HeLa[50]<br>LK[50] | | |
| Arizonae | T84[22] | | |
| Braenderup | HeLa[17] | | |
| California | | Enterozyten Huhn[24] | |
| Gallinarum | Henle-407[1]<br>CK[51]<br>Vero[51] | | |
| Pullorum | T84[22] | | |

Referenzen zu Tabelle 17:

[1] ALTMEYER *et al.,* 1993
[2] BÄUMLER *et al.,* 1996c
[3] GALÁN *et al.,* 1992a
[4] KUSTERS *et al.,* 1993
[5] NICKERSON & CURTISS III, 1997
[6] SCHIEMANN & SHOPE, 1991
[7] WATSON *et al.,* 1995
[8] FINLAY *et al.,* 1989
[9] GINOCCHIO *et al.,* 1994
[10] LEE & FALKOW, 1990
[11] LEE *et al.,* 1996
[12] REED *et al.,* 1996
[13] FINLAY & FALKOW, 1990
[14] GIANNASCA *et al.,* 1996
[15] WELLS *et al.,* 1993a
[16] BÄUMLER *et al.,* 1996b
[17] HORIUCHI *et al.,* 1992
[18] KIHLSTRÖM & EDEBO, 1976
[19] MICHETTI *et al.,* 1994
[20] McCORMICK *et al.,* 1993
[21] McCORMICK *et al.,* 1995a
[22] McCORMICK *et al.,* 1995b
[23] MacBETH & LEE, 1993
[24] LAJARIN *et al.,* 1996
[25] CRAVEN *et al.,* 1992
[26] LINDQUIST *et al.,* 1987
[27] ISAACSON & KINSEL, 1992
[28] HOHMANN *et al.,* 1978
[29] KROGFELT *et al.,* 1996
[30] LICHT *et al.,* 1996
[31] NEVOLA *et al.,* 1985
[32] TANNOCK *et al.,* 1975
[33] PORTER & CURTISS, 1997
[34] TAKEUCHI, 1967
[35] NAUGHTON *et al.,* 1996
[36] BÄUMLER *et al.,* 1996a
[37] CLARK *et al.,* 1994
[38] JONES *et al.,* 1994
[39] WORTON *et al.,* 1989
[40] OGUNNIYI *et al.,* 1997
[41] THORNS *et al.,* 1996
[42] ASLANZADEH & PAULISSEN, 1992
[43] THIAGARAJAN *et al.,* 1996
[44] HOHMANN *et al.,* 1978
[45] GAST & BENSON, 1996
[46] TARTERA & METCALF, 1993
[47] MROCZENSKI-WILDEY *et al.,* 1989
[48] KOHBATA *et al.,* 1986
[49] NIETFELD *et al.,* 1992
[50] RUBINO *et al.,* 1993
[51] BARROW *et al.,* 1992

### 2.1.2 Fimbrienadhäsine

Alle Mitglieder der Familie der *Enterobacteriaceae* exprimieren Fimbrien oder Pili, durch die sie sich an Oberflächen des jeweiligen Wirtes anheften können (BÄUMLER & HEFFRON, 1995). Die Tabelle 18 listet die Fimbrientypen von *Salmonella* auf, deren Rolle bei der Adhäsion an verschiedene Zellen untersucht wurde. Typ-III-Fimbrien werden über ihre Tannin-sensitive Hämagglutination definiert. Der genetische Hintergrund sowie das eigentliche Adhäsin dieser Fimbrien sind nicht bekannt (BÄUMLER & HEFFRON, 1995). Das Adhäsin der Typ-I-Fimbrien wird von *fimH* kodiert (KUKKONEN *et al.,* 1993). Das Gen

*lpfD* ist in seiner Sequenz dem Gen *fimH* hochgradig homolog. Daher nimmt man an, daß *lpfD* für das Adhäsin der lpf-Fimbrien (= long polar-Fimbrien) kodiert (BÄUMLER & HEFFRON, 1995). Die Funktionen der verschiedenen Gene des *pef*-Operons (= plasmid-encoded fimbriae) sind noch nicht analysiert. Daher ist auch hier das eigentliche Adhäsin nicht bekannt (BÄUMLER *et al.*, 1997). Insgesamt zeigte sich, daß die verschiedenen Fimbrien an der Adhäsion je nach Art der untersuchten Zelle unterschiedlich beteiligt sind. BÄUMLER *et al.* schließen aus diesem Gewebetropismus, daß den Fimbrien eine wichtige Rolle beim Erreichen bestimmter Zielzellen zukommt (BÄUMLER *et al.*, 1996c).

Die Typ-III-Fimbrien von *S.*Enteritidis sind sowohl im Zellkulturmodell mit buccalen, humanen Epithelzellen, als auch im Maus-IOC (Dünndarmschlaufenmodell bei 14 Wochen alten Mäusen) an der Adhäsion beteiligt (ASLANZADEH & PAULISSEN, 1992). Für die Adhäsion von *S.*Enteritidis an HEp-2-Zellen spielen sie dagegen keine Rolle (THORNS *et al.*, 1996).

Die Bedeutung der lpf- sowie der pef-Fimbrien für die Adhäsion von *S.*Typhimurium wurde ebenfalls im Maus-IOC nachgewiesen (BÄUMLER *et al.*, 1996a,b). Die lpf-Fimbrien vermitteln speziell die Adhäsion der Keime an die Peyerschen Platten des Ileums, während die pef-Fimbrien die Adhäsion an die Enterozyten bewirken. Eine verminderte Adhäsion der *pef*-Defektmutanten an Dünndarmzellen konnte nur im Maus-IOC, nicht aber im Zellkulturmodell gezeigt werden. lpf-Fimbrien von *S.*Typhimurium sind im Zellkulturmodell nur in die Adhäsion an HEp-2-, nicht jedoch in die Adhäsion an T84-, Henle-407-, HeLa- oder MDCK-Zellen eingebunden (BÄUMLER *et al.*, 1996c).

Im Zellkulturmodell adhärieren Keime von *S.*Typhimurium mit ihren Typ-I-Fimbrien an HeLa-Zellen. Eine *fim*¯-Deletion resultiert in einer Verminderung der Adhäsion auf ca. 15 %. Diese Reduktion tritt bei der Reaktion mit HEp-2-, MDCK-, T84- oder Henle-407-Zellen nicht auf (BÄUMLER *et al.*, 1996c). Zudem wird eine Beteiligung von Typ-I-Fimbrien verschiedener *Salmonella*-Serovare an der Adhäsion sowohl an buccalen Epithelzellen (*S.*Enteritidis; ASLANZADEH & PAULISSEN, 1992) als auch an isolierten Ratten- (*S.*Typhimurium; LINDQUIST *et al.*, 1987) und Küken-Enterozyten (*S.*California; CRAVEN *et al.*, 1992) gesehen. Der Enterozytentropismus der Typ-I-Fimbrien scheint jedoch nicht nur

vom eigentlichen Adhäsin (*fimH*) determiniert zu sein, sondern wird durch andere Strukturproteine mit beeinflußt, die wie man annimmt die quaternäre Struktur entsprechend beeinflussen (THANKAVEL *et al.*, 1999).

Im Mausmodell zeigt sich, daß Typ-I-Fimbrien auf die Kolonisierung des Darmes keinen Einfluß haben (LOCKMAN & CURTISS III, 1992). Diese Diskrepanz zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Beobachtungen könnten möglicherweise durch präparative Effekte bedingt sein. Bei *in-vivo*-Untersuchungen findet keine Differenzierung zwischen der unmittelbaren Adhäsion an die Epithelzelle und der Adhäsion am aufliegenden Mucus statt. Im *in-vitro*-Testverfahren ist dieser Mucus nicht vorhanden, so daß hier nur eine Anheftung an die Wirtszellmembran quantifiziert wird. So fanden z.B. WORTON *et al.* (1989), daß im *in-vivo*-Testsystem die Adhäsivität nicht mit der Virulenz der Stämme korrelierte. Nach Präparation für eine elektronenmikroskopische Untersuchung, bei der der Mucus entfernt wurde, zeigten die virulenten Stämme jedoch eine quantitativ höhere Adhäsion (WORTON *et al*., 1989). Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob Ergebnisse von *in-vitro*-Methoden gegenüber der *in-vivo*-Zählung nicht in bestimmter Hinsicht aussagekräftiger sind.

Die Rolle der agf (thin aggregative fimbriae)-Fimbrien bei der Adhäsion ist im Einzelnen noch nicht untersucht. Zur vollen Virulenzausbildung von *S.*Typhimurium im Mausmodell ist aber eine synergistische Funktion aller vier bei diesem Serovar bekannten Fimbrien-Operone (*fim, lpf, pef und agf*) notwendig (VAN DER VELDEN *et al*., 1998). Doch auch ein vierfach mutierter *S.*Typhimurium-Stamm (*fim*$^-$, *lpf*$^-$ *pef*$^-$, *agf*$^-$) kann in hohen Dosen noch letale Infektionen im Mausmodell hervorrufen. Zudem weist er mikroskopisch sichtbare Fimbrien auf. Man geht daher davon aus, daß es neben diesen bekannten Fimbrien noch mindestens einen bislang unbekannten Fimbrientyp gibt, der für die Virulenz im Mausmodell relevant ist (VAN DER VELDEN *et al*., 1998).

TABELLE 18 Die Rolle verschiedener Fimbrientypen von *Salmonella* bei der Adhäsion an epitheliale Zellen oder Gewebekulturen

| Fimbrien-Typ | Adhäsion an epitheliale Zellen oder Gewebekultur | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | HEp-2 | T84 | Henle-407 | HeLa | MDCK | buccale Epithel-zellen Mensch | Entero-zyten Ratte | Entero-zyten Maus | Entero-zyten Huhn | PP Maus |
| Typ-I | –[1] | –[1] | –[1] | +[1] | –[1] | +[3] | +[4;5] | +[3;6] | +[7] | n.u. |
| Typ-III | –[2] | n.u. | n.u. | n.u. | n.u. | +[3] | n.u. | +[3] | n.u. | n.u. |
| lpf | +[1] | –[1] | –[1] | –[1] | –[1] | n.u. | n.u. | –[6] | n.u. | +[8] |
| pef | –[1] | –[1] | –[1] | –[1] | –[1] | n.u. | n.u. | +[6] | n.u. | –[8] |

PP = Peyersche Platten
n.u. = nicht untersucht
\+ = vermittelt Adhäsion
– = keine Rolle bei der Adhäsion

Referenzen:

[1] BÄUMLER *et al.*, 1996c
[2] THORNS *et al.*, 1996
[3] ASLANZADEH & PAULISSEN, 1992
[4] LOCKMAN & CURTISS III., 1992
[5] LINDQUIST *et al.*, 1987
[6] BÄUMLER *et al.*, 1996b
[7] CRAVEN *et al.*, 1992
[8] BÄUMLER *et al.*, 1996a

### 2.1.3 Andere Adhäsine

Peritoneal-Makrophagen der Maus binden *in vitro* und in Abwesenheit von exogenen Opsoninen an einem 44 kDa-Protein von *S.*Typhimurium. Die N-terminale Ansequenzierung über eine Länge von 15 Aminosäuren ergab eine komplette Identität mit OmpD von *S.*Typhimurium (NEGM & PISTOLE, 1998). Eine *ompD*-Mutante von *S.*Typhimurium SL 1344 zeigte im Mausmodell jedoch keine verminderte Virulenz (MEYER *et al*., 1998).

### 2.1.4 Adhäsionsrezeptoren der Wirtszelle

Ein Rezeptor, der als Adhäsionsrezeptor angesehen wird, ist der EGF-Rezeptor (=Epidermal-Growth-Factor-Receptor). Eine direkte Bindung von Salmonellen an diesen Rezeptor ist zwar nicht nachgewiesen, aber es ist bekannt, daß im Zuge einer Invasion von *S.*Typhimurium in Henle-407-Zellen eine Stimulation des EGFR erfolgt (GALÁN *et al.*, 1992a). Da die EGFR-Stimulation im allgemeinen ein Resultat einer Ligandenbindung ist (CARPENTER & COHEN, 1990), vermutet man, daß *Salmonella*-Keime an diesen Rezeptor binden (GALÁN *et al.*, 1992a). Der EGF-Rezeptor ist ein 170 kDa großes Molekül, das aus einer Polypeptidkette besteht, an die einige Oligosaccharide gebunden sind. Eine Membran-verankernde hydrophobe Sequenz trennt die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne von der zytoplasmatischen Domäne, die eine Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzt. Durch eine Liganden-Bindung erfolgt die Aktivierung dieser Tyrosin-Kinase (CARPENTER & COHEN, 1990).

Der EGF-Rezeptor kann jedoch nicht der einzige und auch nicht der bedeutendste Adhäsions-Rezeptor sein, da Zellen, die durch biochemische Manipulationen den EGFR nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, in gleichem Maße von *S.*Typhimurium invadiert werden, wie EGFR-tragende Zellen (McNEIL *et al.*, 1995).

Neben EGFR kennt man noch andere Wirtszellmoleküle, die in die Adhäsion von Salmonellen eingebunden sind. So adhärieren *Salmonella*-Stämme mit Typ-I-Fimbrien über ihr *fimH*-kodiertes Adhäsin spezifisch an α-D-Mannoside der Wirtszellglycocalix (KUKKONEN *et al.*, 1993). Darüberhinaus identifizierten GIANNASCA *et al.* an Caco-2-Zellen ein Galβ(1-3)GalNAc-Epitop, welches in der Glycocalix ihrer Mikrovilli lokalisiert ist. Es wird durch PNA (Erdnuß-Agglutinin) erkannt und scheint in die initiale Adhäsion von *S.*Typhimurium-Keimen an Caco-2-Zellen eingebunden zu sein (GIANNASCA *et al.*, 1996).

### 2.1.5 Regulation des adhäsiven Phänotyps

Man kennt eine Reihe unspezifischer Faktoren, die die Ausbildung des adhäsiven Phänotyps beeinflussen und zumeist in Zellkulturmodellen untersucht wurden. So führen eine erhöhte Hydrophobizität, ein verminderter $O_2$-Partialdruck, eine hohe Osmolarität des Mediums sowie die frühe logarithmische Wachstumsphase zur verstärkten Ausbildung des adhäsiven Phänotyps (KIHLSTRÖM & EDEBO, 1976; CRAVEN *et al*., 1992; FRANCIS *et al*., 1992; LEE & FALKOW, 1990; TARTERA & METCALF, 1993; KUSTERS *et al*., 1993). Die zugrundeliegenden Steuerungsmechanismen sind im Einzelnen jedoch noch nicht bekannt. Die Expression der lpf-Fimbrien scheint jedoch positiv mit der $Lac^+$-Phase von *S.*Typhimurium gekoppelt zu sein (NORRIS *et al*., 1998).

## 2.2 Invasivität von *Salmonella*

Die Fähigkeit von Salmonellen, in Wirtszellen einzudringen, wird als "Invasion" bezeichnet, obgleich dieser Ausdruck etwas unglücklich gewählt ist, da er eine Passivität der Zielzelle im Invasionsprozeß vermuten läßt. Es hat sich jedoch herausgestellt, daß eine Invasion von Salmonellen die aktive Mitarbeit der Wirtszelle voraussetzt (GALÁN *et al.*, 1993).

### 2.2.1 Aufbau und Funktion der *Salmonella*-Pathogenitätsinseln SPI1 und SPI2

Bisher wurde eine große Anzahl von *Salmonella*-Genen, die für die Invasion in nicht professionell phagozytierende Zellen erforderlich sind, identifiziert. Die meisten dieser Gene liegen auf einem 40 kb großen Abschnitt in der Centisom-63-Region des *Salmonella*-Chromosoms. Da der C+G-Gehalt im gesamten *Salmonella*-Genom (51 - 53 %) signifikant höher liegt als in dieser diskreten Region (41 - 43 %), nimmt man an, daß dieses DNS-Segment als Block durch horizontalen Gentransfer erworben und integriert wurde (GROISMAN & OCHMAN, 1993). Man bezeichnet die Genregion daher auch als *Salmonella*-Pathogenitäts-Insel 1 (SPI1). Der Aufbau dieser Insel, welche durch die Gene

*mutS* und *fhlA* begrenzt wird, ist in Abbildung 14 dargestellt. Dieser Bezirk kodiert für ein Typ-III-Sekretions-System, das eine supramolekulare Struktur ausbildet, die die innere und äußere Bakterienmembran umspannt (KUBORI *et al*., 1998). Dieses Sekretionssystem wird auch als Kontakt-abhängiger Typ bezeichnet, da man glaubte, daß es zu seiner Aktivierung unbedingt den Wirtszellkontakt benötigt (ZIERLER & GALÁN, 1995). Neuere Untersuchungen bei *Salmonella* Typhimurium zeigen jedoch, daß die Induktion des Sekretionssystems wirtszellunabhängig erfolgen kann. So induziert bereits die pH-Wert-Änderung des umgebenden Mediums von sauer hin zu leicht alkalisch das Typ-III-Sekretionssystem in der Centisom-63-Region von *Salmonella* (DAEFLER, 1999). Die Charakteristika des Typ-III-Exportsystems sind zum einen, daß sie zur Ausbildung ihrer vollen Funktionsfähigkeit im allgemeinen den Wirtszell-Kontakt benötigen und daß die sezernierten Zielproteine keine typische, spaltbare *sec*-abhängige Signalsequenz besitzen. Zum anderen werden zum Export dieser Proteine durch die innere und äußere Membran viele akzessorische Proteine benötigt (GALÁN & BLISKA, 1997). Das SPI1-kodierte Typ-III-Sekretionssystem der Salmonellen ist dem Flagellen-Montage-System sowie Sekretionssystemen anderer Mikroorganismen sehr ähnlich. Typ-III-Sekretionssysteme und ihre Komponenten wurden unter anderem bei den in Tabelle 19 aufgeführten Mikroorganismen gefunden.

Bei *Salmonella* wurde mittlerweile noch eine zweite Pathogenitätsinsel gefunden, die für ein Typ-III-Export-System kodiert (SPI2). Sie ist notwendig zum Überleben und zur Replikation in Wirtszellen und wird im Kapitel 2.3 näher besprochen.

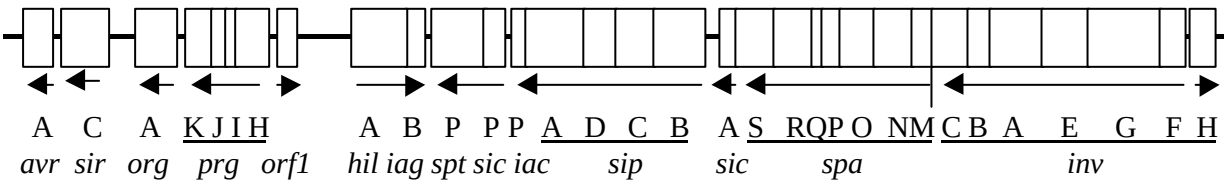



**Abbildung 14** Organisation der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1)

### 2.2.2 Bedeutung der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 für die Virulenz

Im Virulenztest mit BALB/c-Mäusen wurde die $LD_{50}$ von SPI1-Mutanten bestimmt. Mutationen innerhalb von SPI1 bewirkten bei oraler Gabe eine im Vergleich zum Wildtypstamm mindestens 50-fach erhöhte $LD_{50}$ sowie eine verminderte Kolonisierung der Peyerschen Platten, Darmepithelien und Milz. Die Mutationen beeinträchtigen jedoch nicht die Virulenz bei parenteraler Applikation. Die Bedeutung von SPI1 für die Virulenz beschränkt sich demnach auf die Phase der Invasion in Zellen der Darmschleimhaut (GALÁN & CURTISS, 1989).

### 2.2.3 Genereller Aufbau des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionssystems

Die Komponenten eines Typ-III-Sekretionsapparates lassen sich in vier Hauptgruppen einteilen. Diese Gruppen sind die strukturellen Proteine, die akzessorischen Proteine, die Regulationsproteine und die sezernierten Zielproteine (GALÁN & BLISKA, 1997). Nach bisherigen Untersuchungen sind die membrangebundenen oder membranständigen Proteine des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionsapparates von *S.enterica* in ihrer AS-Sequenz hochgradig konserviert. Zudem sind sie in ihren AS-Sequenzen den Proteinen in homologen Typ-III-Sekretions-Systemen anderer pathogener Bakterien wie *Shigella* oder *Yersinia* sehr ähnlich. Die durch diese Typ-III-Systeme sezernierten Zielproteine sind dagegen sehr unterschiedlich, selbst innerhalb der Spezies *S.enterica*. Dies könnte die Adaptation an den jeweiligen Wirt bzw. das jeweilige Zielgewebe widerspiegeln (BOYD *et al.*, 1997) und zugleich ein Erklärungsansatz sein, warum die Invasionsmechanismen unterschiedlicher Bakterien, wie *Shigella* und *Salmonella* trotz hoher Verwandtschaft der beteiligten Faktoren und Gene doch so grundsätzliche Unterschiede aufweisen (FINLAY & FALKOW, 1989; SANSONETTI 1994; OCHMAN & GROISMAN, 1995).

### 2.2.4 Strukturelle Komponenten des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretions-Systems

Die strukturelle Kernkomponente des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionsapparates wird von mindestens neun hochkonservierten Proteinen gebildet. Die Lokalisation dieser Proteine in der Bakterienzelle sowie homologe Proteine anderer Bakterien sind in Tabelle 19 aufgelistet. In Tabelle 21 sind wichtige Merkmale dieser Proteine zusammengefaßt. Fünf dieser Proteine (InvA, SpaP, SpaQ, SpaR und SpaS) werden an der inneren Membran der Bakterienzelle vermutet, wo sie eine Plattform für die Sekretions-Zielproteine bilden, die zur Translokation gebracht werden sollen (GALÁN & BLISKA, 1997). Eines dieser Proteine an der inneren Membran ist das bereits 1989 entdeckte InvA (GALÁN & CURTISS, 1989). Es enthält acht hydrophobe Domänen, von denen man annimmt, daß sie die innere Membran durchziehen. Das hydrophile carboxyterminale Ende von InvA ragt wahrscheinlich ins Zytoplasma (GALÁN *et al.,* 1992b). InvA ist dem Protein MxiA von Shigellen (membrane expression of IpaA) nicht nur strukturell sehr ähnlich, sondern auch in seiner Funktion. So konnte ein künstlich durch eine *invA*-Mutation herbeigeführter Invasionsdefekt bei *Salmonella* durch Komplementierung mit *mxiA* behoben werden (GINOCCHIO & GALÁN, 1995).

Mindestens vier Proteine (InvG, InvH, PrgH und PrgK) bilden den Teil des Sekretionsapparates, der der äußeren Membran zugeordnet wird. Man nimmt an, daß sie beim Transport der Zielproteine durch diese Membran assistieren. InvG bildet eine ringförmige Struktur in der äußeren Membran, deren Durchmesser innen ca. 7 nm und außen ca. 15 nm beträgt (CRAGO & KORONAKIS, 1998). InvH ist ein Lipoprotein und notwendig zum richtigen Einbau von InvG in die äußere Membran (DAEFLER & RUSSEL, 1998). Auch InvH befindet sich in der äußeren Membran, scheint jedoch mit InvG keinen stabilen Komplex zu bilden (CRAGO & KORONAKIS, 1998). InvG gehört aufgrund seiner AS-Sequenz zu der PulD-Proteinfamilie der Protein-Translokatoren. Mitglieder dieser Familie spielen eine kritische Rolle beim Export und der Sekretion von Virulenzfaktoren gram-negativer Bakterien oder bei der Formation supramolekularer Strukturen wie z.B. filamentösen Bakteriophagen-Kapsiden (KANIGA *et al.,* 1994). Die beiden anderen Proteine an der äußeren Membran (PrgH und PrgK) zeigen Sequenz-Motiv-Charakteristika von bakteriellen Lipoproteinen.

Das bereits 1989 entdeckte InvC (GALÁN & CURTISS, 1989) ist in seiner Sequenz homolog zu Vertretern der $F_0F_1$-ATPase-Proteinfamilie und weist zudem eine signifikante ATPase-Aktivität auf. Man nimmt daher an, daß es zur Versorgung des Protein-Export-Apparates mit Energie beiträgt (EICHELBERG *et al.*, 1994).

### 2.2.5 Akzessorische Proteine des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionssystems

Zusätzlich zu den strukturellen Komponenten des SPI1-Translokationsapparates gibt es noch mehrere akzessorische Proteine, die für den effizienten Transport und/oder die Funktion der sezernierten Proteine notwendig sind (SicA, SicP, SpaM und IacP; Tabelle 19, Tabelle 21).

SicA und SicP sind Chaperone (KANIGA *et al.*, 1995b; FU & GALÁN, 1998). Chaperone sind Proteine, die bestimmte Zielproteine im bakteriellen Zytoplasma stabilisieren und eine vorzeitige Zusammenlagerung oder einen vorzeitigen Abbau verhindern. Zielproteine von SicA sind vermutlich SipB und SipC (KANIGA *et al.*, 1995b). SicP ist ein spezifisches Chaperon für SptP (FU & GALÁN, 1998b). Auch SpaM zeigt einige strukturelle Ähnlichkeiten mit Typ-III-Chaperonen. Es ist daher möglich, daß auch SpaM als Chaperon wirkt, z.B. für SpaN und SpaO (COLLAZO & GALÁN, 1997a).

IacP zeigt extensive Sequenzhomologien mit verschiedenen Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) und ist daher wahrscheinlich in die posttranslationale Modifikation eines bisher noch nicht identifizierten sezernierten Zielproteins eingebunden (KANIGA *et al.*, 1995a).

TABELLE 19 Komponenten des SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionssystems von *Salmonella* und strukturhomologe Proteine anderer bakterieller Krankheitserreger (nach GALÁN & BLISKA, 1997)

| *Salmonella* subsp. | *Shigella* subsp. | *Yersinia* subsp. | *P. solanacearum* | *P. syringae* | *X. campestris* | Flagellen-Montage | zelluläre Lokalisation[a] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| InvA | MxiA | LcrD | HrpO | HrpI | HrpC2 | FlhA | innere Membran |
| SpaP | Spa24 | YscR | HrpT | HrpW | ORF2 | FliP | innere Membran |
| SpaQ | Spa9 | YscS | HrpU | HrpO | — | FliQ | innere Membran |
| SpaR | Spa29 | YscT | HrpC | HrpX | HrpB8 | FliR | innere Membran |
| SpaS | Spa40 | YscU | HrpN | HrpY | — | FlhB | innere Membran |
| InvG | MxiD | YscC | HrpA | HrpH | HryA1 | — | äußere Membran |
| InvH | — | — | — | — | — | — | äußere Membran |
| PrgH | MxiG | — | — | — | — | — | äußere Membran |
| PrgK | MxiJ | YscJ | HrpI | HrpC | HrpB3 | FliF | äußere Membran |
| InvE | MxiC | LcrE/YopN | — | — | — | — | unbekannt |
| InvB | Spa15 | — | — | — | — | FliH | unbekannt |
| InvC | Spa47 | YscN | HrpE | HrpJ4 | HrpB6 | FliI | unbekannt |
| SpaO | Spa33 | YscQ | HrpQ | HrpU | — | FliN/FliY | extrazellulär |
| IagB | IpgF | — | — | — | — | — | unbekannt |
| PrgI | MxiH | YscF | — | — | — | — | unbekannt |
| PrgJ | MxiI | — | — | — | — | — | unbekannt |
| OrgA | MxiK | — | — | — | — | — | unbekannt |
| SicA | IpgC | SycD/LcrH | — | — | — | — | zytoplasmatisch |
| SicP | IpgA | — | — | — | — | — | zytoplasmatisch |
| IacP | OrfX | — | — | — | — | — | unbekannt |
| Orf1 | — | — | — | — | — | — | unbekannt |

a: die Lokalisation des Proteins in der Bakterienzelle basiert auf experimentellen Daten von mindestens einem Vertreter der genannten Spezies

—: homologes Protein ist nicht bekannt

### 2.2.6 Sezernierte Zielproteine des Typ-III-Sekretionsapparates

Bislang wurden bei Salmonellen 13 verschiedene Proteine identifiziert, die über einen Typ-III-Sekretions-Apparat sezerniert werden. Acht dieser Proteine werden in SPI1, die fünf anderen (SopA, SopB, SopC, SopD und SopE) auf verschiedenen anderen Stellen des *Salmonella*-Chromosoms kodiert. Die Zielproteine weisen z.T. Homologien zu Typ-III-sezernierten Proteinen anderer Bakterien auf (Tabelle 20). Die sezernierten Proteine können in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden (COLLAZO & GALÁN, 1996; Tabelle 21). In die erste Gruppe fallen Proteine, die für die Sekretion durch das Typ-III-Sekretions-System benötigt werden [SpaN (=InvJ) und SpaO]. Mutationen in *spaN* oder *spaO* verhindern den Export aller anderen bis dato bekannten Proteine, die über den SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionsapparat ausgeschleust werden (COLLAZO & GALÁN, 1996). Diese beiden Proteine zeigen nur eine recht limitierte Ähnlichkeit zu funktional verwandten Proteinen anderer Mikroorganismen, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß sie in Reaktionen eingebunden sind, die für *Salmonella* spezifisch sind (GALÁN & BLISKA, 1997).

Die zweite Gruppe der sezernierten Proteine besteht aus Faktoren, die den Sekretionsprozeß an sich modulieren können. In diese Gruppe fällt SipD. Mutationen in *sipD* führen zu einer verstärkten Sekretion der anderen Sip-Proteine (KANIGA *et al.*, 1995a).

Die dritte Gruppe wird von Proteinen gebildet, die als Kandidaten für Effektormoleküle in Frage kommen. Dazu gehören SipA, SipB und SipC sowie SptP und AvrA (KANIGA *et al.*, 1995a,b; 1996; HARDT & GALÁN, 1997). Die Sequenzanalyse von SipB identifizierte zwei mögliche transmembranale Regionen in einer zentralen Domäne des Proteins. Diese Domäne ist zu 65 % identisch mit dem homologen Protein von Shigella (IpaB) und auch in der RTX-Proteinfamilie der porenbildenden Toxine vorhanden (KANIGA *et al.*, 1995b). Dieses könnte ein Hinweis auf eine porenbildende Funktion im Rahmen der Induktion von Wirtsreaktionen sein, beispielsweise durch Bildung eines Ionenkanals in der Wirtszellmembran (GALÁN & BLISKA, 1997). Die den SipB und SipC-Proteinen homologen *Shigella*-Proteine IpaB und IpaC bilden Komplexe im Kulturmedium (MÉNARD *et al.*, 1994). Dieses deutet auf eine mögliche Rolle von SipB und SipC bei der Bildung der Invasomen (s. unter 2.2.8) hin (KANIGA *et al.*, 1995b). Die Exprimierung von Rezeptor-Chimären auf der

Wirtszelloberfläche, die den carboxyterminalen Teil von SipB oder den aminoterminalen Teil von SipC enthalten, blockiert die Salmonellen-Invasion. Die Funktion von SipB und SipC ist demnach kompetitiv hemmbar. Damit sind SipB und SipC als direkte Modulatoren der Invasion anzusehen (CARLSON & JONES, 1998).

AvrA und SptP werden in die Zielzelle transloziert. SptP ist eine Tyrosin-Phosphatase, die in der Wirtszelle reversibel das Zytoskelett zerstört (FU & GALÁN, 1998a). SptP ist zur vollen Virulenzausbildung im Mausmodell notwendig, nicht aber zur Ausbildung des invasiven Phänotyps in der Zellkultur (MIRAS *et al.*, 1995). Die Funktion von AvrA ist unbekannt. Es ist weder zur Invasion noch zur vollen Virulenzausbildung im Mausmodell notwendig. Zudem ist es im Genom einzelner *Salmonella*-Serovare nicht vorhanden, wie z.B. *S.*Typhi und *S.*Choleraesuis (HARDT & GALÁN, 1997).

Als weitere mögliche Effektormoleküle kommen die außerhalb der Centisom-63-Region kodierten Sop-Proteine in Frage (Tabelle 22). Es handelt sich um fünf sezernierte Proteine (SopA-SopE), die im Kulturmedium filamentöse Aggregate bilden. Die Sop-Proteine könnten also ebenfalls an der Bildung von Invasomen (s. unter 2.2.8) beteiligt sein (WOOD *et al.*, 1996). Bislang wurde nur SopE näher charakterisiert. Es wird durch einen temperenten Bakteriophagen kodiert und ist nicht in allen *Salmonella*-Serovaren vorhanden (HARDT *et al.*, 1998). Im Zellkulturmodell wird SopE von extrazellulär gelegenen Bakterien über einen *sip*-abhängigen Mechanismus in HeLa-Zellen transloziert. Obgleich auch SopE ohne Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz sezerniert wird, steht der Beweis, daß es durch das SPI1-kodierte Typ-III-Sekretionssystem exportiert wird, noch aus (WOOD *et al.*, 1996). Signifikante Sequenzhomologien zu Proteinen anderer Bakterien wurden in den Sequenzdatenbanken GenBank und EMBL nicht gefunden (WOOD *et al.*, 1996).

TABELLE 20 Zielproteine des SPI1-kodierten Typ-III-Sektretionssystem von *Salmonella* und strukturhomologe Proteine anderer bakterieller Krankheitserreger (nach GALÁN & BLISKA, 1997)

| *Salmonella* subsp. | *Shigella* subsp. | *Yersinia* subsp. | *P. solana-cearum* | *P. syringae* | EPEC |
|---|---|---|---|---|---|
| SipA | IpaA | YopE | PopA1 | HrpZ | EspA |
| SipB | IpaB | YopH (Yop51) | — | — | EspB(EaeB) |
| SipC | IpaC | YopQ (YopK) | — | — | — |
| SipD | IpaC | YopB | — | — | — |
| InvJ | VirA | YopD | — | — | — |
| SpaO | IpgF | YopM | — | — | — |
| SptP | — | YpkA (YopO) | — | — | — |
| AvrA | — | YopJ | — | — | — |
| SopA | — | — | — | — | — |
| SopB | — | — | — | — | — |
| SopC | — | — | — | — | — |
| SopD | — | — | — | — | — |
| SopE | — | — | — | — | — |

— : homologes Protein ist nicht bekannt

### 2.2.7 Regulation der Invasion

Die Regulation der Invasion von *Salmonella* scheint *in vitro* von mehreren Umweltfaktoren beeinflußt zu werden. Eine geringe Sauerstoffspannung, hohe Osmolarität des Mediums, die späte logarithmische Wachstumsphase sowie hohe $Mg^{2+}$-Konzentrationen sind dabei invasionsfördernd (ERNST *et al.*, 1990; GALÁN & CURTISS, 1990; LEE & FALKOW, 1990; FRANCIS *et al.*, 1992; TARTERA & METCALF, 1993; GROISMAN, 1998). Der Mechanismus, durch den Salmonellen diese Umweltbedingungen erfassen und die Signalkaskade, mit der sie den invasiven Phänotyp exprimieren, ist noch nicht hinreichend

erforscht. Die Gene *sirA* und *sirC* (s. Tabelle 22) scheinen jedoch eine Schlüsselrolle zu spielen. SirA gehört zur FixJ-Subfamilie von transkriptionalen Aktivatoren. Mitglieder dieser Subfamilie haben wegen fehlender transmembranalen Domänen keine sensorische Kompetenz, sind jedoch Teil von zwei-Komponenten-Regulationssystemen. *sirA* wird daher möglicherweise über eine bislang unbekannte Sensor-Kinase aktiviert (die zweite Komponente), die bestimmte Umweltveränderungen wahrnehmen und in ein Signal verarbeiten kann (JOHNSTON *et al.,* 1996). SirC gehört zur AraC-Familie von transkriptionalen Aktivatoren. *sirC* wird durch SirA aktiviert, zeigt jedoch auch eine basale, SirA-unabhängige Aktivität, die durch Umweltsignale reguliert wird (RAKEMAN *et al*., 1999)

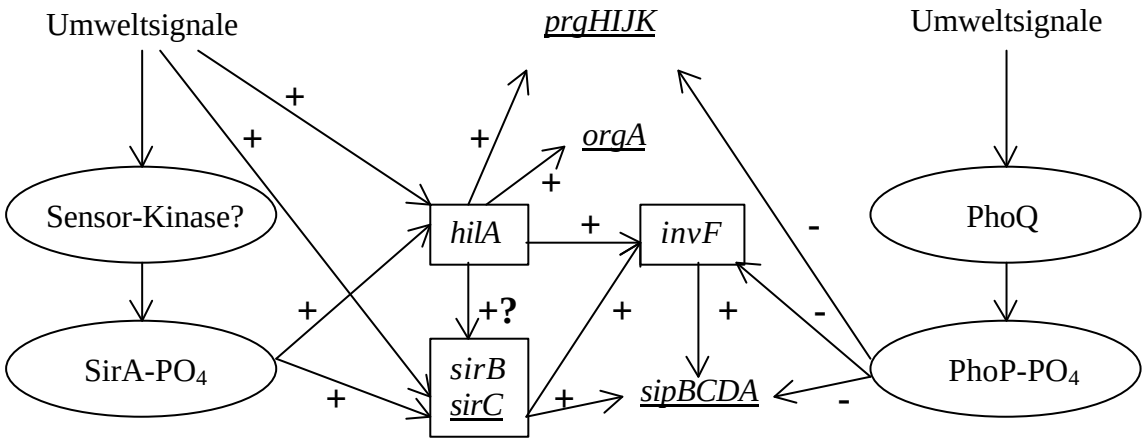



**Abbildung 15** Schema der Regulation bei der Expression des invasiven Phänotyps von *S.*Typhimurium (nach JOHNSTON *et al.,* 1996 u. RAKEMAN *et al*., 1999)

Erläuterung zu Abbildung 15:

SirA aktiviert die *hilA*- und *prgHIJK*-Transkription sowie die Transkription der Gene im *sipBCDA*-Operon. SirA ist notwendig zur vollwertigen Invasion der Salmonellen in epitheliale Zellen (JOHNSTON *et al.,* 1996). SirC (s. Tabelle 21) hat eine geringere Rolle bei der Invasivität, kooperiert jedoch mit SirA. *sirA* und *sirC* aktivieren die Invasion sowohl über *hilA* als auch *hilA*-unabhängig. SirB (s. Tabelle 22) ist zur Ausbildung des invasiven Phänotyps nicht notwendig, wird jedoch zur maximalen Expression von *sirC* benötigt. SirB

ist allem Anschein nach ein Transkriptionsaktivator, der jedoch keiner bisher bekannten Familie zuzuordnen ist (RAKEMAN *et al*., 1999).

Das Gen *hilA* kodiert für ein Mitglied der OmpR/ToxR-Proteinfamilie der transkriptionellen Aktivatoren und aktiviert direkt die Transkription von *invF, orgA* und *prgHIJK* (BAJAJ *et al.,* 1996).

Das Gen *invF* wiederum kodiert für einen transkriptionalen Regulator aus der AraC-Proteinfamilie (KANIGA *et al.,* 1994). InvF aktiviert die Transkription der Gene im *sipBCDA*-Operon (JOHNSTON *et al.,* 1996). Inwieweit HilA auch direkt die Transkription dieser Gene beeinflussen kann, ist unklar.

Das zwei-Komponenten-Regulationssystem PhoP/Q (s. Tabelle 22) ist ein negativer Regulator der Invasion (PEGUES *et al.,* 1995). PhoQ ist eine Sensor-Kinase, die auf Umweltveränderungen (wie Absenkung des pH-Wertes oder einen Umgebungswechsel durch Eintritt in einen Makrophagen), mit Autophosphorylierung und Transfer des Phosphats auf den Regulator PhoP reagiert. Die negative Invasions-Regulation zeigt sich auf verschiedenen Ebenen der Regulationskaskade und zwar in einer Hinabregulierung der Expression von *prgHIJK, sipBCDA*, sowie *invF* (BEHLAU & MILLER, 1993; PEGUES *et al.,* 1995).

### 2.2.8 Induktion der Protein-Sekretion und Invasomen-Bildung

Die Induktion der Protein-Sekretion über den SPI1-kodierten Typ-III-Sekretionsapparat geschieht durch Kontakt mit der Wirtszelle. Diese Stimulation benötigt keine *de-novo*-Proteinsynthese und kann auch durch einen Faktor in bovinem Kälberserum hervorgerufen werden (ZIERLER & GALÁN, 1995). Zur Aufrechterhaltung des invasiven Phänotyps bedarf es jedoch der kontinuierlichen Protein-Synthese (MacBETH & LEE, 1993). Der Kontakt von Salmonellen mit Zellkulturen führt zur Bildung von Oberflächenstrukturen auf den Bakterien, die "Invasomen" genannt werden (GINOCCHIO *et al.,* 1994). Diese Invasomen sind aus kurzlebigen Pilus-ähnlichen Projektionen aufgebaut, die schnell von der Bakterienoberfläche abgelöst werden. Sie haben einen Gesamtdurchmesser von ca. 60 nm und sind ca. 0,3 - 1 µm

lang. Die Bildung und Ablösung dieser Invasomen sind vom Typ-III-Sekretionsapparat abhängig und erfordern keine *de-novo*-Proteinsynthese (GINOCCHIO *et al.,* 1994). Die Rolle der Invasomen ist unklar. Ihre Kurzlebigkeit schließt jedoch eine Rolle im physikalischen Prozeß des "Attachments" aus. Vielmehr ist zu vermuten, daß es sich um Strukturen handelt, die aus sezernierten Zielproteinen des Typ-III-Sekretionssystems gebildet werden. Bei diesen Zielproteinen könnte es sich um SipB, SipC, sowie die 5 Sop-Proteine (SopA-SopE) handeln (KANIGA *et al.,* 1995b; WOOD *et al.,* 1996) Die Zusammenlagerung zu Invasomen könnte die Voraussetzung dafür sein, daß die Proteine Signalkompetenz erlangen. Die Invasomen könnten jedoch auch eine Organelle repräsentieren, die in die Translokation von Bakterienproteinen in die Wirtszelle eingebunden ist (GALÁN & BLISKA, 1997).

TABELLE 21 (Teil 1 von 4) In der *Salmonella*-Centisom-63-Region (SPI1) kodierte Proteine

| Protein | Herkunft der Bezeichnung | MG (in kDa) | Struktur / Homologie | Rolle[a] bei der Invasion | (vermutete) Funktionen[b] | Referenz[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AvrA | Avirulence gene | 32 | keine Signalsequenz | – | | 1 |
| SirC | *Salmonella* invasion regulator | ? (780 bp) | Mitglied der AraC-Familie der transkriptionellen Regulatoren | + | aktiviert in Koordination mit SirA den invasiven Phänotyp *hilA*-abhängig und *hilA*-unabhängig | 2 |
| OrgA | Oxygen regulated gene | 48 | hydrophiles Protein ohne hydrophobe Regionen | + | | 3 |
| PrgH | PhoP repressed gene | 44 | Sequenzcharakteristika bakterieller Lipoproteine | + | notwendig zur Sip-Sekretion | 4;5;6 |
| PrgK | " | 28 | Sequenzcharakteristika bakterieller Lipoproteine | + | notwendig zur Sip-Sekretion | 4;5;6 |
| PrgI,J | " | 9;11 | keine Signalsequenz oder stark hydrophobe Regionen | + | notwendig zur Sip-Sekretion | 6 |
| Orf1 | Open reading frame | 17 | keine Signalsequenz oder stark hydrophobe Regionen | n.u. | | 5 |
| HilA | Hyperinvasive locus | 60 - 63 | Mitglied der OmpR/ToxR-Proteinfamilie transkriptioneller Aktivatoren | + | aktiviert die Expression verschiedener Gene (incl. *prgHIJK, sipA* u.*sipC, invF* und *orgA*) | 7;8 |
| IagB | Invasion-associated gene | 18 | | + | | 9 |

TABELLE 21 (Teil 2 von 4) In der *Salmonella*-Centisom-63-Region (SPI1) kodierte Proteine

| Protein | Herkunft der Bezeichnung | MG (in kDa) | Struktur / Homologie | Rolle[a] bei der Invasion | (vermutete) Funktionen[b] | Referenz[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SptP | *Salmonella*-protein-tyrosine-phosphatase | 60 | carboxyterminal homolog zu katalytischen Domänen anderer Protein-Tyrosin-Phosphatasen | – | wird in die Wirtszelle transloziert und zerstört dort reversibel das normale Erscheinungsbild des Aktin-Zytoskeletts | 10;11 |
| SicP | *Salmonella* invasion chaperone | 13 | α-Helix | – | spezifisches Chaperon für SptP | 12 |
| IacP | Invasion-associated ACP (Acyl-Carrier-Protein) | 9 | extensive Sequenzhomologien mit verschiedenen ACPs | n.u. | lipidöse Modifikation eines noch nicht bekannten Zielproteins? | 13 |
| SipA | *Salmonella* invasion protein | 80 | | – | nicht bekannt,<br>kein Virulenzfaktor im Mausmodell | 13 |
| SipB | " | 68 | zwei mögliche transmembranale Regionen | + | Bildung von Invasomen?<br>Bildung eines Ionenkanals in der Zielzellmembran? | 14 |
| SipC | " | 41 | keine Signalsequenzen oder transmembranale Regionen | + | Effektormolekül?<br>Bildung von Invasomen? | 14 |
| SipD | " | 37 | keine Signalsequenzen oder transmembranale Regionen | + | Sekretionsmodulator verschiedener Proteine (incl. SipA, SipB und SipC) | 13 |
| SicA | *Salmonella* invasion chaperone | 19 | homolog zu Chaperonen (z.B. IpgC von *Shigella*) | + | Chaperon zur Stabilisierung von Proteinen (incl. SipB und SipC) | 14;15 |

TABELLE 21 (Teil 3 von 4) In der *Salmonella*-Centisom-63-Region (SPI1) kodierte Proteine

| Protein | Herkunft der Bezeichnung | MG (in kDa) | Struktur / Homologie | Rolle[a] bei der Invasion | (vermutete) Funktionen[b] | Referenz[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SpaS | Surface presentation of antigen | | N-term. Motivähnlichkeit mit Energie-Transport-Proteinen von Mitochondrien | + | strukturelle Komponente des Export-Systems an der inneren Membran? | 16 |
| SpaR | " | | Protein mit hydrophoben Regionen | + | strukturelle Komponente des Export-Systems an der inneren Membran? | 15 |
| SpaQ =InvM | " | | mindestens zwei mögliche transmembranale Regionen | + | strukturelle Komponente des Export-Systems an der inneren Membran? | 15 |
| SpaP =InvL | " | | mindestens vier mögliche transmembranale Regionen | + | strukturelle Komponente des Export-Systems an der inneren Membran? | 15;16 |
| SpaO =InvK | " | | | + | Export notwendig zur Sekretion anderer Proteine (incl. SipABCD und SptP) | 17 |
| SpaN =InvJ | " | 36 | keine Signalsequenzen oder transmembranale Regionen | + | Export notwendig zur Sekretion anderer Proteine (incl. SipABCD und SptP). Rolle bei der Invasomen-Bildung | 18 |
| SpaM =InvI | " | 18 | coiled-coil-ähnl. Struktur (= 2 - 3 parallele α-Helices) | + | Chaperon für SpaN und SpaO? | 15;18 |

TABELLE 21 (Teil 4 von 4) In der *Salmonella*-Centisom-63-Region (SPI1) kodierte Proteine

| Protein | Herkunft der Bezeichnung | MG (in kDa) | Struktur / Homologie | Rolle[a] bei der Invasion | (vermutete) Funktionen[b] | Referenz[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| InvC =SpaL | Invasion protein | 47 | Homologie zur $F_0F_1$-ATPase-Proteinfamilie | + | Bereitstellung von Energie für den Typ-III-Protein-Export-Apparat? | 19;20 |
| InvB | " | 15 | | – | | 19;20 |
| InvA | " | 54 | aminoterminal acht hydrophobe Regionen und hydrophiles carboxyterm. Ende | + | Bildung eines Proteinkanals durch die innere Membran | 19;21 |
| InvE | " | 43 | | + | regulatorische Funktion? | 15;22 |
| InvG | " | 62 | Homologie zur PulD-Proteinfamilie von prokaryontischen Translokasen | + | ringförmige Kanalbildung durch die äußere Membran; Ringdurchmesser innen ca. 7 nm, außen ca. 15 nm | 23;24 |
| InvF | " | 24 | Homologie zur AraC-Proteinfamilie von Transkriptionsregulatoren | + | Expressionsregulation von Invasionsgenen | 23 |
| InvH | " | 16 | Polypeptid mit Signalsequenz | + | notwendig zur Lokalisierung von InvG in der äußeren Membran | 25;26 |

Legende im Anschluß an Tabelle 22

TABELLE 22 (Teil 1 von 2) *Salmonella*-Invasions-assoziierte Proteine, die durch Gene außerhalb der Centisom-63-Region (SPI1) kodiert werden

| **Protein** | **Herkunft der Bezeichnung** | **Genlocus** | **Molekular-gewicht (in kDa)** | **Struktur / Homologie** | **Rolle[a] bei der Invasion** | **(vermutete) Funktionen[b]** | **Refe-renz[c]** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rck | Resistance of complement-mediated killing | Virulenzplasmid | 17 | 8 transmembranale Regionen, homolog zu einer OmP-Familie | + | | 27 |
| SopE | *Salmonella* outer proteine | chromosomal | 30 | kodiert von einem kryptischen Bakteriophagen | + | Bildung von Invasomen? Effektormolekül? Wird über *sip*-abhängigen Mechanismus in die Zielzelle translokiert | 28;29 |
| SopA,B SopC,D | " | | 80;60;54;45 | | n.u. | Bildung von Invasomen? Effektormoleküle? | 28 |
| SirA | *Salmonella* invasion regulator | chromosomal (Centisom 42,4) | ? (234 AS) | homolog zur FixJ-Proteinfamilie von Transkriptions-Aktivatoren | + | Aktivierung der *hilA* und *prgHIJK*-Transkription sowie der Sip-Sekretion | 30 |
| SirB | " | chromosomal (Centisom 40,2) | ? | | – | notwendig zur maximalen Expression von *sirC* | 2 |

TABELLE 22 (Teil 2 von 2) *Salmonella*-Invasions-assoziierte Proteine, die durch Gene außerhalb der Centisom-63-Region (SPI1) kodiert werden

| **Protein** | **Herkunft der Bezeichnung** | **Genlocus** | **Molekular-gewicht (in kDa)** | **Struktur / Homologie** | **Rolle[a] bei der Invasion** | **(vermutete) Funktionen[b]** | **Refe-renz[c]** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| PhoP | non-specific acid-phosphatase regulator | chromosomal (Centisom 27,4) | 26 | keine transmembranalen Segmente aber eine regulatorische Region | – | Regulator: im aktivierten Status Transkriptions-hemmung von *prgHIJK*, *hilA* und *sipABCD* | 5;30; 31 |
| PhoQ | " | chromosomal (Centisom 27,4) | 57 | zwei transmembranale Regionen und dazwischen eine wohl periplasmatisch gelegene Domäne | – | Sensor-Kinase: reagiert auf Umweltveränderungen mit Autophosphorylierung und Aktivierung des Regulators PhoP | 5;30; 32 |

Legende s. nächste Seite

Legende zu Tabelle 21 und Tabelle 22:

a: + : notwendig zur Invasion im Zellkulturmodell
– : nicht notwendig zur Invasion im Zellkulturmodell
n.u. : nicht untersucht

b: ohne "?" : im Zellkulturmodell gezeigt
mit "?" : unbewiesene Schlußfolgerungen

c: Liste der Referenzen:

1: HARDT & GALÁN, 1997
2: RAKEMAN *et al.*, 1999
3: JONES & FALKOW, 1994
4: BEHLAU & MILLER, 1993
5: PEGUES *et al.*, 1995
6: HUECK *et al.*, 1995
7: LEE *et al.*, 1992
8: BAJAJ *et al.*, 1995
9: MIRAS *et al.*, 1995
10: KANIGA *et al.*, 1996
11: FU & GALÁN, 1998a
12: FU & GALÁN, 1998b
13: KANIGA *et al.*, 1995a
14: KANIGA *et al.*, 1995b
15: COLLAZO & GALÁN, 1997b
16: GROISMAN & OCHMAN, 1993
17: GALÁN & BLISKA, 1997
18: COLLAZO *et al.*, 1995
19: GALÁN & CURTISS, 1989
20: EICHELBERG *et al.*, 1994
21: GALÁN *et al.*, 1992b
22: GINOCCHIO *et al.*, 1992
23: KANIGA *et al.*, 1994
24: CRAGO & KORONAKIS, 1998
25: ALTMEYER *et al.*, 1993
26: DAEFLER & RUSSEL, 1998
27: HEFFERNAN *et al.*, 1992
28: WOOD *et al.*, 1996
29: HARDT & GALÁN, 1998
30: JOHNSTON *et al.*, 1996
31: GROISMAN *et al.*, 1989
32: VÉSCOVI *et al.*, 1994

### 2.2.9 Die Antworten der Wirtszelle

Der Invasionsprozeß von *Salmonella* ist ein sehr komplexes Geschehen, welches in verschiedenen Wirtszellarten auf unterschiedliche Art und Weise abläuft (GALÁN, 1996). Gemeinsam ist bei allen Zellarten, daß es im Zuge der Reaktionskette in der Wirtszelle zu einer $Ca^{2+}$-Mobilisierung, einer Aktivierung der MAP-Kinase und zur sogenannten "Ruffle"-Bildung an der Zellmembran kommt. Diese "Ruffle"-Bildung ist verbunden mit einer lokal erhöhten Phagozytose-Aktivität der nicht professionell phagozytierenden Zelle und mündet in eine Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle. Die "Ruffles" sind dabei morphologisch und nicht biochemisch oder funktional definiert. Es handelt sich um filamentöse Veränderungen des Wirts-Zytoskeletts, wie sie z.B. auch durch Wachstumsfaktoren, Mitogene oder

Onkogene hervorgerufen werden. Anders als bei den "Ruffles" durch diese Stimuli bezieht das durch *Salmonella*-Keime hervorgerufene "Ruffling" nicht die gesamte Zelloberfläche mit ein, sondern bleibt lokalisiert an der Stelle der Bakterien-Wirtszell-Interaktion (FRANCIS *et al.*, 1993). Das "Ruffling" erscheint als eine etwa "doughnut"-förmige Zellausstülpung, die immer mit mindestens einem Bakterium assoziiert ist. In diesen "Ruffles" finden sich große Akkumulationen von Zytoskelett-assoziierten Proteinen wie Aktin, α-Aktinin, Tropomyosin und Ezrin (FINLAY & RUSCHKOWSKI, 1991). Die Formation dieser filamentösen, aktinreichen Strukturen korreliert mit dem Eintritt der Bakterienzelle in die Wirtszelle. Nach erfolgter Invasion verschwinden diese Strukturen wieder. Die Reaktionskaskade, die durch die Anheftung von Salmonellen in der Zelle ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig geklärt und zudem abhängig von der Art der Wirtszelle (GALÁN, 1996). GALÁN *et al.* fanden, daß es im Zuge der Invasion von *Salmonella*-Keimen in Henle-407-Zellen zu einer Stimulation des EGF-Rezeptors kommt (GALÀN *et al.*, 1992a). Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß bei der Invasion von Salmonellen in diese Zellen $Ca^{2+}$ vor allem aus der extrazellulären Umgebung in die Zellen einströmt, da sich die Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}$-Konzentration signifikant reduziert, wenn man dem Versuchsmedium das Calcium entzieht. Zudem war die Aktivierung der Phospholipase $A_2$ ($PLA_2$) essentiell, da die Vorinkubation mit $PLA_2$-Inhibitoren die Salmonellen-Invasion signifikant zu hemmen vermochte. Auch bestimmte Arachidonsäure-Metaboliten waren zur Invasion der Salmonellen erforderlich. Diese entstehen durch enzymatischen Abbau der Arachidonsäure über den Lipoxygenase-Weg. Die Vorinkubation mit Lipoxygenase- nicht jedoch mit Cycloxygenase-Inhibitoren verhinderte die Invasion von Salmonellen. Eine besondere Rolle unter diesen Abbauprodukten spielt hier anscheinend das Leukotrien $D_4$ ($LTD_4$), welches in der Lage ist, den invasiven Phänotyp einer *invA*-Defektmutante von *S.*Typhimurium zu retten. Der Mechanismus, durch den die Stimulation des EGF-Rezeptors eine Aktivierung der $PLA_2$ bewirkt, ist unklar. Da jedoch zeitgleich eine Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) erfolgt, kommt diese als möglicher Mediator in Frage (PACE *et al.*, 1993). Das hypothetische Modell der durch *Salmonella*-Keime ausgelösten Signalkaskade in Henle-407-Zellen ist in Abbildung 16 dargestellt.

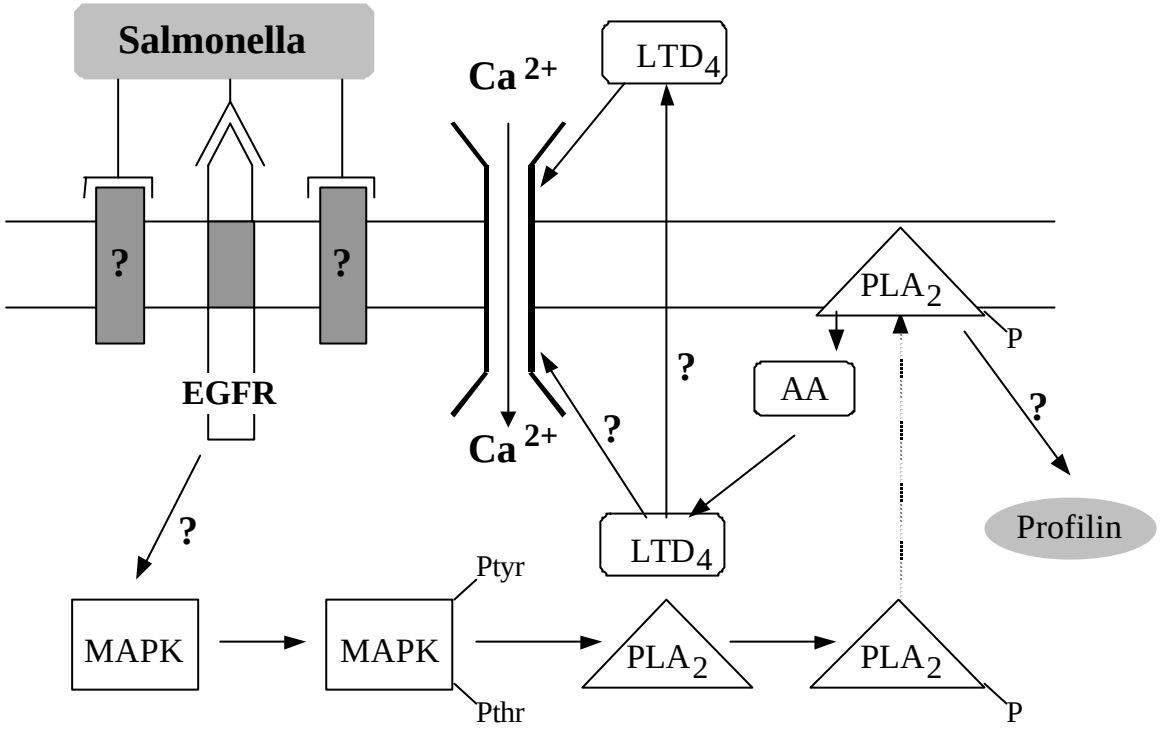



**Abbildung 16** Möglicher Mechanismus der Signalübertragung bei der Salmonellen-Invasion in Henle-407-Zellen (nach PACE *et al.*,,1993)

Erläuterung zu Abbildung 16:

Salmonellen heften über bisher unidentifizierte Moleküle an die Zelloberfläche an und stimulieren den EGF-Rezeptor, welcher eine Phosphotyrosinkinase (PTK)-Aktivität besitzt. Diese Stimulation initiiert eine Signalkaskade, die in der Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinase (MAPK) mündet. Die MAP-Kinase aktiviert $PLA_2$, welche Arachidonsäure (AA) aus der Zellmembran freisetzt. Durch den enzymatischen Abbau der Arachidonsäure über den Lipoxygenase-Weg entsteht $LTD_4$. Dieses wiederum aktiviert $Ca^{2+}$-Kanäle, was den $Ca^{2+}$-Influx hervorruft. Es kommt zu einem starken Anstieg des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels, welcher die Depolymerisierung der Aktin-Mikrofilamente hervorruft. Die Erhöhung des intrazellulären $Ca^{2+}$-Spiegels könnte zur Ausbildung der charakteristischen Membranausstülpungen führen, da sich die Integrität der zellulären Mikrofilamente als hochsensibel gegenüber dem $Ca^{2+}$-Spiegel gezeigt hat (PACE *et al.*, 1993). Eine weitere Konsequenz der EGFR-Stimulation könnte der vermehrte Transport von $PLA_2$ zur

Zellmembran sein, der durch ihre $Ca^{2+}$-abhängige Phospholipid-bindende Domäne gefördert wird (CLARK & DUNLOP, 1991). Diese Translokation könnte Profilin aus der Membran lösen, welches die Aktin-Polymerisation bewirken kann (PRING *et al.*, 1992). Fraglich ist jedoch in jedem Fall, warum die Reorganisation des Aktins und damit die "Ruffle"-Bildung lokal auf die Stelle der Bakterien-Anheftung beschränkt bleibt.

Es ist bekannt, daß *S. enterica* in annähernd jede eukaryontische Zelle invadieren kann (GALÁN, 1994), auch in solche, die keinen EGF-Rezeptor besitzen. So besteht zum Beispiel hinsichtlich der Invasionsfähigkeit von *Salmonella* auch kein quantitativer Unterschied zwischen Henle-407-Zellen, die EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche ausbilden, und Henle-407-Zellen, denen diese Rezeptoren auf der Oberfläche fehlen (JONES *et al.*, 1993). *Salmonella*-Keime invadieren auch in $Ca^{2+}$-freiem Medium in HeLa-Zellen, wo eine Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ausbleibt (ROSENSHINE *et al.*, 1994). Zudem kommt es im Zuge der *Salmonella*-Invasion in HeLa-Zellen zu einem vorübergehenden Anstieg von Inositolphosphat (IP) im Zytoplasma der Wirtszelle, der eng mit der Invasionsrate und dem Ausmaß der Zytoskelettveränderungen korreliert ist. Im Gegensatz zum obigen Schema wird außerdem zu einer $Ca^{2+}$ vor allem aus intrazellulären Kompartimenten mobilisiert, da Chelatoren von intra-, nicht jedoch von extrazellulärem Calcium die Invasion von *Salmonella* hemmen (RUSCHKOWSKI *et al.*, 1992). Der Invasionsweg von *Salmonella* in HeLa-Zellen unterscheidet sich also deutlich von dem, der in Henle-407-Zellen gefunden wurde (s. Abb 16) und wird in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

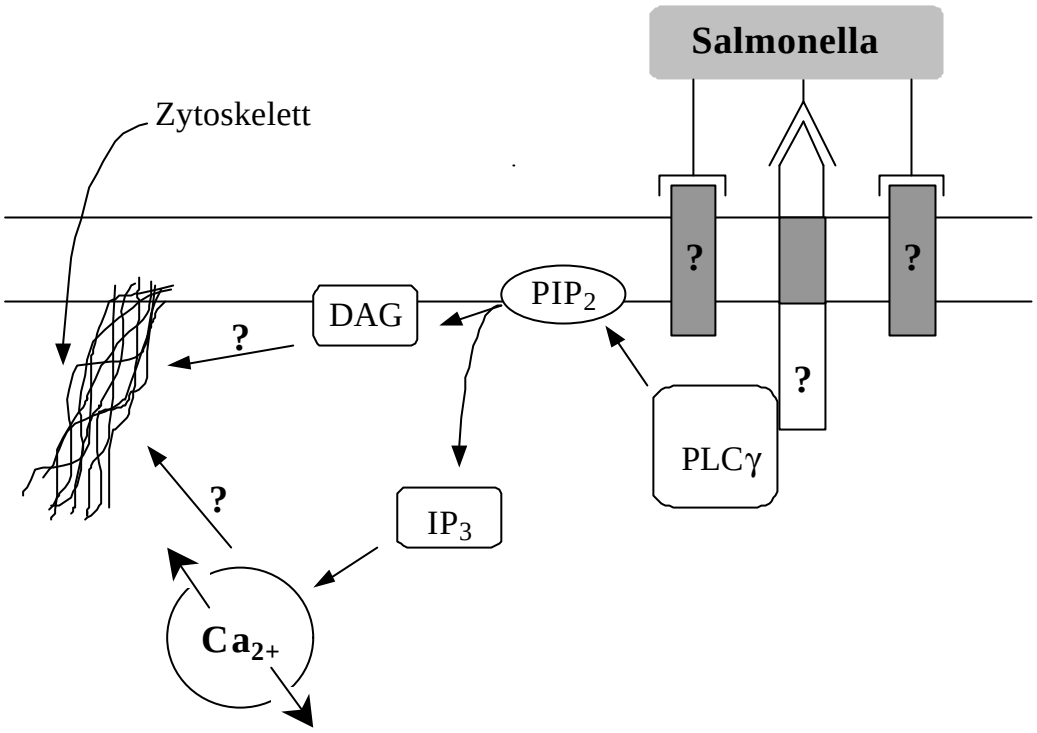



**Abbildung 17** Möglicher Mechanismus der Signalübertragung bei der Salmonellen-Invasion in HeLa-Zellen (nach ROSENSHINE & FINLAY, 1993)

Erläuterung zu Abbildung 17:

Die Invasion von *S.*Typhimurium-Keimen in HeLa-Zellen ist mit einem vorübergehenden Anstieg von Inositol-1,4,5-Triphosphat ($IP_3$) verbunden. Dieses entsteht in der eukaryontischen Zelle über die Spaltung von membrangebundenem $PIP_2$ (Phosphatidyl-Inositol-4,5-Biphosphat) durch die Einwirkung von Phospholipase C (PLC). Bei dieser Spaltung entsteht $IP_3$ im Zytosol und DAG (Diacylglycerol) in der Membran. Beide Substanzen sind Second Messengers, die komplexe Signalkaskaden auslösen (BERRIDGE, 1987). Die hauptsächliche Wirkung des $IP_3$ besteht dabei darin, Calcium aus intrazellulären Kompartimenten freizusetzen (BERRIDGE, 1987), welches wiederum die Integrität der Wirtsmikrofilamente beeinflussen kann. Die Hauptaufgabe des DAG ist eigentlich die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), es scheint jedoch auch in der Lage zu sein, auf einem PKC-unabhängigen Weg die Aktin-Polymerisation zu fördern (SHARIFF & LUNA, 1992).

Dieses Modell der Invasion ist insofern noch recht spekulativ, als es bisher noch nicht gelungen ist, eine Verbindung zwischen der Invasion und der Aktivierung der PLCγ herzustellen. Es ist daher zum Beispiel auch denkbar, daß diese Aktivierung eher ein Ergebnis als eine Ursache der Invasion ist (ROSENSHINE & FINLAY, 1993).

Auch wenn Salmonellen in verschiedenen Zellinien unterschiedliche Antworten induzieren, kann es durchaus sein, daß diese augenscheinlich widersprüchlichen Ergebnisse nur das momentan noch sehr unvollständige Verständnis des Invasionsmechanismus widerspiegeln und aber bei näherer Betrachtung durch einen einheitlichen Mechanismus hervorgerufen werden. So ist auffällig, daß Mutationen im *Salmonella*-Genom, die die Invasionsfähigkeit für eine Zellart einschränken, eine ebensolche Einschränkung auch für andere Zellarten verursachen, bei denen ein anderer Invasionsmechanismus unterstellt wird (GALÁN, 1994). Es wäre daher möglich, daß *Salmonella* ein Molekül exprimiert, welches mit Strukturen, beispielsweise bestimmten Kohlenhydraten, reagiert, die an vielen eukaryontischen Rezeptoren zu finden sind und daß die Reaktionskette, die in der jeweiligen Zellart induziert wird, einfach von der Anzahl der betreffenden Rezeptoren auf deren Oberfläche abhängt (GALÁN, 1994).

Trotz der verschiedenen Signalketten, die in unterschiedlichen Wirtszellarten ablaufen, ist das Ergebnis immer das gleiche: Es kommt zum Umbau des Zytoskeletts der Wirtszelle. Daraus resultiert das Membran-"Ruffling", welches über eine lokal erhöhte Phagozytose-Aktivität zum Eintritt der Bakterienzelle in die Wirtszelle führt. Das legt den Schluß nahe, daß die verschiedenen zellulären Signalkaskaden letztendlich dieselben Wirtszellreaktionen aktivieren. Ein Second Messenger scheint $Ca^{2+}$ zu sein. Ein anderes potentielles Effektormolekül, das eine Rolle bei der Formierung von Membran-"Ruffles" spielen könnte, ist das Profilin. Von diesem Molekül weiß man, daß es die Aktin-Polymerisation durch die Aktivierung des Nukleotid-Austausches am Ende von Aktin-Filamenten (PRING *et al.*, 1992) und eine Reduzierung der kritischen Konzentration von ATP-Aktin fördern kann (PANTALONI & CARLIER, 1993). Die Stimulation durch eine Vielzahl exogener Reize, inklusive der Wachstumsfaktoren und wahrscheinlich Salmonellen, fördert den Transport von PLCγ zur Plasmamembran. Der Ortswechsel dieses Enzyms (und vielleicht anderer

Phospholipasen wie $PLA_2$) könnten bewirken, daß Profilin aus seinem üblichen Standort in der Membran gelöst wird und dann zur "Ruffle"-Bildung beiträgt.

## 2.3 Intrazelluläre Persistenz und Replikation von *Salmonella*

Die Fähigkeit, in Wirtszellen zu überleben und sich darin zu vermehren, eröffnet *Salmonella* zum einen die Möglichkeit, sich im Körper auszubreiten und sich damit weitere Ressourcen zu erschließen. Zum anderen können Salmonellen durch Persistenz innerhalb der Zellen einer effektiven Wirtsabwehr entgehen (LINDGREN *et al.*, 1996). *Salmonella*-Mutanten, die unfähig sind, in Makrophagen oder Epithelzellen zu überleben, sind avirulent (FIELDS *et al.*, 1986; LEUNG & FINLAY, 1991). Der intrazellulären Persistenz und Vermehrungsfähigkeit kommt somit eine Schlüsselstellung in der Pathogenese der Salmonellose zu.

### 2.3.1 Intrazelluläre Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von *Salmonella* in verschiedenen Zellarten

Verschiedene *Salmonella*-Serovare sind in der Lage, in Wirtszellen über längere Zeit zu persistieren und sich in ihnen zu vermehren. Die Persistenz und Vermehrungsfähigkeit in verschiedenen epitheloiden und fibroblastischen Zelltypen wurde mehrfach im Infektionsmodell gezeigt und in vielen *in-vitro*-Experimenten nachempfunden (siehe Tabelle 23). Die überwiegende Anzahl dieser Experimente waren Kurzzeitexperimente von bis zu 24 h. Nur wenige Versuche gingen über einen längeren Zeitraum (bis zu 14 d). Bei allen Experimenten persistierten Salmonellen in allen epitheloiden Zellen aber auch in Hepatozyten und Fibroblasten bis zum Ende des jeweiligen Versuchszeitraumes.

Die intrazelluläre Persistenz von *Salmonella*-Keimen in Makrophagen ist Teil des Infektionsgeschehens *in vivo* (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997) und wurde, wie in Tabelle 24 aufgeführt, in *in-vitro*-Experimenten mit verschiedenen Makrophagen nachgewiesen. Diese Untersuchungen führten jedoch zu teilweise unterschiedlichen

Ergebnissen und es scheint, als ob Makrophagen je nach ihrer Herkunft und Kultivierungsdauer jeweils anders reagieren. So wurde von einer Forschergruppe gezeigt, daß die Überlebensfähigkeit von *S.*Typhimurium in der Makrophagen-Zellinie J774 höher ist als in murinen Makrophagen, die aus Milz oder Knochenmark entnommen wurden. Noch kürzer ist die Persistenz in murinen Peritoneal-Makrophagen (BUCHMEIER & HEFFRON, 1989). Zudem scheint die intrazelluläre Persistenz und Vermehrungsfähigkeit in Makrophagen eine wirtsspezifische Komponente zu haben. Im direkten Vergleich vermochten *S.*Typhimurium-Keime in der murinen Makrophagen-Zellinie J774 gut, in der humanen Zellinie U937 jedoch nur schlecht zu überleben. Bei Keimen des an den Menschen adaptierten Serovars *S.*Typhi ist es dagegen umgekehrt (VLADOIANU *et al.*, 1990; SCHWAN & KOPECKO, 1997). Ob sich Salmonellen intrazellulär in Makrophagen vermehren, ist von Fall zu Fall schwer zu beurteilen, denn bei der intrazellulären Persistenz handelt es sich um einen dynamischen Prozeß, bei der die intrazelluläre Vermehrung und die intrazelluläre Abtötung gleichzeitig stattfinden. Die Abtötungsrate scheint hierbei in verschiedenen Makrophagentypen ungefähr gleich hoch zu sein (BUCHMEIER & LIBBY, 1997). Der Unterschied, der zur erhöhten Persistenz führt, liegt demnach in der in bestimmten Zelltypen höheren intrazellulären Vermehrungsrate der Salmonellen. Eine mit der Zeit abnehmende Anzahl intrazellulärer Salmonellen ist umgekehrt noch kein ausreichendes Indiz für eine völlig fehlende intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit des betreffenden *Salmonella*-Stammes. Vielmehr ist zu berücksichtigen, daß bei einer abnehmenden Anzahl intrazellulär lebensfähiger Keime die Abtötungsrate eine relativ niedrige Vermehrungsrate maskieren kann (BUCHMEIER & LIBBY, 1997). Zudem scheinen sich die intrazellulären Salmonellen in zwei Populationen aufzuteilen. Eine der Populationen verhält sich statisch, während die andere sich rasch vermehrt (ABSHIRE & NEIDHARDT, 1993b).

Zumindest für *S.*Typhimurium liegen experimentelle Beweise vor, daß die Keime auch in immortalisierten humanen B- und T-Zellen, sowie in polymorphonukleären Leukozyten für mindestens 24 h persistieren können und sich in diesen Abwehrzellen auch intrazellulär vermehren können (s. Tabelle 24).

TABELLE 23 Nachweis von Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von *Salmonella*-Keimen in verschiedenen Wirtszellen bzw. -geweben (außer Leukozyten)

| ***Salmonella*-Serovar** | **Zell- bzw. Gewebeart** | **Versuchs-dauer** | **Persistenz** | **Vermehrung bestätigt[a]** | **Referenz[b]** |
|---|---|---|---|---|---|
| Typhimurium | MDCK | 24 h | ja | + | 1 |
| | HeLa | 8 - 24 h | ja | + | 1;2 |
| | Caco-2 | 6 - 24 h | ja | + | 1;3;4;5 |
| | HEp-2 | 6 - 24 h | ja | + | 6;7 |
| | HT-29 | 20 h | ja | + | 4 |
| | IEC-6 | 18 h | ja | + | 8 |
| | MDBK | 9 h | ja | + | 9 |
| | TIB73 (Hepatozyten) | 28 h | ja | + | 10 |
| | Hepatozyten Maus | 48 h | ja | + | 11 |
| | murine PP (Darmschlaufe) | 7 d | ja | n.u. | 12 |
| | 3T3-Fibroblasten | 72 h | ja | + | 13 |
| | NRK (Fibroblasten) | 72 h | ja | + | 13 |
| | Vero | 24 h | ja | + | 14 |
| Dublin | IEC-6 | 18 h | ja | + | 8 |
| | MDBK | 9 h | ja | + | 9 |
| Typhi | HeLa | 8 h | ja | + | 2 |
| Enteritidis | Henle-407 | 14 d | ja | + | 15 |
| Choleraesuis | MDCK | 24 h | ja | + | 16 |
| | Caco-2 | 24 h | ja | + | 16 |

Legende:

PP = Peyersche Platten

[a]: + = deutliche Vermehrung intrazellulärer Bakterien
– = deutliche Verminderung intrazellulärer Bakterien
o = Anzahl intrazellulärer Bakterien in etwa konstant
n.u. = Anzahl intrazellulärer Bakterien nicht untersucht

[b]: Liste der Referenzen: s. im Anschluß an Tabelle 24

TABELLE 24 Nachweis von Persistenz und Vermehrungsfähigkeit von *Salmonella*-Keimen in verschiedenen Leukozyten

| ***Salmonella*-Serovar** | **Leukozyten-Typ** | **Versuchs-dauer** | **Persistenz** | **Vermehrung bestätigt[a]** | **Referenz[b]** |
|---|---|---|---|---|---|
| Typhimurium | J774-MP | 6 - 24 h | ja | + | 3;5;16;17;18;19;20;21;22 |
| | RAW264.7-MP | 14 - 25 h | ja | + | 23;24 |
| | U937-MP | 24 - 25 h | ja | –/+ | 19/25 |
| | IC-21-MP | 24 h | ja | + | 20 |
| | PU5-1.8-MP | 24 h | ja | + | 20 |
| | murine Milz-MP | 24 h | ja | + | 20;21 |
| | murine KM-MP | 9 - 25 h | ja | o/+ | 21;26/23;27 |
| | murine Peritoneal-MP | 5 - 48 h | ja | o | 18;20;21;28;29;30 |
| | humane MP | 24 - 72 h | ja | +/– | 18/31 |
| | humane PMN | 24 h | ja | + | 32 |
| | humane T-Zellinie H9 | 24 h | ja | + | 7 |
| | humane B-Zellinie JY | 24 h | ja | + | 7 |
| Dublin | PU5-1.8-MP | 24 h | ja | – | 20 |
| | murine Milz-MP | 28 h | ja | ? | 33 |
| | murine Peritoneal-MP | 24 - 28 h | ja | + | 20;33 |
| | bovine Alveolar-MP | 28 - 48 h | ja | +/– | 33/34 |
| Typhi | J774-MP | 24 h | ja | +/– | 18/19 |
| | U937-MP | 24 h | ja | + | 19;35 |
| | murine Peritoneal-MP | 24 h | ja | – | 18 |
| | humane MP | 24 - 72 h | ja | + | 18;31 |
| Enteritidis | PU5-1.8-MP | 24 h | ja | + | 20 |
| | murine Peritoneal-MP | 24 h | ja | + | 20 |

Legende:

MP = Makrophagen
PMN = polymorphonukleäre Leukozyten
KM = Knochenmark

[a]: + = deutliche Vermehrung intrazellulärer Bakterien
– = deutliche Verminderung intrazellulärer Bakterien
o = Anzahl intrazellulärer Bakterien in etwa konstant
n.u. = Anzahl intrazellulärer Bakterien nicht untersucht

[b]: Liste der Referenzen s. nächste Seite

Referenzen für Tabelle 23 und Tabelle 24:


1: LEUNG & FINLAY, 1991
2: MILLS & FINLAY, 1994
3: GAHRING *et al.,* 1990
4: WELLS *et al.*, 1996
5: HORNE *et al.,* 1997
6: SMALL *et al.,* 1987
7: VERJANS *et al.*, 1994
8: DINJUS *et al.*, 1998
9: BRACKELSBERG *et al.*, 1997
10: LAJARIN *et al.,* 1996
11: CONLAN & NORTH, 1992
12: DANIELS *et al.,* 1996
13: MARTINEZ-MOYA *et al.*, 1998
14: BARROW & LOVELL, 1989
15: SAARINEN *et al.,* 1996
16: FINLAY *et al.,* 1991
17: BUCHMEIER & HEFFRON, 1990
18: VLADOIANU *et al.,* 1990
19: SCHWAN & KOPECKO, 1997
20: RIIKONEN *et al.,* 1992
21: BUCHMEIER & HEFFRON, 1989
22: MILLS & FINLAY, 1998
23: MONACK *et al.,* 1996
24: RATHMAN *et al.*, 1996
25: ABSHIRE & NEIDHARD, 1993a
26: OH *et al.,* 1996
27: MILLER & MEKALANOS, 1990
28: LIBBY *et al.,* 1994
29: FIELDS *et al.,* 1986
30: WELLS *et al.*, 1993b
31: ISHIBASHI & ARAI, 1996
32: CHIU & OU, 1999
33: GULLOTEAU *et al.*, 1996
34: RICE *et al.*, 1997
35: SIZEMORE *et al.*, 1997


### 2.3.2 Die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2)

Die 40 kb große *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2) liegt bei Centisom 30,7 auf dem *Salmonella*-Chromosom und kodiert wie die SPI1 für ein Typ-III-Sekretionssystem. Sie hat einen C+G-Gehalt von 44,7 % und ist bei *Salmonella enterica*, nicht jedoch bei der Spezies *Salmonella bongori* oder im Genom anderer Mikroorganismen (*Y. pestis, S. flexneri*, EPEC, EHEC, *V. cholerae* und *Staph. aureus*) zu finden. Auch die SPI2 scheint im Laufe der Evolution von einem Vorläufer der heutigen Salmonellen durch horizontalen Gentransfer von einer unbekannten Quelle erworben worden zu sein. Dieses Ereignis hat aber offensichtlich später als der Transfer der SPI1 stattgefunden und zwar zu einem Zeitpunkt, als sich die beiden Spezies *S.enterica* und *S.bongori* entwicklungsgeschichtlich bereits voneinander getrennt hatten (SHEA *et al.,* 1996; HENSEL *et al*., 1997b).

Die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel enthält Gene für Strukturproteine des Sekretionsapparates (*ssa* = secretion system apparatus), Gene für mögliche sezernierte Effektor-Proteine (*sse* =

secretion system effector), Regulator-Gene (*ssr* = secretion system regulator) und Gene, die für Chaperone kodieren (*ssc* = secretion system chaperone) (HENSEL *et al.*, 1997a). Abbildung 18 zeigt die Organisation der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2.

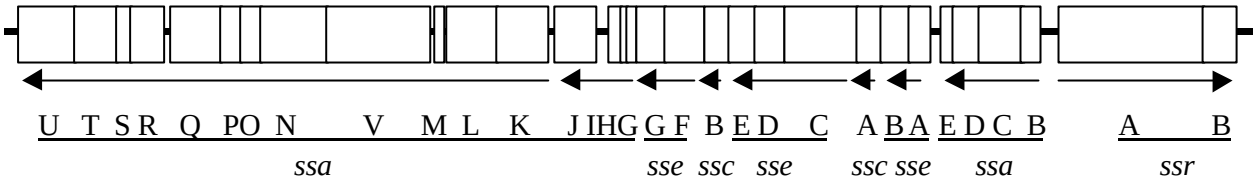



**Abbildung 18** Organisation der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 2 (SPI2)

Die molekularen Wirkungsmechanismen der in der SPI2 kodierten Proteine sind erst in wenigen Details aufgeklärt. Im Virulenztest mit BALB/c-Mäusen wurde die $LD_{50}$ von SPI2-Mutanten bestimmt. Die $LD_{50}$ ist gegenüber dem Wildtypstamm um ca. fünf Zehnerpotenzen erhöht, unabhängig von der Art der Inokulation (oral oder i.p.) (SHEA *et al.*, 1996). Die meisten SPI2-Mutanten zeigen eine gegenüber dem Wildtypstamm verminderte intrazelluläre Replikation sowohl in RAW 264.7- und J774.1-Makrophagen, als auch in HEp-2-Zellen (CIRILLO *et al.*, 1998; HENSEL *et al.*, 1998). SPI2-Mutanten sind zwar in der Lage, die Peyerschen Platten von BALB/c-Mäusen zu kolonisieren, erreichen aber nicht die mesenterialen Lymphknoten (CIRILLO *et al.*, 1998). Zudem können sie sich im Gegensatz zum Wildtypstamm in Leber- und Milzzellen von BALB/c-Mäusen nicht vermehren (SHEA *et al.*, 1999). SPI2 scheint daher *in vitro* und *in vivo* für die intrazelluläre Replikation in Wirtszellen notwendig zu sein.

Die Expression der SPI2-Gene wird durch das zwei-Komponenten-Regulationssystem *ssrAB* aktiviert. *ssrA* kodiert für eine Sensor-Kinase, *ssrB* für einen transkriptionellen Regulator, der Sequenzhomologien mit SirA aufweist (OCHMAN *et al.*, 1996; DEIWICK *et al.*, 1999). Dieses zwei-Komponenten-Regulationssystem wird aktiviert, wenn die Salmonelle sich im Inneren eines Phagosoms der Wirtszelle befindet (CIRILLO *et al.*, 1998). Die SPI2-Genexpression wird dabei insbesondere durch niedrige $Mg^{2+}$-Konzentrationen (< 30 µM, optimal sind 8 µM), sowie durch niedrige Phosphat-Spiegel ausgelöst (DEIWICK *et al.*, 1999).

Zwischen den beiden *Salmonella*-Pathogenitätsinseln gibt es Wechselwirkungen. *ssaJ*$^-$, *ssaT*$^-$, sowie *ssaV*$^-$-Mutationen in SPI2 führen zu einer Reduktion der Invasivität in HEp-2-Zellen auf 10 % des Wildtypstammes (HENSEL *et al*., 1997a). Diese SPI2-Mutanten zeigen eine stark reduzierte Expression der SPI1-Gene *sipC*, *prgK* und *hilA*. Die Expression eines Typ-III-Export-Systems kann also deutlich durch Mutationen in Genen eines zweiten Typ-III-Export-Systems der gleichen Zelle beeinflußt werden (DEIWICK *et al*., 1998).

### 2.3.3 Der intrazelluläre Reifungsprozeß *Salmonella*-haltiger Vakuolen

In Zellkulturversuchen mit HeLa-Zellen wurde gezeigt, daß Keime von *Salmonella* Typhimurium nach der Invasion in membranumschlossenen Vakuolen vorliegen. Etwa zwei Stunden nach dem Eindringen können in diesen Vakuolen lysosomale Membranmarker (lgp = lysosomal glycoprotein) aufgefunden werden. Die Salmonellen-haltigen Vakuolen fusionieren dazu mit lgp-haltigen Vesikeln, die sich von den klassischen ausgereiften Lysosomen unterscheiden. Diese lgp-haltigen Vesikel enthalten im Gegensatz zu reifen Lysosomen keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (GARCIA-DEL-PORTILLO & FINLAY, 1995a). Die Aufgabe der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren ist es, verschiedene lysosomale Enzyme vom Golgi-Apparat in späte endosomale Kompartimente zu überführen, unter anderem das Kathepsin, das daher in Salmonellen-haltigen Vakuolen nahezu völlig fehlt (RATHMAN *et al.*, 1997). Diese Rezeptoren sind somit spät-endosomale Marker. Das "späte" Endosom ist ein obligates Durchgangsstadium im Prozeß der Lysosomen-Biogenese (KORNFELD & MELLMAN, 1989). Dazu kommt, daß von außen zugeführte und von der Zelle aufgenommene flüssige Endozytoseindikatoren wie Luzifer-Gelb nicht in den Salmonellen-haltigen Vakuolen wiederzufinden sind (GARCIA-DEL-PORTILLO & FINLAY, 1995a). Man geht daher davon aus, daß die Salmonellen-haltigen Vakuolen mit Lysosomen fusionieren, die sich anders entwickelt haben als das "normale" Lysosom, indem sie einige Kompartimente der endozytischen Route umgehen. *Salmonella*-Keime befinden sich innerhalb der Epithelzelle also in einem Kompartiment, das bestimmte lysosomale Komponenten enthält, sich aber deutlich von dem klassischen Phagolysosom mit dem vollständigen Repertoire an lysosomalen Enzymen unterscheidet (GARCIA-DEL-PORTILLO, 1996). In einer früheren Untersuchung mit MDCK-Zellen wurde versucht, die

Bedingungen im Inneren dieser atypischen Phagolysosomen zu charakterisieren. Dazu wurden die intrazellulären Expressionsraten verschiedener *Salmonella*-Gene untersucht, deren Expression von bestimmten Umweltbedingungen abhängig sind. So war die intrazelluläre Expressionsrate von *iroA* und *mgtB* hoch. *iroA* wird bei limitiertem $Fe^{2+}$ und *mgtB* bei limitiertem $Mg^{2+}$ induziert. Zudem wurde das Gen *cadA* in den ersten 4 h *post infectionem* nur mäßig exprimiert. Eine Expression von *cadA* erfolgt üblicherweise im mild sauren Milieu (ca. pH 6,0), wenn Lysin verfügbar ist. Eine hohe *cadA*-Expressionsrate ist bei anaeroben Bedingungen zu beobachten, eine mäßige bei Verfügbarkeit von Sauerstoff. Man vermutet in der Vakuole also eine geringe Eisen- und Magnesiumkonzentration, einen pH-Wert um pH 6,0, sowie relevante Konzentrationen an Sauerstoff und Lysin (GARCIA-DEL-PORTILLO *et al.*, 1992). Die mögliche intrazelluläre Route von Salmonellen ist in Abbildung 19 dargestellt.

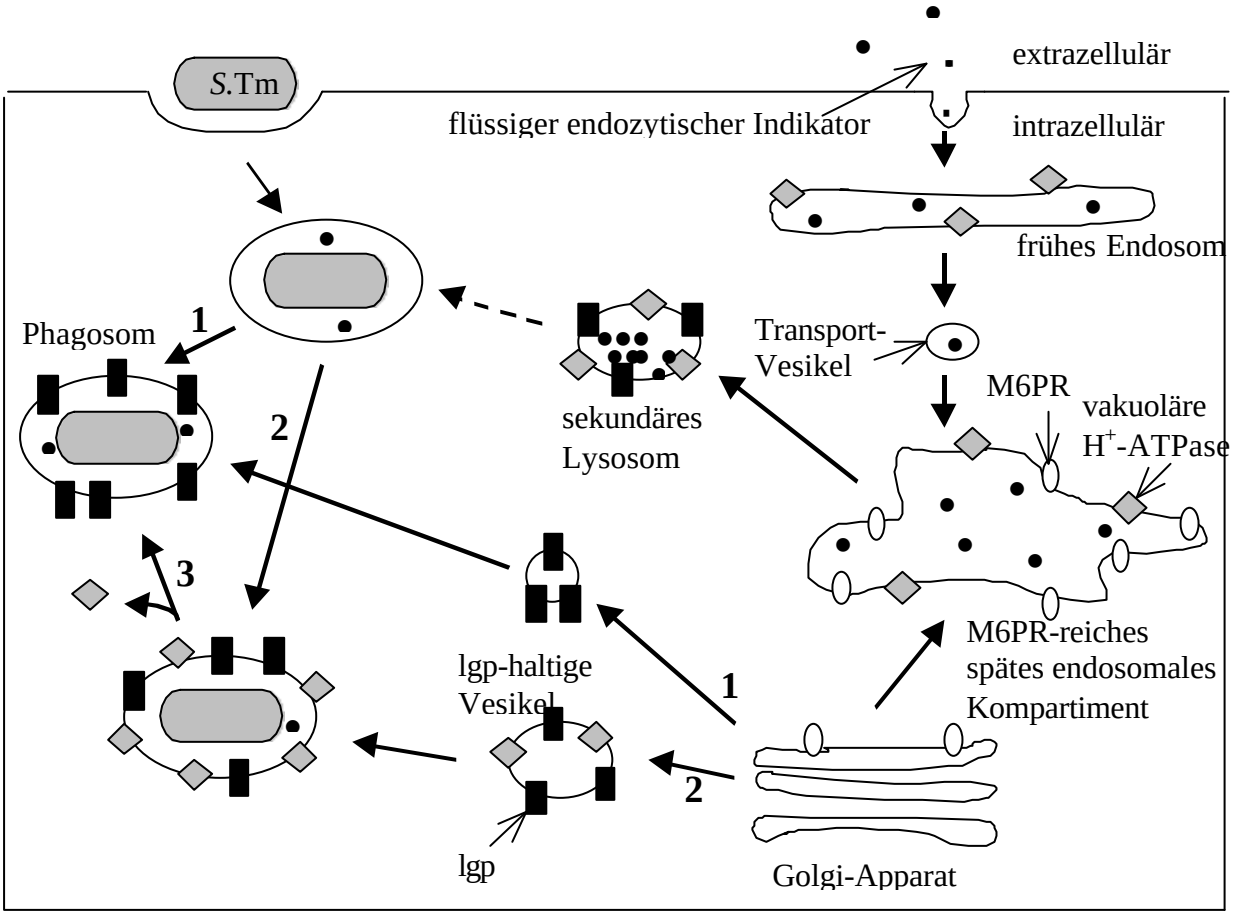



**Abbildung 19** Die mögliche intrazelluläre Route von *Salmonella* Typhimurium in epithelialen Zellen (nach GARCIA-DEL-PORTILLO & FINLAY, 1995b)

Erläuterung zu Abbildung 19:
Salmonellen liegen nach dem Eindringen in Epithelzellen in Endosomen vor, die lysosomale Glykoproteine (lgps) enthalten und umgehen die Kompartimente mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PRs). **(1)** Die lgp-haltigen Vesikel könnten direkt vom Golgi-Apparat stammen und könnten von vornherein keine vakuoläre $H^+$-ATP-ase enthalten. **(2)** Die lgp-haltigen Vesikel könnten vakuoläre $H^+$-ATP-ase enthalten, mit Phagosomen fusionieren und **(3)** ihre Protonenpumpe durch einen von *Salmonella*-Keimen induzierten Prozeß verlieren. In jedem Fall entsteht ein nicht-angesäuertes lgp-reiches Phagosom, das von der "normalen" endozytischen Route abgekoppelt ist.

In Makrophagen liegen Salmonellen zunächst in weitlumigen Phagosomen vor, die als "spacious phagosomes" (SP) bezeichnet werden und sich von den großen flüssigkeitsgefüllten Vakuolen ("Makropinosomen") unterscheiden. Während die "Makropinosomen" innerhalb von 15 min nach der Aufnahme komplett schrumpfen, persistieren SPs im Zytoplasma und wachsen oft noch durch Fusion mit "Makropinosomen" und anderen SPs (ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1994). Die Frage, ob Salmonellen die Fusion von Phagosomen und Lysosomen zu Phagolysosomen hemmen oder nicht, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert (BUCHMEIER & HEFFRON, 1991; ISHIBASHI & ARAI, 1990; OH *et al.*, 1996). Mittlerweile wurde gezeigt, daß auch in Makrophagen die Salmonellen-haltigen Vesikel lysosomale Glycoproteine und lysosomale saure Phosphatase enthalten. Sie besitzen jedoch ähnlich wie in Epithelzellen keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und kein Kathepsin. Man vermutet also einen dem Geschehen in Epithelzellen vergleichbaren Weg, bei dem die Salmonellen-haltigen Vakuolen vom normalen degradativen Weg im Makrophagen abgekoppelt sind. Diese Abkopplung ist unabhängig vom Invasionsvermögen, da auch eine nicht-invasive *S.*Typhimurium-Mutante in einem zellulären Kompartiment endet, das identisch mit den Kompartimenten von Wildtyp-Salmonellen ist (RATHMAN *et al.*, 1997). *Salmonella*-Keime hemmen intrazellulär im Makrophagen die Ansäuerung der Vakuolen. Während sich in Vakuolen mit hitzeinaktivierten Salmonellen innerhalb von einer Stunde ein pH von kleiner als 4,5 einstellt, sinkt der pH in Vakuolen, die lebensfähige Salmonellen enthalten erst innerhalb von 4 - 5 Stunden unter pH 5,0 (ALPUCHE-ARANDA *et al.*, 1992). Andererseits ist die vakuoläre Ansäuerung für die intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *Salmonella* wichtig, da verschiedene Reagentien, die den intraphagosomalen pH erhöhen,

sofort zu einem signifikanten Absinken der intrazellulären Überlebensrate führen (RATHMAN *et al.*, 1996).

### 2.3.4 *Salmonella*-induzierte filamentöse Lysosomen (Sif) in Epithelzellen

Vier bis sechs Stunden nach der Invasion kann man in den Salmonellen-haltigen Epithelzellen die Entstehung stabiler filamentösen Strukturen beobachten (Sif: Salmonella induced filaments). Nachgewiesen wurden diese Strukturen in HeLa-, Henle-407- und Caco-2-Zellen bei Infektion mit *S.*Choleraesuis, *S.*Dublin, *S.*Enteritidis oder *S.*Typhimurium. Sifs enthalten neben lgp (lysosomal glycoprotein) auch lysosomale saure Phosphatase. Sie haben einen Durchmesser von ca. 0,5 µm und unterscheiden sich damit von den ca. 0,1 µm dünnen tubulären Lysosomen. Zudem sind sie im Gegensatz zu den tubulären Lysosomen nicht durch Material aus dem externen Medium erreichbar, wie z.B. Luzifer-Gelb, einem flüssigen endozytischen Indikatorstoff. Zur Formation und Aufrechterhaltung dieser Strukturen werden Mikrotubuli, nicht aber Aktinfasern benötigt. Außerdem werden zur Bildung (nicht jedoch zur Aufrechterhaltung) dieser Strukturen lebensfähige Salmonellen und eine vakuoläre Ansäuerung gebraucht (GARCIA-DEL-PORTILLO *et al.*, 1993). Die Funktion der Sifs ist noch nicht klar. Man unterstellt jedoch aus verschiedenen Gründen, daß sie mit der intrazellulären Replikation von *Salmonella*-Keimen in Zusammenhang stehen: Erstens erscheinen Sifs zeitgleich zum Beginn der intrazellulären Replikation. Zweitens werden Sifs nicht beobachtet, wenn intrazelluläre Bakterien mit Antibiotika abgetötet werden. Drittens induzieren Rep$^-$-Mutanten (*Salmonella*-Mutanten, die sich zwar extrazellulär, nicht jedoch intrazellulär vermehren können) keine Filamente (GARCIA-DEL-PORTILLO, 1996). Ein *Salmonella*-Gen, das in die Induktion der filamentösen lysosomalen Strukturen eingebunden ist, ist *sifA*. Es liegt im *pot* (Polyamin-Transport)-Operon und wurde wahrscheinlich über horizontalen Gentransfer durch Transduktion erworben. Es kodiert für ein 35 kDa-Protein und hat keine Homologien zu anderen bekannten Genen. Eine Mutation in *sifA* führt zur Unfähigkeit, die charakteristischen filamentösen Lysosomen zu induzieren und bei oraler Applikation zu verminderter Virulenz im Mausmodell (STEIN *et al.*, 1996). Die Formation der Sifs scheint durch *ompR* und *envZ* reguliert zu werden. Nach der Transposon-vermittelten

Mutation eines dieser Gene ist *S.*Typhimurium ebenfalls nicht länger in der Lage, die Bildung von Sifs in HeLa-Zellen auszulösen (MILLS *et al*., 1998).

### 2.3.5 Überlebensmechanismen von *Salmonella* im Inneren von Wirtszellen

Um im Inneren von Wirtszellen überleben zu können, haben Salmonellen die Fähigkeit entwickelt, verschiedenen antibakteriellen Abwehrmechanismen zu widerstehen. In der intrazellulären Umgebung kommt es zu einer starken Stoffwechselumstellung der Salmonellen. Nach dem Eindringen, bzw. nach der Aufnahme durch U937-Makrophagen werden ca. 40 Proteine vermehrt synthetisiert, während ca. 100 Proteine reprimiert werden (ABSHIRE & NEIDHARDT, 1993a). Nach der Aufnahme von *S.*Typhimurium-Keimen in J774.A-Makrophagen werden sogar 157 Proteine vermehrt synthetisiert, in Knochenmarks-Makrophagen der Maus 113 Proteine und in Knochenmarks-Makrophagen der Ratte 40 Proteine. Auch in anderen Zelltypen wird eine starke Stoffwechselumstellung beobachtet. So kommt es in der Epithelzellinie Henle-407 zur vermehrten Synthese von 58 und in Hepatozyten (NMuLi) von 91 Proteinen (BURNS-KELIHER *et al*., 1998). Diese vermehrt exprimierten Gene (*ivi* = *in vivo* induced) werden nach ihrem koordinativen Verhalten gegenüber einer Reihe von Umweltsignalen gruppiert. So fand man beispielsweise, daß alle sieben *ivi*-Gene, deren Expression durch niedrigen pH in Verbindung mit niedrigem $Mg^{2+}$-Spiegel aktiviert wird, durch das PhoP/PhoQ-System reguliert werden und sowohl in RAW264.7 (Mäuse-Makrophagen)-Zellen, wie auch in Henle-407- und HEp-2-Zellen in vergleichbarer Anzahl transkribiert werden. Diese Klasse der *ivi*-Gene scheint demnach generell auf Signale während der intrazellulären Infektionsphase zu antworten, die in den Vakuolen von Epithelzellen und Makrophagen ähnlich sind (HEITHOFF *et al*., 1999).

Zu den Abwehrmechanismen der Wirtszellen, denen *Salmonella*-Keime intrazellulär widerstehen müssen, gehören insbesondere die Resistenz gegenüber Defensinen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten, sowie der Widerstand gegenüber einem sauren pH (GROISMAN & SAIER, 1990)

#### 2.3.5.1 Resistenz gegenüber Defensinen

Bei den Defensinen handelt es sich um Abwehrstoffe, die im Makrophagen wirken und die man beispielsweise auch bei Insekten und Amphibien findet (GROISMAN *et al.,* 1992). Defensine sind kurze Peptide (29 - 34 AS), die antibakterielle, antifungale, antivirale und zytotoxische Eigenschaften haben. Sie formen anionenspezifische Kanäle in Lipiddoppelmembranen (GROISMAN & SAIER, 1990). In Makrophagen können sie bis zu 7 % des Gesamtproteins ausmachen (LEHRER *et al.,* 1993). *S.*Typhimurium-Stämme mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Defensinen sind *in vivo* attenuiert (GROISMAN *et al.,* 1992). Die Resistenz von Salmonellen gegenüber Defensinen wird transkriptionell über mindestens zwei zwei-Komponenten-Regulatorensysteme gesteuert, das *phoP/phoQ*-System, sowie das *pmrA/pmrB*-System (FIELDS *et al.*,,1989; GROISMAN, 1994). Die *pmrA/pmrB*-Gene sind in ihrer Nukleotidsequenz den *phoP/phoQ*-Genen sehr ähnlich und wurden ursprünglich bei der Suche nach der Ursache der Polymyxin B-Resistenz isoliert (ROLAND *et al.,* 1993). Über den Mechanismus der Defensin-Resistenz bei *Salmonella* ist derzeit wenig bekannt. Man nimmt jedoch an, daß Defensine ihre bakterizide Wirkung an der inneren Membran entfalten und daß dazu mehrere Peptidmoleküle notwendig sind (GROISMAN, 1994). Durch Transposon-Mutagenese wurden 11 Gene gefunden, die zur Resistenz gegenüber kationischen Peptiden notwendig sind. Sie wurden als *sap* (sensitive to antimicrobial peptides)-Gene bezeichnet (GROISMAN *et al.,* 1992). Die Produkte der Gene *sapA* bis *sapF* bilden einen ABC (ATP-binding-cassette)-Transporter. Dieser nutzt ATP als Energiequelle zum Export oder Import verschiedener Stoffe. Seine mögliche Aufgabe bei der Resistenz gegen Defensine besteht im Transport dieser Peptide aus dem Periplasma in das Zytoplasma, wo die Peptide von zellulären Proteasen abgebaut werden können (GROISMAN, 1994). SapG ist an der inneren Membran lokalisiert und enthält zwei $NAD^+$/NADH-bindende Regionen. Es interagiert mit SapJ, welches zehn mögliche transmembranale Domänen enthält. SapG und SapJ kommt somit wahrscheinlich eine ähnliche Funktion zu wie SapABCDF (GROISMAN, 1994). Die potentielle Funktion der anderen Sap-Proteine ist unbekannt (GROISMAN, 1994).

#### 2.3.5.2 Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffmetaboliten

Makrophagen antworten auf die Invasion von *Salmonella*-Keimen mit der Entwicklung einer oxidativen metabolischen Reaktion in deren Verlauf reaktive Oxidantien freigesetzt werden, wie Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid, Wasserstoffsuperoxid und oxidierte Halogene (BUCHMEIER *et al.,* 1993). Salmonellen reagieren auf eine Wasserstoffperoxid-Exposition mit der gesteigerten Produktion von ca. 30 Polypeptiden, wobei 9 der kodierenden Gene durch den transkriptionalen Aktivator OxyR reguliert werden. Zwei dieser Proteine sind die Enzyme KatG (Katalase) und Ahp (Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase), die in der Lage sind, Peroxide zu verstoffwechseln (FRANCIS *et al.,* 1997). Andere Gene, die für die Resistenz gegen oxidativen Streß notwendig sind, sind die Rekombinationsgene *recA* und *recBC*. Diese Gene sind an der Reparation von DNA-Schäden, die durch oxidative Reagentien entstehen können, beteiligt (BUCHMEIER *et al.,* 1993).

Neben *oxyR* sind auch die beiden Gene *slyA* und *rpoS* in die Regulation der adaptiven Reaktion von Salmonellen auf den oxidativen Streß in Phagolysosomen von Makrophagen involviert. SlyA gehört zu einer Familie von transkriptionellen Regulatoren mit niedrigem Molekulargewicht und ist notwendig zur Virulenz und zum Überleben von Salmonellen in Makrophagen (LIBBY *et al.,* 1994). Die Expression von SlyA ist unabhängig von RpoS, dem Sigma-Faktor der stationären Phase, und wird nach dem Eintritt in Makrophagen induziert. SlyA aktiviert und reprimiert mindestens je zwei nicht näher charakterisierte Gene (BUCHMEIER *et al.,* 1997). Der Regulator RpoS wird ausführlicher im Zusammenhang mit der Antwort auf den Säurestreß besprochen (siehe unten).

#### 2.3.5.3 Resistenz gegenüber niedrigem pH

Salmonellen sind im Laufe einer Infektion verschiedentlich niedrigen pH-Werten ausgesetzt, unter anderem auch im Inneren von Makrophagen. *Salmonella* besitzt mindestens 3 verschiedene, durch niedrigen pH induzierbare Systeme, die ein Überleben im sauren Milieu gewährleisten (LEE *et al.,* 1994). Am besten erforscht ist das Säure-Toleranz-System von *Salmonella*, das *in vitro* in der logarithmischen Wachstumsphase aktiviert wird. Man fand heraus, daß sich bei pH 7,7 vermehrende Salmonellen schnell sterben, wenn der pH

schlagartig auf unter 4,0 gesenkt wird. Wenn die Keime jedoch für eine Generation an einen mäßig sauren pH gewöhnt werden (pH 5,8), bevor man ihn weiter auf ca. 3,0 absenkt, steigt die Überlebenschance der Keime um das 100- bis 1000-fache (FOSTER & HALL, 1990). Der schrittweisen Anpassung an den niedrigen pH liegt ein zweiphasiger Prozeß zugrunde (log-phase acid-tolerance response; "log-phase ATR"). In der ersten Phase erfolgt der sogenannte "pre-shock", der bei pH ca. 6,0 ausgelöst wird. In dieser Phase werden 12 Proteine vermehrt, 6 dagegen vermindert produziert und es kommt zur Aktivierung von schnellwirkenden pH-Homöostase-Systemen, die das Zytoplasma der Bakterienzelle alkalisieren (FOSTER, 1993). Eines dieser Systeme ist das CadA/CadB-System. CadA (Lysin-Decarboxylase) decarboxyliert Lysin zu Cadaverin, wobei es ein $H^+$-Atom bindet. CadB (Lysin-Cadaverin-Antiporter) tauscht dieses intrazellulär produzierte Cadaverin gegen frisches Lysin aus dem umgebenden Milieu aus. Da *Salmonella* mehrere Aminosäure-Decarboxylase-Systeme besitzt (Lysin, Ornithin, Arginin), nimmt man an, daß Salmonellen je nach Verfügbarkeit entsprechender Aminosäuren viele Situationen in saurem pH überleben können (BEARSON *et al.,* 1997). Zudem gibt es Anzeichen für ein noch nicht definiertes, jedoch Aminosäure-unabhängiges pH-Homöostase-System (FOSTER & HALL, 1990). In der zweiten Phase, die dem "pre-shock" mit der pH-Homöostase folgt, kommt es zum sogenannten "Säureschock", der eintritt, wenn der pH unter 4,5 fällt. Er geht einher mit der Produktion von 43 zusätzlichen Proteinen (acid shock proteins = ASPs). Von diesen Proteinen werden 14 nur vorübergehend produziert und verschwinden nach 30 - 40 min wieder (FOSTER, 1993). Man vermutet, daß die ASPs makromolekulärer Schädigung vorbeugen oder diese beseitigen (BEARSON *et al.,* 1997). Der "log-phase-ATR" wird zumindest teilweise kontrolliert vom Fur-Protein (ferric uptake regulator). Mutationen in *fur* bewirken ein Ausbleiben des "log-phase-ATRs" und 6 der während des Säureschocks vorübergehend produzierten Proteine werden nicht länger produziert. Diese Regulation ist interessanterweise unabhängig von der Verfügbarkeit von Eisen. Vielmehr scheint es so, als ob dieser Regulator direkt auf den pH-Wert reagieren kann (FOSTER, 1993).

Außer dem "log-phase-ATR"-System sind noch zwei voneinander unabhängige Säuretoleranzsysteme bekannt, die in der stationären Phase aktiv sind. Eines dieser Systeme ist unabhängig von RpoS und wird als "stationary-phase-ATR"-System bezeichnet (LEE *et al.,* 1994). Es zeigte sich, daß Salmonellen in der stationären Phase eine höhere Säuretoleranz

besitzen als in der logarithmischen Phase. Beim "stationary-phase-ATR" kommt es zur Langzeitsynthese von 15 ASPs. Die volle Ausbildung dieses ATR ist erst nach zwei Stunden Inkubation bei niedrigem pH erreicht (LEE *et al.*, 1994).

Der dritte Mechanismus der Anpassung an einen niedrigen pH ist RpoS-abhängig und bewirkt ebenfalls eine langanhaltende Säuretoleranz. RpoS ist selber ein ASP und kontrolliert die Expression von 8 anderen ASPs unbekannter Funktion (LEE *et al.*, 1995). Die Induktion von *rpoS* bei einem Säureschock scheint von einem 38 kDa-Protein, daß von *mviA* (mouse virulence gene A) kodiert wird, kontrolliert zu werden. MviA kontrolliert die Akkumulation von RpoS und den RpoS-abhängigen ASPs, indem es in der Abwesenheit von Streß den proteolytischen Turnover von RpoS aktiviert. (BEARSON *et al.*, 1997). RpoS ist ein wichtiger physiologischer Transkriptionsregulator, der in der stationären Phase aktiv ist. Die RpoS-abhängige Säuretoleranz resultiert in einer Kreuzprotektion gegenüber einer Vielzahl anderer exogener Noxen (incl. Hitze, Wasserstoffperoxid und hoher Osmolarität). Umgekehrt bewirkt die Adaptation an andere Streßsituationen keine signifikante Säuretoleranz. Bei der RpoS-abhängigen Säuretoleranzentwicklung handelt sich also um ein eigenständiges Phänomen und nicht einfach um einen Teil eines generell wirksamen Anpassungsvorganges (LEE *et al.*, 1995).

### 2.3.6 Auswirkung der Salmonellen-Besiedlung auf die infizierten Wirtszellen

*Salmonella*-Keime induzieren sowohl in Makrophagen, als auch in epithelialen Zellen Apoptose (MONACK *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1998). Der apoptotische Zelltod ist ein hoch regulierter, aktiver Prozeß, der durch komplexe Signalkaskaden reguliert wird (McCONKEY & ORRENIUS, 1994). Er dient dazu, überalterte oder defekte Zellen aus dem Organismus zu entfernen und ist mit einer erhöhten Mitoserate gekoppelt, um die Zellanzahl konstant und die Gewebe-Homöostase aufrecht zu erhalten (HALL *et al.*, 1994). Die Apoptose ist damit etwas grundsätzlich anderes als die Nekrose. Sie ist durch typische morphologische Abläufe gekennzeichnet: Die Zelle schrumpft, die Zellmembran bekommt blasige Auswüchse, das Chromatin kondensiert und die DNS im Zellkern wird fragmentiert. Letztendlich spaltet sich die Zelle in intakte, membranumschlossene Vesikel (die sogenannten "Apoptose-

Körperchen") auf, die von den umgebenden Epithelzellen oder Phagozyten phagozytiert werden (JONES & GORES, 1997). Man glaubt, daß die Induzierung der Apoptose in befallenen Wirtszellen *Salmonella* zwei entscheidende Vorteile im Infektionsprozeß bietet: Zum einen entgehen Salmonellen durch eine Abtötung der Wirtszelle einer effektiven Abwehr und zum anderen können Salmonellen nach erfolgter intrazellulärer Replikation durch die Apoptose der Wirtszellen extrazelluläre Räume erreichen und benachbarte Zellen befallen (LINDGREN & HEFFRON, 1997).

Die *Salmonella*-induzierte Apoptose in Makrophagen tritt spätestens 4 - 8 h nach Eintritt der Salmonellen auf. Sie ist jedoch auch von der Wachstumsphase abhängig. So induzieren *in vitro* angezüchtete Keime von *S.*Typhimurium, die sich im Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase befinden, bereits 30 - 60 min nach Infektion von BAC-1.2F5-Makrophagen in 90 % dieser Makrophagen eine Apoptose (CHEN *et al*., 1996; LUNDBERG *et al*., 1999).

Die *Salmonella*-induzierte Apoptose in Makrophagen ist an das Typ-III-Sekretionssystem von SPI1 gekoppelt. *S.*Typhimurium-Stämme, die kein Membran-"Ruffling" hervorrufen oder Stämme mit Mutationen in *invJ, spaO, sipB*, *sipC* oder *sipD* induzieren keine Apoptose in J774A.1- bzw. RAW264.7- oder KM-MP (MONACK *et al*., 1996; CHEN *et al*., 1996). Die experimentelle Mikroinjektion des vom SPI1-Sekretionssystem sezernierten Effektorproteins SipB in diese Makrophagen führt zur Apoptose der Zellen. SipB allein ist also ausreichend, um diese Makrophagen apoptotisch werden zu lassen. SipB befindet sich bereits kurz nach der Infektion außerhalb der Salmonellen-haltigen Phagosomen im Zytoplasma der Wirtsmakrophagen. Es bindet hier direkt an Caspase-1 (Cystein-Protease, die Aspartat im Substratmolekül erkennt), deren Aktivierung notwendig ist, um die Apoptose auszulösen (HERSH *et al*., 1999).

Die durch *S.*Dublin- bzw. *S.*Typhimurium-Keime induzierte Apoptose in epithelialen Zellen (HT-29 und Caco-2) geschieht deutlich langsamer als in Makrophagen. Erst 12 - 18 h nach der Salmonellen-Infektion lassen sich in den Zellen apoptotische Veränderungen beobachten. Zur Ausbildung der Apoptose bedarf es der bakteriellen Invasion, zur maximalen Induktion der Apoptose auch der intrazellulären Replikation. Die vermehrte Produktion des Tumor-

Nekrose Faktors TNF-α sowie des Stickstoff-Oxids spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Salmonellen-induzierten Epithelzell-Apoptose (KIM *et al*., 1998).

# 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

## 3.1 Material und Methoden

Die Zusammensetzung der Kulturmedien und Puffer wird im Anhang unter 8.2 aufgelistet.

### 3.1.1 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

#### 3.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Charakterisierung von Adhäsivität, Invasivität und intrazellulärer Überlebensfähigkeit fanden die in Tabelle 1 aufgeführten Stämme von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Verwendung.

#### 3.1.1.2 Anzuchtbedingungen

Die Aufbewahrung der *Salmonella*-Stämme erfolgte in NB I-Stichagar bei 4 °C. Die Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen auf Blutagar- und auf Gassner-Nährböden ausgestrichen und hinsichtlich Identität und Reinheit geprüft.

Für die Untersuchungen in den Zellkulturen wurden die *Salmonella*-Stämme in jeweils 5ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelinkubiert (Schüttelinkubator Typ KS 500, Fa. Janke und Kunkel, 120 U/min). Am nächsten Tag wurden 50 µl der Bakterien-suspensionen in jeweils 5 ml frischem LB-Medium weitergezüchtet (180 U/min). Nach 2,5 h wurden die Kulturen auf Eis gekühlt. Nachdem die Keimkonzentrationen in diesen Bakterien-kulturen photometrisch ermittelt worden waren, wurden die Bakterien abzentrifugiert (8100 x g, 10 min) und anschließend in Zellkulturmedium 2 resuspendiert. Dabei wurden die Bakteriensuspensionen auf definierte Keimkonzentration eingestellt.

TABELLE 1: Verwendete *Salmonella enterica*-Stämme

| Serovar | Stamm | Herkunft | Eigenschaften[2] |
|---|---|---|---|
| Typhimurium | SL 1344 | Vancouver[1] | invasiver Referenzstamm<br>Plasmide: 64; 57 |
| Typhimurium | SB 147 | New York[3] | *invA*$^-$-Mutante (Referenzstamm)<br>Plasmide: n.u. |
| Typhimurium | "MOSKAU" | Dessau[4] | Wildtypstamm<br>Plasmide: 62<br>*invA*$^+$, *spvC*$^+$ |
| Typhimurium | "ZOOSALORAL H" | Dessau[4] | Impfstamm<br>auxotrophe Mutante des *S*.Typhimurium "MOSKAU" (Adenin$^-$, His$^-$)<br>Plasmide: 62<br>*invA*$^+$, *spvC*$^+$ |
| Gallinarum | 1910/93 | BgVV[6] | Wildtypstamm<br>Plasmide: 56; 2,5; 1,6; 1,5 |
| Gallinarum | 9R "NOBILIS" | ATCC[5] | Impfstamm<br>Plasmide: 54; 1,55<br>*invA*$^+$, *spvC*$^+$ |
| Dublin | 442/012 | Dessau[4] | Wildtypstamm<br>Plasmide: 50<br>*invA*$^+$, *spvC*$^+$ |
| Dublin | "BOVISALORAL" | Dessau[4] | auxotrophe Mutante des *S*.Dubl 442/012 (Pur$^-$, Thia$^-$)<br>Plasmide: 49<br>*invA*$^+$, *spvC*$^+$ |

1 = B. Brett Finlay, University of British Columbia, Vancouver, 1994

2 = Angabe der Plasmidgröße in MDa

3 = Jorge E. Galán, Stony Broke, New York, 1994

4 = Hans-Joachim Selbitz, Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH, 1994

5 = American Type Culture Collection, 1993

6 = Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Jena, 1995

n.u. = nicht untersucht

### 3.1.2 Zellarten und Anzuchtbedingungen

#### 3.1.2.1 Verwendete Zellarten

Zur Charakterisierung von *Salmonella*-Stämmen wurden drei verschiedene Zellkultur-Monolayer verwendet.

Bei den **HEp-2-Zellen** handelte es sich um eine permanente Zellinie aus menschlichen epitheloiden Larynxkarzinomzellen. Die Zellinie wurde von der American Type Culture Collection (Nr. CCL23) bezogen.

Die **Fetalen Kälber-Lungen-Zellen (FKL-Zellen)** waren mittels Trypsinierungsverfahren aus dem Lungengewebe eines am Schlachthof steril entnommenen Rinderfetus gewonnen worden und wurden bis zur Weiterzüchtung *in vitro* in flüssigem Stickstoff gelagert.

Adhärent wachsende **Fibroblastenkulturen aus Hühnerembryonen (HEF-Zellen)** waren mittels Trypsinierungsverfahren aus Hühnerembryonen (10 - 11 Tage bebrütete Valo-Eier, Fa. Lohmann, Cuxhaven) hergestellt worden.

#### 3.1.2.2 Anzuchtbedingungen

Alle drei Zellarten wurden in Polystyrolkulturflaschen (250 ml, 75 $cm^2$, Fa. Nunc) kultiviert und vermehrt (37 °C, 5 % $CO_2$ und Wasserdampfsättigung). Bei Ausbildung eines Monolayers wurden Subkulturen hergestellt. Dazu wurde der Monolayer zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und dann mit einem Gemisch aus 5 ml Trypsin-Fertiglösung (0,25 %, Fa. Gibco) und 5 ml EDTA (0,2 % in HEPES-Puffer) 10 min bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (202 x g) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und in frischem Zellkulturmedium 1 resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung (s. unter 3.1.4) wurden ca. 1,5 x $10^5$ Zellen in 10 ml Zellkulturmedium 1 suspendiert und erneut ausgesät.

**HEp-2-Zellen:**

Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturmedium 1 vermehrt. Dann wurden sie in 30 Portionen von je ca. $1 \times 10^6$ Zellen in je 1 ml Einfriermedium bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen je einer Portion wurden die Zellen in Zellkulturmedium 1 kultiviert und bei Ausbildung eines Monolayers subkultiviert. In den Zellkulturtests fanden Zellen aus der 2. bis 20. Subkultur Verwendung.

**FKL-Zellen:**

Die FKL-Zellen wurden nach dem Auftauen in Zellkulturmedium 1 kultiviert. Da die FKL-Zellen jedoch mit jeder Passage an Größe abnahmen, fanden in den Tests ausschließlich Zellen aus der dritten Subkultur Verwendung.

**HEF-Zellen:**

Die HEF-Zellen wurden in Zellkulturmedium 3 gezüchtet. HEF-Zellen wurden 2 - 3 Tage nach der Herstellung in der ersten Subkultur verwendet.

Alle Zellkulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C, 5 % $CO_2$ und Wasserdampfsättigung kultiviert und inkubiert.

### 3.1.3 Bestimmung der Keimkonzentration

Die Bestimmung der Keimkonzentration in *Salmonella*-Bouillonkulturen erfolgte über die Bestimmung der $OD_{600}$ (= optische Dichte bei 600 nm) und Umrechnung mittels der im Oberflächenverfahren ermittelten Korrelation zwischen der $OD_{600}$ und der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten pro ml. Danach errechnete sich die Salmonellenkonzentration nach folgender Formel: $\text{Keimkonzentration [KbE/ml]} = OD_{600} \times 10^9$.

### 3.1.4 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 20 µl der fraglichen Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau-Lösung gemischt und in die vorbereitete Zählkammer gegeben. Es wurden vier große Quadrate ausgezählt. Der Mittelwert der ermittelten Zellzahlen multipliziert mit $10^5$ ergab die Anzahl der Zellen pro ml Ausgangssuspension.

### 3.1.5 Bestimmung der Vitalität von Zellkulturen (MTT-Test)

Der Einfluß von Gentamicin auf die Vitalität von Zellkulturen wurde an deren Fähigkeit gemessen, das Substrat Methylthiazol-Tetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan zu reduzieren (GREEN *et al.*, 1984). Der MTT-Test wurde in Anlehnung an die Version von TADA *et al.* (1996) durchgeführt. Es wurden zwei Testformate entwickelt: ein Kurzzeittest (MTT-Test über vier Stunden) und ein Langzeittest (MTT-Test über acht Tage).

96-Loch-Mikrotiterplatten (F-Form, Fa. Nunc) wurden mit $3 \times 10^4$ (MTT-Test über vier Stunden) bzw. $1 \times 10^4$ (MTT-Test über acht Tage) Zellen in Zellkulturmedium 2 beschickt (200 µl/Vertiefung) und für zwei Tage inkubiert. Danach wurden die Monolayer zweimal mit HEPES-Puffer (150 µl/Vertiefung) gewaschen. Die weiteren Arbeitsschritte differierten voneinander und werden daher unter 3.1.5.1 und 3.1.5.2 getrennt beschrieben. Die Testauswertung erfolgte bei beiden Testformaten wieder einheitlich. Dazu wurde der MTT-Umsatz in jeder Vertiefung durch Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (10 %w in 0,01N HCl) gestoppt. Zur Lösung der Formazankristalle wurden die Mikrotiterplatten für 12 h schüttelinkubiert (Schüttelinkubator Typ KS 500, Fa. Janke und Kunkel, 120 U/min). Anschließend wurde die optische Dichte der Reaktionslösungen in einem Plattenphotometer (Multiscan MCC 340, Fa. Flow Laboratories) bei einer Testwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

#### 3.1.5.1 MTT-Test über vier Stunden

Den gewaschenen Monolayern wurden jeweils 100 µl Zellkulturmedium 2 mit Gentamicin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (0, 100, 200 und 400 µg/ml) und gleichzeitig je 25 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS). Danach wurden die Platten wieder inkubiert. Jeweils nach 1, 2, 3 und 4 Stunden wurde in je einem Viertel der Vertiefungen die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl SDS (10 %w in 0,01N HCl) abgestoppt.

#### 3.1.5.2 MTT-Test über acht Tage

Vier 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden in identischer Weise beschickt. Den gewaschenen Monolayern wurde pro Vertiefung 200 µl Zellkulturmedium 2 mit Gentamicin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (0, 100, 200 und 400 µg/ml). Nach 2, 4, 6 und 8 Tagen Inkubation wurde jeweils eine Mikrotiterplatte zur Messung der Vitalität herangezogen. Bei den verbleibenden Platten wurde das Medium gewechselt (200 µl Zellkulturmedium 2 mit Gentamicin in der jeweils entsprechenden Konzentration pro Vertiefung). Bei der zur Bestimmung der Gentamicin-Empfindlichkeit herangezogenen Platte wurden pro Vertiefung je 125 µl Medium durch 25 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) ersetzt. Nach erneuter Inkubation für 4 h wurde die Reaktion abgestoppt.

### 3.1.6 Bestimmung der Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe

#### 3.1.6.1 Agardiffusionstest

Die *Salmonella*-Stämme wurden im Agardiffusionstest nach DIN 58940 auf ihre Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffe untersucht. Dazu wurden die Stämme für ca. 16 h in Müller-Hinton-Bouillon angezüchtet und anschließend im Verhältnis 1:50 in frische Müller-Hinton-Bouillon überimpft. Nach einer Schüttelinkubation (Schüttelinkubator Typ KS 500, Fa. Janke und Kunkel, 180 U/min, ca. 5 h, 37 °C) wurde die $OD_{600}$ bestimmt und die Bakterien-Suspensionen durch Zugabe von Müller-Hinton-Bouillon auf eine Keimkonzentration von $3 \times 10^6$ Keimen/ml gebracht.

Von diesen Suspensionen wurden je 100 µl auf Müller-Hinton-Agar-Platten ausgestrichen. Nach Antrocknung wurden die wirkstoffhaltigen Plättchen (Sensi-Disc®, Fa. Becton Dickinson) aufgelegt. Nach einer Inkubation (37 °C, 18 ± 2 h) wurden die Durchmesser der Hemmhöfe ausgemessen und wie in Tabelle 2 angegeben bewertet. Die Bewertung erfolgte anhand der Hemmzonentabelle der Sensi-Disc®-Produktgruppe (Fa. Becton-Dickinson).

#### 3.1.6.2 Bouillonverdünnungstest

Die MHK-Werte von Gentamicin gegenüber den *Salmonella*-Stämmen wurde im Bouillonverdünnungstest nach DIN 58940 in 96-Loch-Mikrotiterplatten ermittelt. Die Platten wurden zu diesem Zweck mit Gentamicin-haltiger Müller-Hinton-Bouillon beschickt (100 µl Bouillon/Vertiefung). Diese Lösung wies eine pro Reihe in log2-Stufen abnehmende Gentamicin-Konzentration auf (96 µg/ml - 0,1875 µg/ml). Eine Reihe der Mikrotiterplatte blieb für die Wachstumskontrolle der Bakterien, eine andere als Sterilkontrolle für das Medium, wirkstofffrei. Die Bakterien wurden in Müller-Hinton-Bouillon angezüchtet (Schüttelinkubation, 37 °C, 16 - 18 h). Am nächsten Morgen wurden die Bakteriensuspensionen auf eine Konzentration von ca. $1 \times 10^7$ KbE/ml eingestellt. Anschließend wurde jede Vertiefung der Mikrotiterplatte (mit Ausnahme der Sterilkontrollen) mit 100 µl dieser Bakteriensuspensionen beschickt. Dann erfolgte eine Inkubation von 20 ± 2 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Als MHK wurde diejenige Wirkstoffkonzentration ermittelt, bei der optisch sichtbares Bakterienwachstum gerade noch verhindert wurde.

#### 3.1.6.3 Bestimmung der Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchslösung

Die zu untersuchenden *Salmonella*-Stämme wurden in jeweils 5 ml LB-Medium angezüchtet (37 °C, Schüttelinkubation, 16 - 18 h). Aus dieser Kultur wurden je 50 µl in 5 ml frisches LB-Medium überimpft und weitergezüchtet (37 °C, Schüttelinkubation bei 180 U/min, 2,5 h). Die Bakterien wurden bei ca. 8100 x g abzentrifugiert in Zellkulturmedium 2 resuspendiert. Dabei wurden pro Stamm zwei Suspensionen mit unterschiedlicher Keimdichte ($2 \times 10^3$ und $2 \times 10^7$ KbE/ml) hergestellt.

Zu je 500 µl dieser Suspensionen wurden je 500 µl Zellkulturmedium 2 mit Gentamicin (200 µg/ml) gegeben. Diese Testansätze wurden bei 37 °C für 1 h aerob inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (8100 x g), in je 100 µl Zellkulturmedium 2 resuspendiert und auf TSA ausplattiert. Nach Inkubation (37 °C, 18 - 20 h) wurde die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

### 3.1.7 Lichtmikroskopische Untersuchungen (Giemsa-Test)

Zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung der Adhäsivität von Salmonellen wurde der Giemsa-Test nach CRAVIOTO *et al*. (1979) in 24-Loch-Platten (F-Form, Fa. Nunc) durchgeführt. Zunächst legte man pro Vertiefung der Platte je ein steriles rundes Deckgläschen (∅ 12 - 13 mm) ein. Diese beschickte man mit jeweils 1 ml Zellkulturmedium 2 mit einer Zellkonzentration von 1,5 x $10^5$ Zellen/ml (HEF-Zellkulturen erhielten obligatorisch einen Zusatz von 50 µg Gentamicin pro ml Medium). Die so vorbereitete Platte wurde 48 h inkubiert. Die Monolayer wurden danach zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen (1 ml/Vertiefung) und mit Bakterien infiziert (500 µl Bakteriensuspension in Zellkulturmedium 2 pro Vertiefung; MOI 100, d.h. 100 KbE pro Wirtszelle). Nach Inkubation (37 °C, 3 h) und drei erneuten Waschschritten mit HEPES-Puffer (ca. 1 ml/Vertiefung) wurden die Monolayer mit 99 %-igem Methanol fixiert (10 min bei RT). Nach erneutem Waschen (PBS; 3x 1 ml/Vertiefung) wurden die Zellen mit der vorbereiteten Giemsa-Färbelösung 30 - 45 min bei RT gefärbt (500 µl/Vertiefung). Die runden Deckgläschen wurden danach jeweils zweimal in 100 %-iges Aceton, in 66/33 Aceton/Xylol, 50/50 Aceton/Xylol und zum Abschluß einmal in 100 %-iges Xylol eingetaucht. Die Präparate trockneten kurz an und wurden dann mittels Entellan® (Fa. Merck) auf Objektträgern fixiert. Nach Aushärtung des Eindeckmittels erfolgte die Untersuchung der Präparate im Lichtmikroskop bei 400-facher und 1000-facher Vergrößerung.

### 3.1.8 Gentamicin-Invasionstest

#### 3.1.8.1 Test auf Adhäsivität und Invasivität

Die Arbeitsschritte beim Gentamicin-Invasionstest zur quantitativen Bestimmung von Adhäsivität und Invasivität der Salmonellen sind in Abbildung 1 in einem Flußdiagramm graphisch dargestellt. Jeweils zwei 96-Loch-Mikrotiterplatten (F-Form, Fa. Nunc) wurden zusammen in identischer Weise beschickt: Die Platten wurden zunächst mit Zellen beladen ($3 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung in Zellkulturmedium 2). Die HEF-Zellkulturen erhielten noch 50 µg/ml Gentamicin. Nach der Inkubation (48 h) wurden die Monolayer zweimal mit HEPES-Puffer (ca. 150 µl/Vertiefung) gewaschen. Im Sechsfach-Ansatz wurden pro Vertiefung Bakterien in 200 µl Zellkulturmedium 2 (MOI 100) zugegeben. Die Platten wurden erneut inkubiert (3 h). Aus Platte 1 wurde der bakterienhaltige Kulturüberstand zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl gewonnen, bevor man beide Platten mit HEPES-Puffer wusch (3 x 150 µl/Vertiefung). Platte 1 diente auch der Bestimmung der intrazellulären Keime (Anzahl der KbE, die von Gentamicin nicht getötet wurden). Hier erfolgte die Zugabe von Zellkulturmedium 2 + 100 µg Gentamicin/ml (200 µl/Vertiefung). Platte 1 wurde nochmal inkubiert (1,5 h). Platte 2 wurde erneut 3 x gewaschen (ca. 150 µl PBS/Vertiefung). Anschließend wurden die Zellen mit Triton-X-100 lysiert (1 % in PBS; 200 µl/Vertiefung; 5 min bei RT; 1 h auf Eis). Nach Ablauf der 1,5-stündigen Inkubationszeit wurde mit Platte 1 identisch verfahren. Die Lysate sowie die vorher gewonnenen bakterienhaltigen Überstände wurden dann in log5-Stufen mit PBS verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf TSA ausplattiert. Nach Inkubation (18 ± 2 h) wurden die Kolonien ausgezählt und daraus die Anzahl lebender Bakterien pro Vertiefung zum Zeitpunkt der Zell-Lyse errechnet (KbE/Vertiefung). Man erhielt hier drei Parameter:

- intrazelluläre Keime = Anzahl der Keime nach Gentamicin-Einwirkung (KbE/Vertiefung)
- zellassoziierte Keime = Anzahl der Keime in den Ansätzen ohne Gentamicin-Einwirkung (= intrazelluläre Keime + zelladhärente Keime; KbE/Vertiefung)
- Gesamtkeimzahl = Anzahl der zellassoziierten Keime + Anzahl der Keime im Überstand (KbE/Vertiefung)

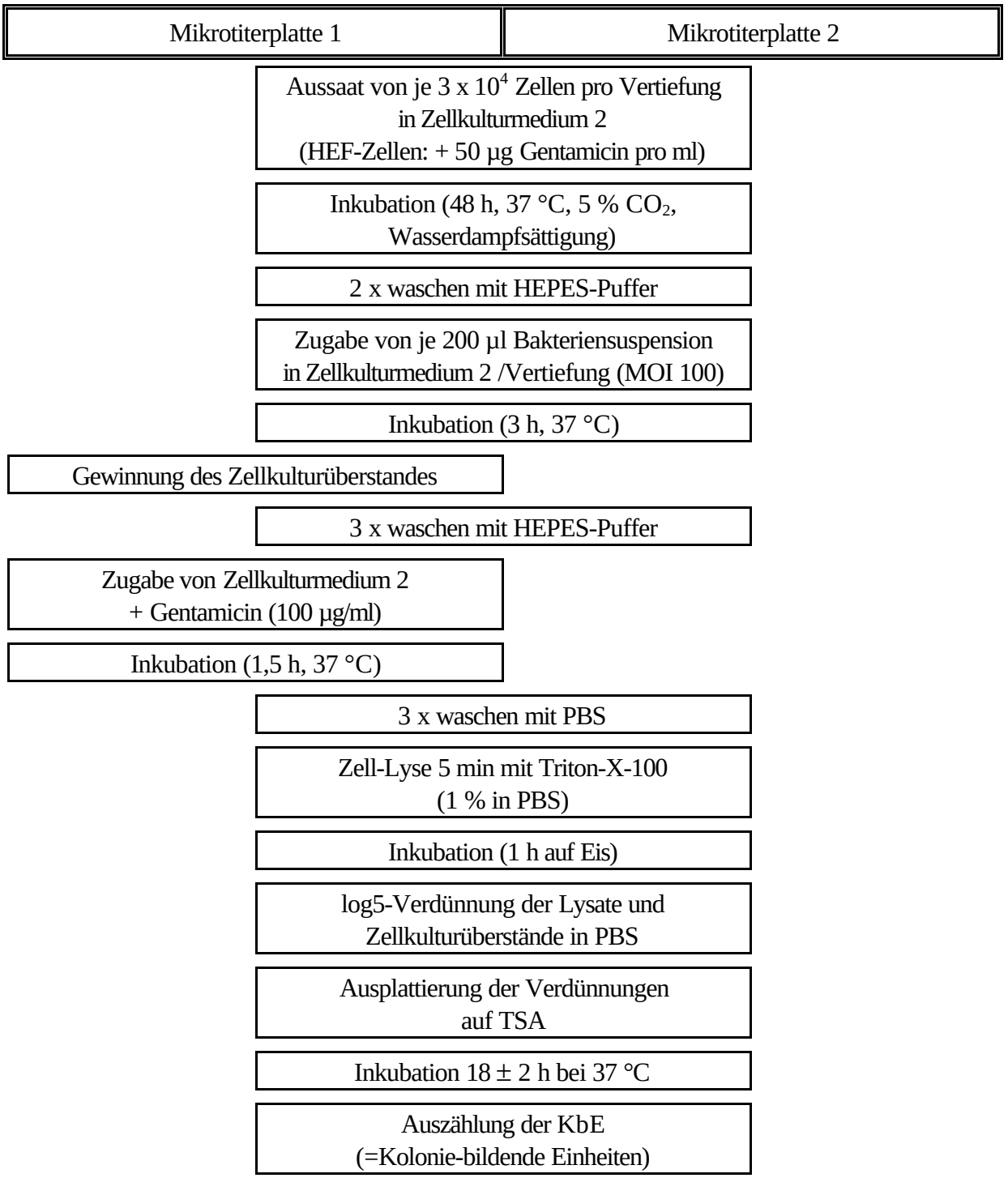



**Abbildung 1** Vorgehensweise beim Gentamicin-Invasionstest zur Bestimmung von Adhäsivität und Invasivität von Salmonellen

#### 3.1.8.2 Test auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit

Bei dem Gentamicin-Invasionstest zur quantitativen Bestimmung der intrazellulären Überlebensfähigkeit der Salmonellen wurde eine Woche lang täglich die Anzahl der intrazellulären Bakterien ermittelt. Der Test wurde modifiziert nach 3.1.8.1 parallel in acht 24-Loch-Mikrotiterplatten (F-Form, Fa. Nunc) durchgeführt. Die Bakterienzugabe erfolgte im Dreifach-Ansatz. Dabei wurde die MOI nach den Erfahrungswerten aus dem Gentamicin-Invasionstest so variiert, daß die Anzahl der intrazellulär zu erwartenden Bakterien nach der dreistündigen Inkubation zwischen den einzelnen *Salmonella*-Stämmen möglichst nicht differierte. Nach Inkubation (3 h) wurden alle Platten gewaschen (6 x 1 ml HEPES-Puffer/Vertiefung). Aus Platte 1 wurde wie unter 3.1.8.1 beschrieben die Anzahl der intrazellulären Bakterien pro Vertiefung am Tag 0 bestimmt. Die Platten 2 - 8 wurden mit je 1ml Zellkulturmedium 2 + 100 µg Gentamicin (HEF-Zellkulturen nur 20 µg) pro Vertiefung beschickt. Die Bestimmung der intrazellulären Keimzahl wurde alle 24 h mit einer anderen Platte wiederholt. Die jeweils noch nicht zur Keimzahlbestimmung herangezogenen Mikrotiterplatten wurden inkubiert. Bei diesen Platten erfolgte alle zwei Tage ein vorsichtiger Mediumwechsel (Zellkulturmedium 2 + 100 µg Gentamicin/ml [HEF-Zellkulturen nur 20 µg Gentamicin/ml]). Aus den Werten für die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde ein Überlebensindex berechnet. Dazu wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Überlebensindex} = \frac{\text{Anzahl der intrazellulären Bakterien am Tag X}}{\text{Anzahl der intrazellulären Bakterien am Tag 0}} \times 100$$

### 3.1.9 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität. Die Signifikanzen für die stammspezifischen Unterschiede in Bezug auf Adhäsivität und Invasivität zwischen Impfstamm und korrespondierendem Wildtypstamm wurden durch den t-Test für verbundene Stichproben ermittelt. Eine Unterschiedswahrscheinlichkeit von $p \leq 0{,}001$ wurde als hochsignifikant, $p \leq 0{,}01$ als signifikant, $p \leq 0{,}05$ als schwach signifikant und $p > 0{,}05$ als nicht signifikant festgelegt.

# 3.2 Ergebnisse

## 3.2.1 Vermehrungskinetik der verwendeten Bakterienstämme

### 3.2.1.1 Vermehrungskinetik in LB-Medium

Das Vermehrungsverhalten der *Salmonella*-Stämme wurde über die stündliche Messung der optischen Dichte ermittelt. Ziel der Untersuchung war die Standardisierung der im Gentamicin-Invasionstest eingesetzten *Salmonella*-Stämme in Bezug auf die Vermehrungsphase. Das Ergebnis ist in **Abbildung 2** graphisch dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h befanden sich alle *Salmonella*-Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase (s. Pfeil). Sie konnten zu diesem Zeitpunkt unter vergleichbaren Voraussetzungen für den Gentamicin-Invasionstest Verwendung finden.

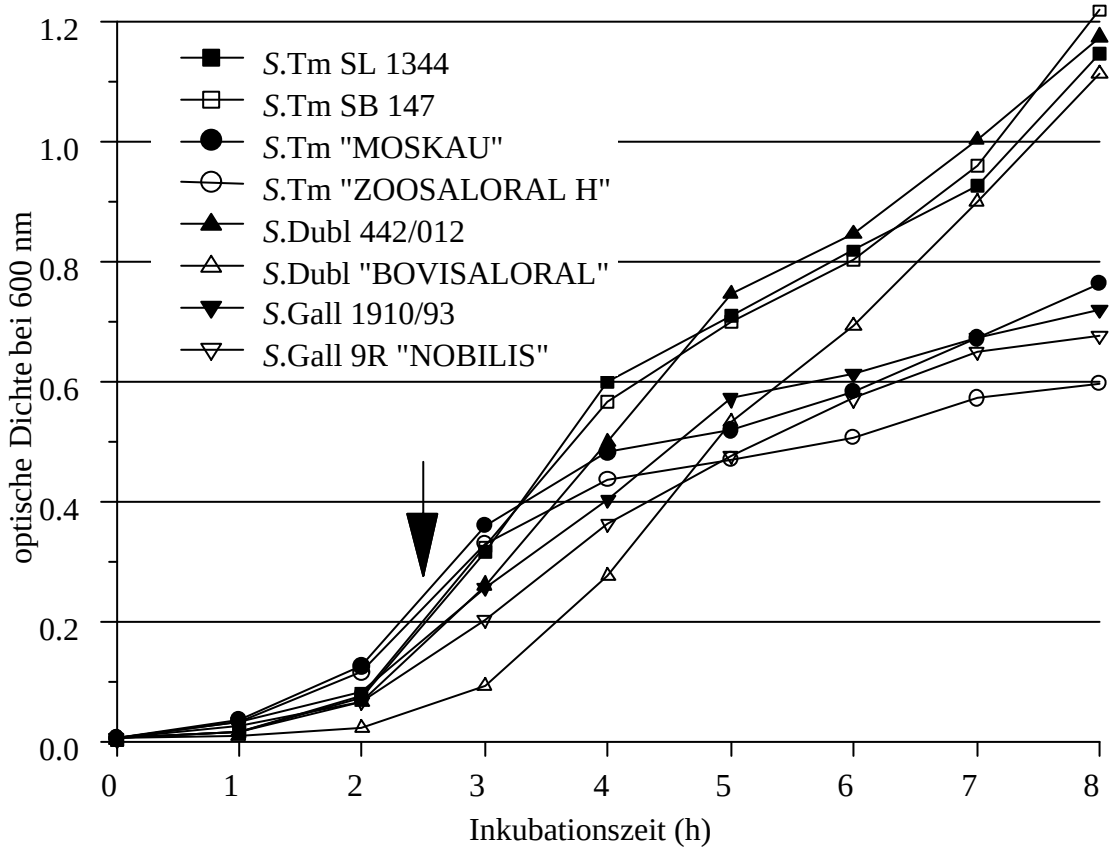



**Abbildung 2** Vermehrung von *Salmonella*-Stämmen in LB-Medium

### 3.2.1.2 Vermehrungskinetik in konditioniertem Zellkulturmedium

Das Vermehrungsverhalten der *Salmonella*-Stämme in konditioniertem Zellkulturmedium 2 (= Zellkulturmedium 2, das 2 Tage mit HEp-2-Monolayern inkubiert wurde), wurde über die stündliche Messung der optischen Dichte ermittelt. Mit den Ergebnissen wurden die Resultate des Gentamicin-Invasionstests beurteilt. Es sollte geprüft werden, ob stammspezifische Unterschiede im Gentamicin-Invasionstest durch unterschiedliche Vermehrungseigenschaften im Kulturmedium zustande kommen konnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt.

Kurve 1 zeigt das Vermehrungsverhalten der beiden *S.*Tm-Referenzstämme. Sie vermehrten sich gut im vorliegenden Medium. Kurve 2 zeigt das Vermehrungsverhalten der beiden anderen *S.*Tm-Stämme. Der Stamm *S.*Tm "MOSKAU" konnte sich im konditionierten Zellkulturmedium 2 am besten vermehren, während der aus diesem Stamm hervorgegangene auxotrophe Impfstamm *S.*Tm "ZOOSALORAL H" (Adenin$^-$, His$^-$) für seine Vermehrung keine optimalen Bedingungen vorfand. Die beiden *S.*Dubl-Stämme, die in Kurve 3 dargestellt sind, zeigten trotz Auxotrophie des Impfstammes (Purin$^-$, Thia$^-$) ein vergleichbares Vermehrungsverhalten. Die beiden *S.*Gall-Stämme vermehrten sich im konditionierten Zellkulturmedium 2 sehr langsam (Kurve 4), was im Gentamicin-Invasionstest eine eventuelle Einflußgröße darstellte. Die Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm (*S.*Gall 1910/93) und dem Impfstamm (*S.*Gall 9R "NOBILIS") waren minimal.

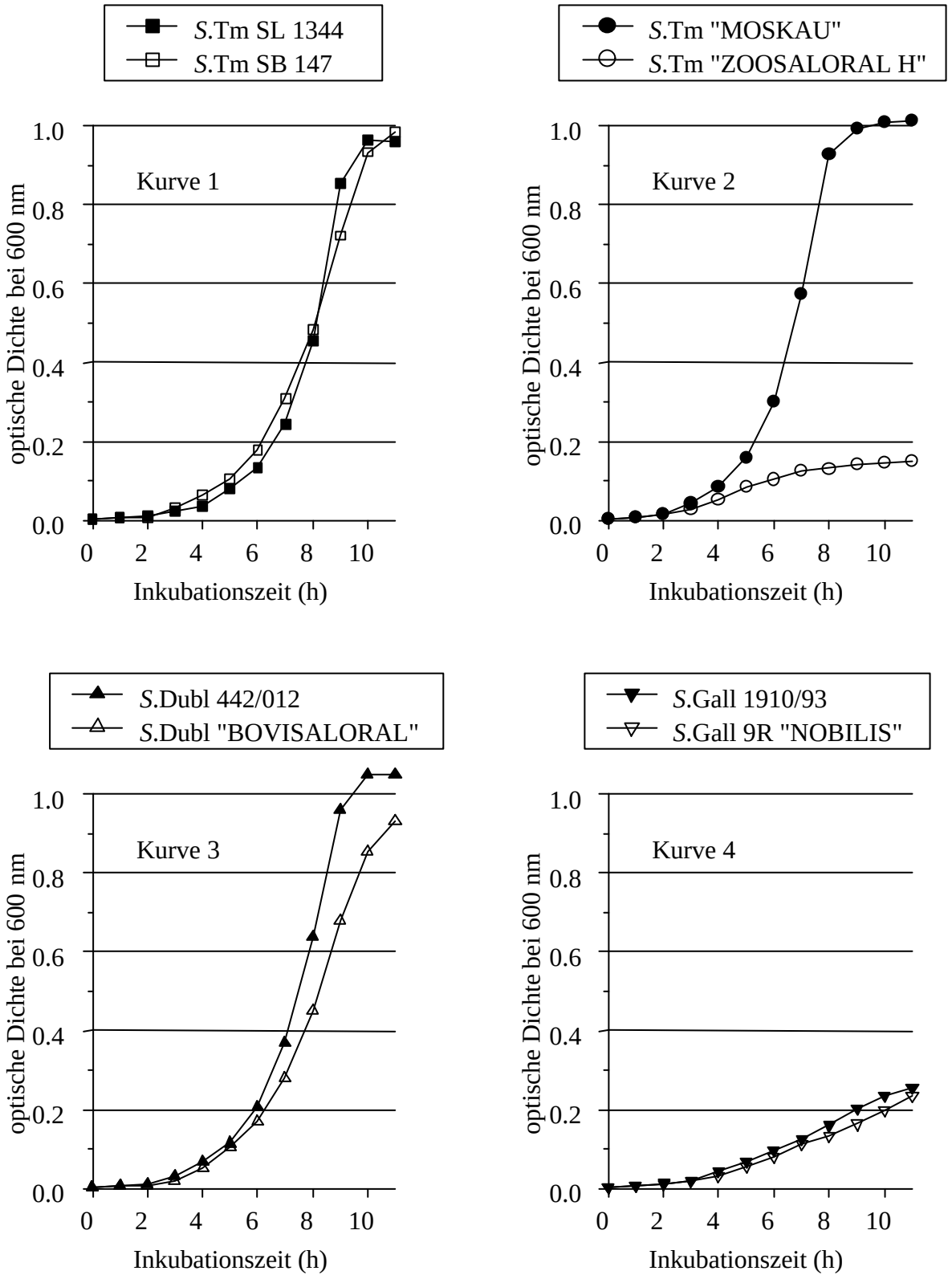



**Abbildung 3** Vermehrung von *Salmonella*-Stämmen in konditioniertem Zellkulturmedium 2

### 3.2.2 Optimierung des Gentamicin-Invasionstests

#### 3.2.2.1 Resistenzspektrum der verwendeten Bakterienstämme

Das Resistenzspektrum aller verwendeten *Salmonella*-Stämme wurde im Agar-Diffusionstest nach DIN 58940 ermittelt. Ziel der Untersuchung war es, ein geeignetes Antibiotikum für den Invasionstest zu finden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Neben anderen Antibiotika und Chemotherapeutika (Chloramphenicol, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Neomicin, Ciprofloxacin und Nitrofurantoin) war auch das allgemein gebräuchliche Antibiotikum Gentamicin zur Inhibition geeignet, da alle eingesetzten *Salmonella*-Stämme auf Gentamicin sensibel reagierten.

Diese Empfindlichkeit wurde durch die Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK) im Bouillonverdünnungstest nach DIN 58940 genauer quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Gentamicin verhinderte bereits in geringen Dosen (≤ 6 µg/ml) die *Salmonella*-Vermehrung. Dabei bestanden zwischen den einzelnen *Salmonella*-Stämmen graduelle Unterschiede. So war der Stamm *S.*Dubl 442/012 mit einer MHK von 6 µg/ml um eine Verdünnungsstufe weniger empfindlich und die beiden *S.*Gall-Stämme mit einer MHK von 0,375 µg/ml bzw. 0,75 µg/ml deutlich empfindlicher als die übrigen Stämme, deren MHK bei 3 µg/ml lag.

#### 3.2.2.2 Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchskonzentration

Die Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchskonzentration wurde unter den Versuchsbedingungen des Gentamicin-Invasionstests untersucht. Dazu wurde eine definierte Anzahl von Bakterien in Zellkulturmedium 2 inkubiert, dem Gentamicin 100 µg/ml zugesetzt wurde (1 h, 37 °C). Anschließend wurde die Anzahl der noch lebenden Keime bestimmt (KbE/ml). Das Ziel der Untersuchung war es zu prüfen, ob die Gentamicin-Gebrauchskonzentration unter den gewählten Versuchsbedingungen des Invasionstests ausreichend bakterizid war. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Bei einer Ausgangsmenge von $1 \times 10^3$ KbE tötete das Gentamicin sämtliche Salmonellen ab. Bei einer Ausgangsmenge von $1 \times 10^7$ KbE konnten nicht alle Bakterienzellen abgetötet werden. Der Anteil der überlebenden Zellen lag jedoch weit unter ein Promille. Der durch die unvollständige Wirkung des Gentamicins zu erwartende Versuchsfehler im Invasionstest war daher zu vernachlässigen.

TABELLE 2: Resistenzspektren von *Salmonella*-Stämmen im Agardiffusionstest nach DIN 58940

| **eingesetzter Wirkstoff** | ***In-vitro*-Empfindlichkeit** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (Wirkstoffmenge je Testplättchen in µg) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Choramphenicol (30) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Streptomycin (25) | – | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Ampicillin (10) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| Tetracyclin (30) | + | + | ++ | + | – | – | ++ | – |
| Triplesulfa (25) | – | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | – | ++ |
| Sulfamethoxazol / Trimethoprim (23,75 + 1,25) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Amoxicillin / Clavulansäure (30) | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + |
| Mezlocillin (30) | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Kanamicin (30) | ++ | – | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Neomicin (30) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Gentamicin (10) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Ciprofloxacin (5) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Penicillin (10) | – | – | – | – | + | + | + | – |
| Erythromycin (15) | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Polymyxin B (300) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| Nitrofurantoin (100) | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

++ = sensibel
\+ = intermediär
– = resistent

Stamm-Nummern in der Tabelle:

1 = *S.*Tm SL 1344
2 = *S.*Tm SB 147
3 = *S.*Tm "MOSKAU"
4 = *S.*Tm "ZOOSALORAL H"
5 = *S.*Dubl 442/012
6 = *S.*Dubl "BOVISALORAL"
7 = *S.*Gall 1910/93
8 = *S.*Gall 9R "NOBILIS"

TABELLE 3: MHK-Werte von Gentamicin bei *Salmonella*-Stämmen im Bouillonverdünnungstest nach DIN 58940

| **Stammbezeichnung** | **MHK Gentamicin** |
|---|---|
| *S.*Tm SL 1344 | 3,0 µg/ml |
| *S.*Tm SB 147 | 3,0 µg/ml |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 3,0 µg/ml |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 3,0 µg/ml |
| *S.*Dubl 442/012 | 6,0 µg/ml |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 3,0 µg/ml |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,375 µg/ml |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 0,75 µg/ml |

TABELLE 4: Bakterizidie der Gentamicin-Gebrauchskonzentration (100 µg/ml; Einwirkdauer 1 h bei 37 °C)

| **Stammbezeichnung** | **Anzahl der überlebenden Keime (KbE)** | |
|---|---|---|
| | **Ausgangsmenge (KbE)** | |
| | **$1 \times 10^3$** | **$1 \times 10^7$** |
| *S.*Tm SL 1344 | 0 | 5 |
| *S.*Tm SB 147 | 0 | 28 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 0 | 5 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 0 | 3 |
| *S.*Dubl 442/012 | 0 | 8 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 0 | 12 |
| *S.*Gall 1910/93 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 0 | 0 |

### 3.2.2.3 Zellverträglichkeit von Gentamicin

Die Zellverträglichkeit von Gentamicin wurde im MTT-Test ermittelt. In diesem Test wurden Zellmonolayer mit Zellkulturmedium 2 inkubiert, dem Gentamicin in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde (0, 100, 200, 400 µg/ml). Die Einwirkdauer des Gentamicin (4 h bzw. 8 d) wurde so gewählt, daß sie den Inkubationszeiten im Gentamicin-Invasionstest entsprach.

Das Ergebnis des MTT-Tests über 4 h (entspricht der Zeitspanne des Gentamicin-Invasionstests zur Ermittlung der Invasivität) ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Dabei zeigt die Grafik die arithmethischen Mittelwerte aus jeweils sechs Meßwerten eines Versuches inklusive der ermittelten Standardabweichungen (die durch die Meßpunktsymbole teilweise verdeckt werden). Aus den Meßwerten war weder eine konzentrations- noch eine zeitabhängige Beeinflussung der drei Zielzellarten durch das Gentamicin ersichtlich. Ein indirekter Einfluß des Gentamicins auf die Ergebnisse des Gentamicin-Invasionstests aufgrund einer Schädigung der Zielzellen war daher nicht zu erwarten.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis aus dem MTT-Test über acht Tage (entspricht der Zeitspanne des Gentamicin-Invasionstest zur Ermittlung der intrazellulären Persistenz). Auch hier repräsentieren die Werte das arithmethische Mittel und die Standardabweichung der Meßwerte von sechs identischen Testansätzen. Bei den **HEp-2**-Zellen war über die acht Tage weder eine konzentrations- noch eine zeitabhängige Unverträglichkeit festzustellen. Bei den **HEF**-Zellen nahm die Vitalität auch ohne Gentamicin-Zusatz ab dem 6. Tag signifikant ab. In Anwesenheit von Gentamicin trat dieses Phänomen deutlich früher ein (ab dem 4.Tag). Dieser Vitalitätsverlust war bei allen drei getesteten Gentamicinkonzentrationen gleich groß. Bei den **FKL**-Zellen zeigte sich in Anwesenheit von Gentamicin ein von der Einwirkdauer und der Konzentration abhängiger Vitalitätsverlust: Je größer die Gentamicinkonzentration und je länger die Einwirkdauer, desto geringer war die Stoffwechselaktivität der Zellen.

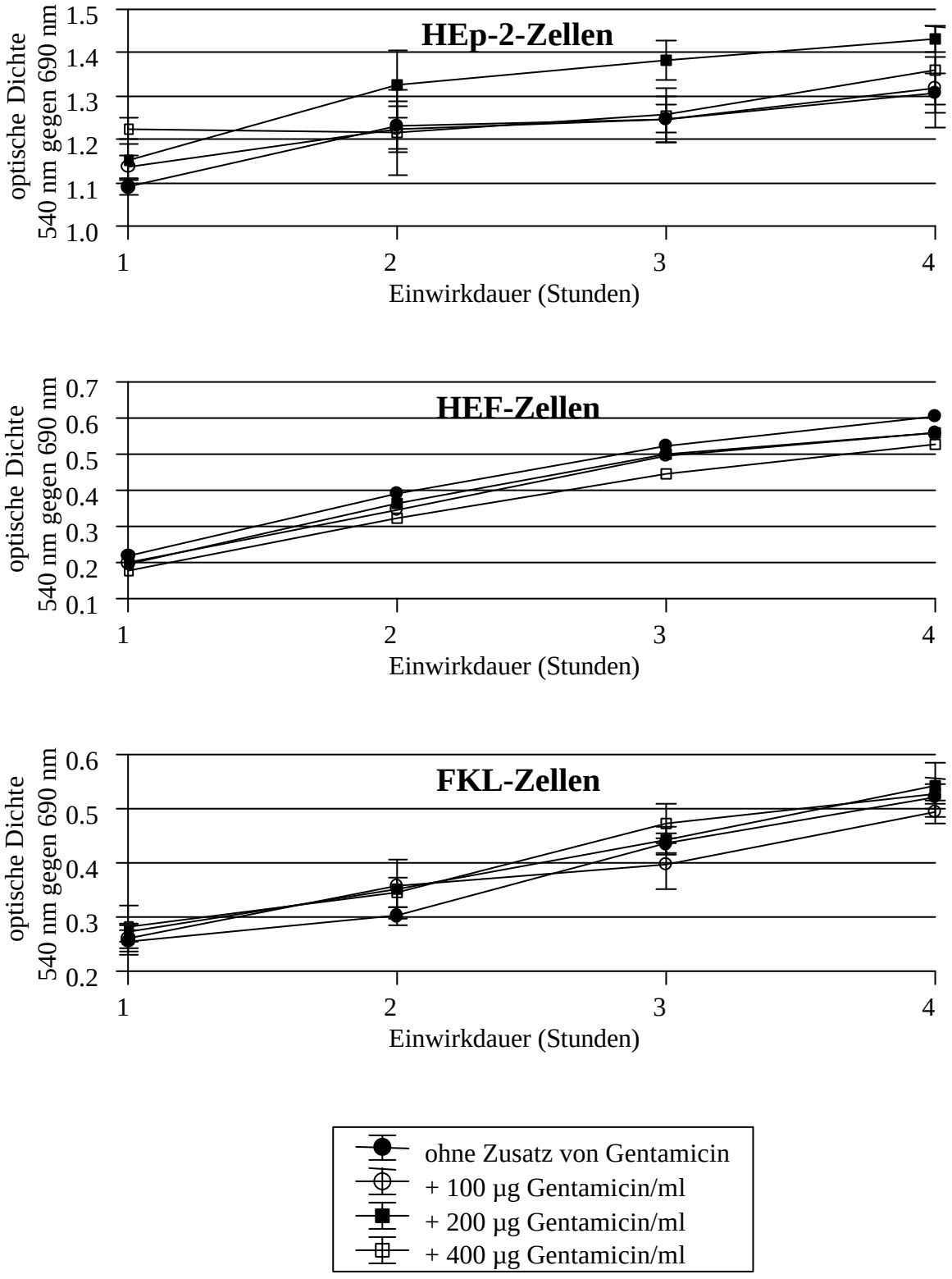



**Abbildung 4** Zellverträglichkeit von Gentamicin im MTT-Test (Einwirkdauer 4 h)

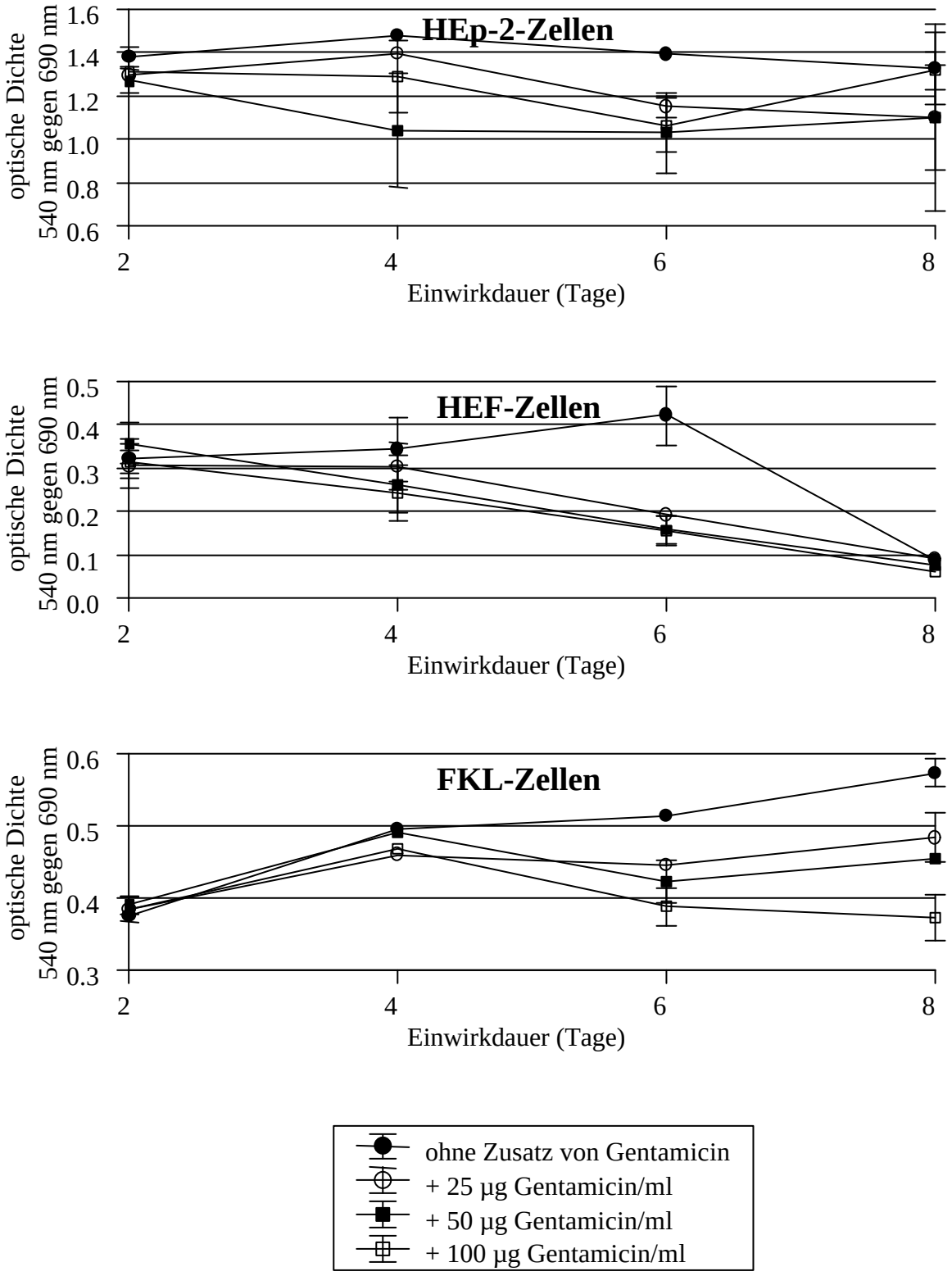



**Abbildung 5** Zellverträglichkeit von Gentamicin im MTT-Test (Einwirkdauer: 8 d)

### 3.2.3 Interaktion von Salmonellen mit Zellkultur-Monolayern

#### 3.2.3.1 Anzahl der intrazellulären Salmonellen bei einer Animpfdosis von MOI 100

Die Anzahl der intrazellulären Salmonellen bei einer Animpfdosis von MOI 100 an den Tagen 1 - 7 (s. Tabellen 5 - 7) errechnete sich, indem man die Zahl der intrazellulären Bakterien am Tag 0 (s. Tabelle 13) mit dem Überlebensindex am jeweiligen Tag X (s. Tabellen 14 - 16) multiplizierte. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien zeigte erste Unterschiede auf, deren Ursprung und Signifikanz in den Abschnitten 3.2.3.3, 3.2.3.4 und 3.2.3.5 herausgearbeitet wurden.

Insgesamt sah man, daß nach dem ersten Tag *post infectionem* die Anzahl der intrazellulären Bakterien grundsätzlich deutlich abnahm. Zudem schien die Anzahl intrazellulärer Bakterien zellabhängig zu sein. So befanden sich in den FKL-Zellen stets deutlich mehr Bakterien als in HEp-2- und HEF-Zellen.

Die höchste Anzahl intrazellulärer Bakterien am Tag 1 war allgemein bei den *S.*Tm-Stämmen nachweisbar. Eine klare Ausnahme bildete hier der Impfstamm *S.*Tm "ZOOSALORAL H", der bereits am Tag 1 in allen drei Zellarten in sehr geringer Anzahl intrazellulär vorhanden war. Auffällig war, daß sowohl der invasive, als auch der *invA*-defekte *S.*Tm-Referenzstamm am Tag 1 in ähnlicher Zahl intrazellulär vorlagen (FKL- und HEF-Zellen). Ähnlich hohe intrazelluläre Werte wie die drei *S.*Tm-Stämme zeigten nur noch *S.*Gall 9R "NOBILIS" und *S.*Dubl "BOVISALORAL" auf HEp-2-Zellen. In den anderen beiden Zellarten lag *S.*Gall 9R "NOBILIS" am Tag 1 in vergleichsweise geringer Zahl vor. Den *S.*Gall-Wildstamm 1910/93 fand man in allen drei Zellarten nur in verschwindend niedrigen Zahlen. Die beiden *S.*Dublin-Stämme zeigten im allgemeinen mittelhohe intrazelluläre Werte. Am Tag 1 war der Impfstamm *S.*Dubl "BOVISALORAL" in HEp-2-Zellen stärker und in FKL- und HEF-Zellen in geringerer Anzahl vertreten als sein Mutterstamm.

TABELLE 5 Intrazelluläre Salmonellen in **HEp-2-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl intrazellulärer Bakterien*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 29,89 | 48,39 | 1,40 | 0,09 | 0,06 | 0,03 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 1,61 | 5,80 | 0,89 | 0,04 | 0,01 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 3,87 | 8,86 | 3,30 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 4,71 | 0,13 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 4,52 | 2,46 | 0,52 | 1,31 | 0,05 | 0,04 | 0,01 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 6,62 | 10,33 | 3,32 | 0,28 | 0,04 | 0,02 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,51 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 77,38 | 12,92 | 0,70 | 0,15 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Anzahl der KbE/Vertiefung x $10^3$ bei Animpfdosis von MOI 100

TABELLE 6 Intrazelluläre Salmonellen in **HEF-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl intrazellulärer Bakterien*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 13,25 | 15,34 | 1,46 | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 4,05 | 11,33 | 1,33 | 0,14 | 0,01 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 2,08 | 4,53 | 0,33 | 0,03 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 0,94 | 0,17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 1,69 | 2,26 | 0,21 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 1,56 | 0,43 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 4,65 | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* Anzahl der KbE/Vertiefung x $10^3$ bei Animpfdosis von MOI 100

TABELLE 7 Intrazelluläre Salmonellen in **FKL-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl intrazellulärer Bakterien*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 78,89 | 113,68 | 23,59 | 4,58 | 2,05 | 0,32 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 19,26 | 114,83 | 39,33 | 10,69 | 3,04 | 0,89 | 0,56 | 0,23 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 30,17 | 184,58 | 45,10 | 11,34 | 3,74 | 1,27 | 0,84 | 0,36 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 21,03 | 4,82 | 0,48 | 0,06 | 0,02 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 31,18 | 27,34 | 2,28 | 0,34 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 7,01 | 8,66 | 0,44 | 0,17 | 0,02 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,10 | 0,07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 9,36 | 3,54 | 0,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

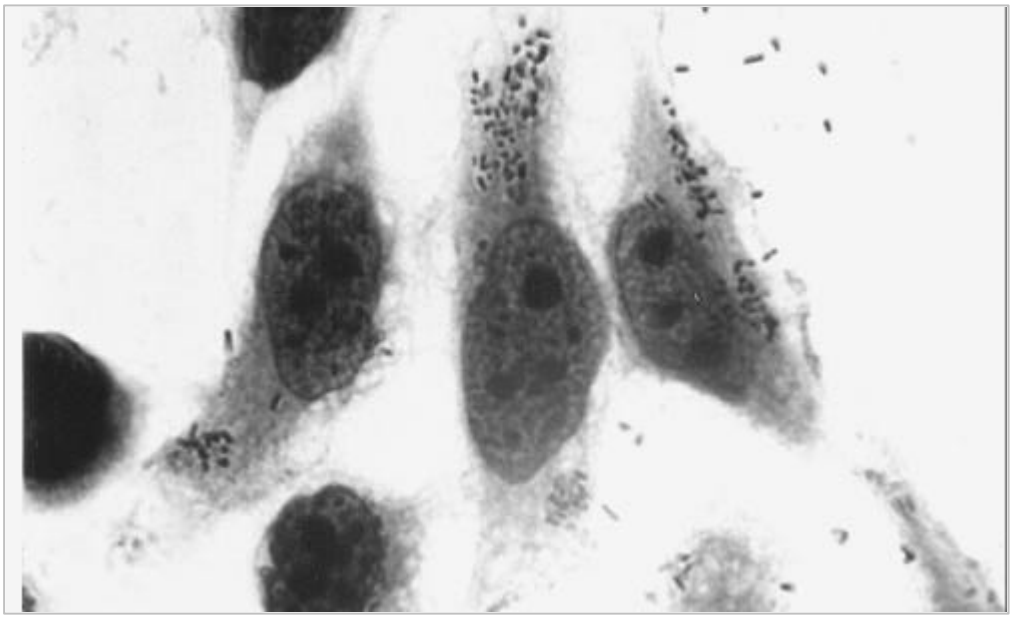
* Anzahl der KbE/Vertiefung x $10^3$ bei Animpfdosis von MOI 100

3.2.3.2 Adhäsivität (qualitativ)

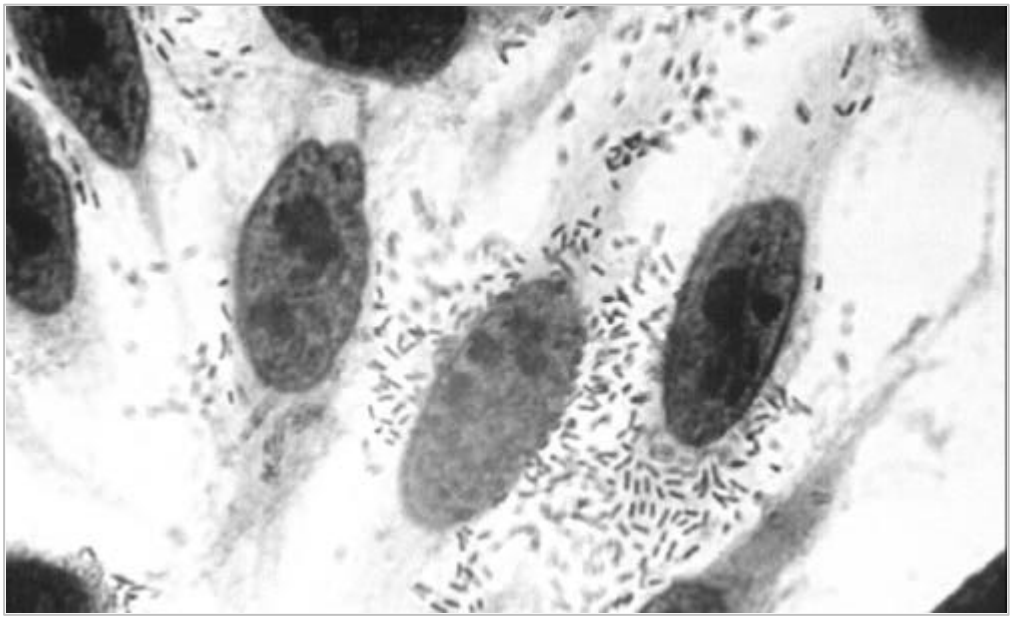
Die Adhäsivität der eingesetzten *Salmonella*-Stämme an Zellkulturen wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. Die qualitative Untersuchung erfolgte über eine Beurteilung der Adhäsionsmuster im Giemsa-Adhäsionstest. Die quantitative Untersuchung wurde mit dem Gentamicin-Invasionstest durchgeführt.

Im Giemsa-Adhäsionstest wurden die *Salmonella*-Stämme mit den verschiedenen Zellmonolayern inkubiert (MOI 100, 37 °C, 3 h). Die Monolayer wurden anschließend fixiert (100 % Methanol), nach Giemsa gefärbt und dann mit dem Lichtmikroskop untersucht. Dabei wurden mehrere Faktoren beurteilt: 1. die Anzahl der Bakterien im Gesichtsfeld bei 1000-facher Vergrößerung (+ = 1 - 20; ++ = 21 - 200; +++ = 201 - 1000: ++++ = > 1000); 2. der Prozentsatz der befallenen Wirtszellen im Präparat; 3. der Prozentsatz der mit Wirtszellen assoziierten Bakterien und 4. das Verteilungsmuster der Bakterien auf den Zellen.

Die Ergebnisse des Giemsa-Adhäsionstests sind in den Tabellen 8 - 10 zusammengestellt. Die Anzahl der Bakterien im Präparat war zwischen den untersuchten *Salmonella*-Stämmen trotz einheitlicher MOI sehr unterschiedlich. Sie bewegte sich zwischen < 5 und > 100 Bakterien pro Wirtszelle. Der Einfluß der Zellart schien hierbei von untergeordneter Bedeutung zu sein. Der Prozentsatz der befallenen Wirtszellen korrelierte positiv mit der Anzahl der Bakterien im Präparat. So wurde der Prozentsatz der befallenen Wirtszellen bei zunehmender Anzahl der Bakterien im Präparat immer größer. Der Anteil der Wirtszell-assoziierten Bakterien an allen Bakterienzellen lag in jedem Präparat über 95 %. Es herrschte in jedem Präparat ein diffuses Verteilungsmuster, dessen Ausprägung jeweils zwischen zwei charakteristischen Erscheinungsbildern lag. Das eine Erscheinungsbild wurde am deutlichsten durch den Stamm *S.*Tm SB 147 repräsentiert: Hier verteilten sich alle Salmonellen diffus über den ganzen Zelleib (s. Abbildung 6). Das andere Erscheinungsbild entsprach dem ebenfalls in Abbildung 6 gezeigten Verteilungsmuster des *S.*Tm SL 1344. Hier fällt eine Gruppierung der Salmonellen in einigen Bereichen des Zytoplasmas auf.

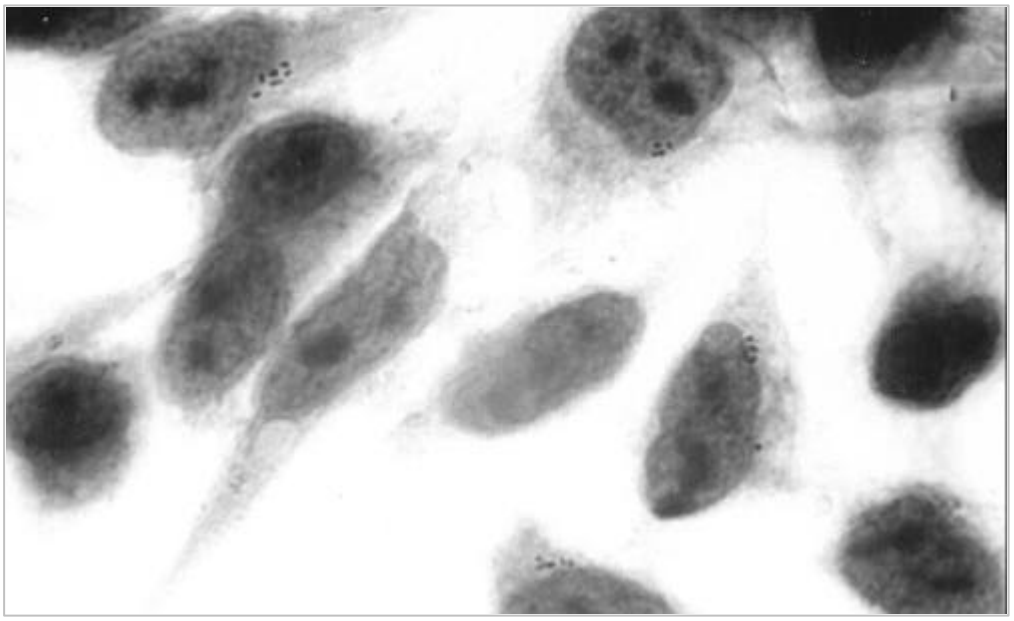


***S*.Tm SL 1344**

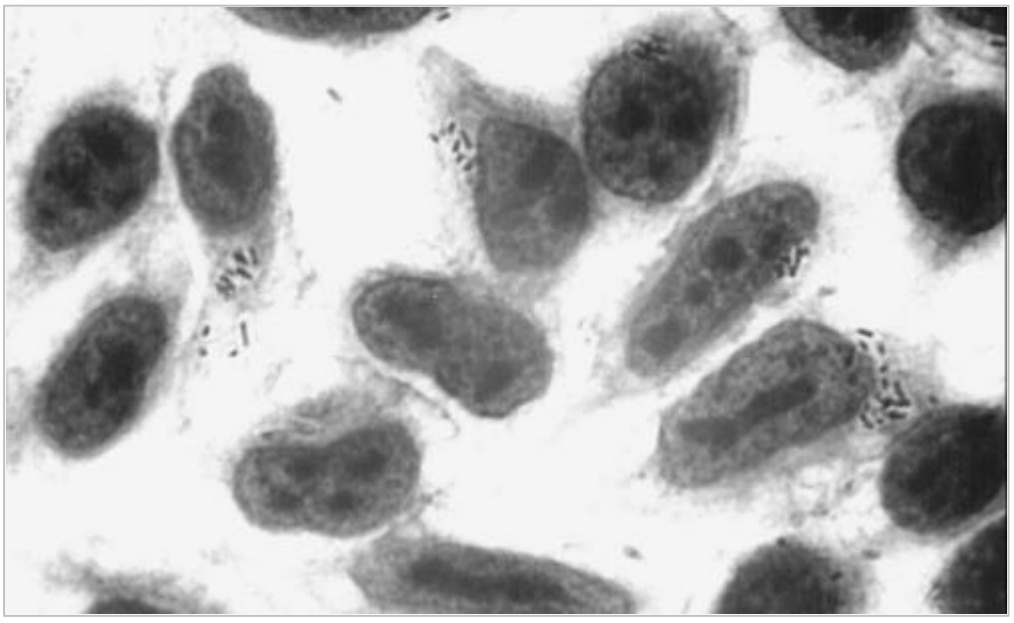


***S*.Tm SB 147**

**Abbildung 6** Adhäsionsmuster der *S*.Typhimurium-Referenzstämme auf HEp-2-Zellen (Giemsa-Adhäsionstest; MOI 100; 3 h Inkubation; Vergrößerung x 1000)

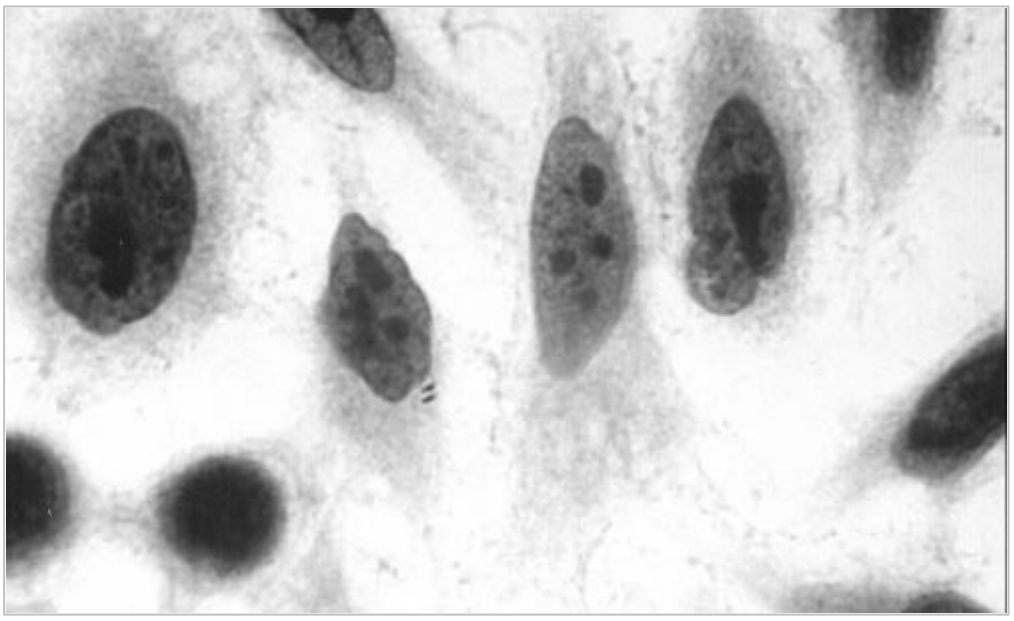


***S*.Tm "MOSKAU"**

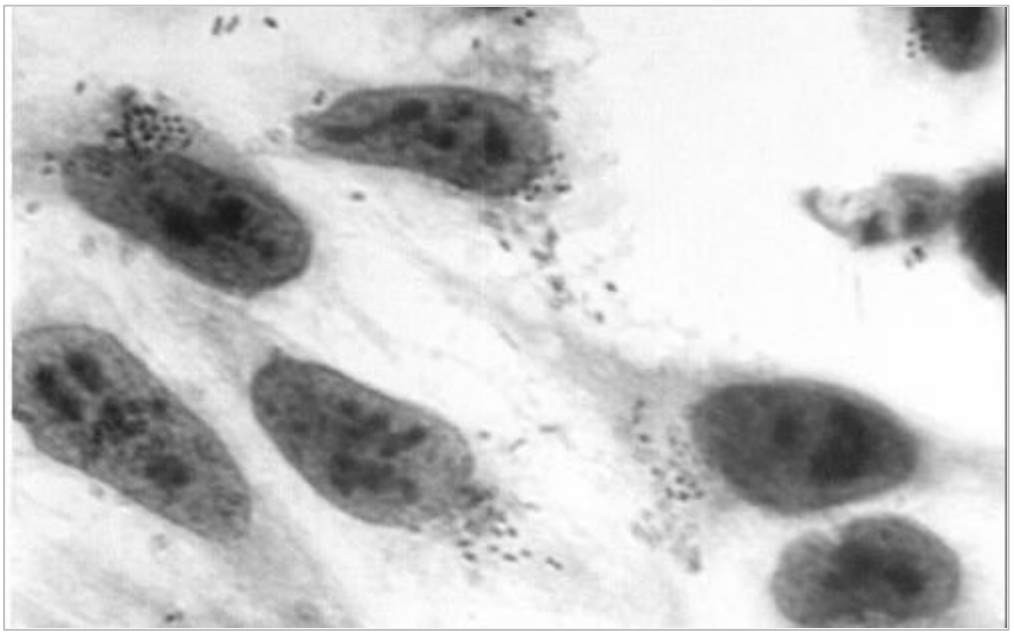


***S*.Tm "ZOOSALORAL H"**

**Abbildung 7** Adhäsionsmuster von *S*.Typhimurium-Stämmen auf HEp-2-Zellen (Giemsa-Adhäsionstest; MOI 100; 3 h Inkubation; Vergrößerung x 1000)



***S*.Gall 1910/93**



***S*.Gall 9R "NOBILIS"**

**Abbildung 8** Adhäsionsmuster von *S*.Gallinarum-Stämmen auf HEp-2-Zellen
(Giemsa-Adhäsionstest; MOI 100; 3 h Inkubation; Vergrößerung x 1000)

TABELLE 8 Adhäsivität von *Salmonella*-Stämmen auf HEp-2-Zellen

(Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung von Giemsa-gefärbten Präparaten; MOI 100, 3 h Inkubation, Vergrößerung x 1000)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl der Bakterien im Präparat** | **Anteil der befallenen Wirtszellen** | **Verteilungsmuster der Bakterien auf den Wirtszellen** |
|---|---|---|---|
| *S.*Tm SL 1344 | ++ | ca. 80 % | überwiegend Gruppenbildung im Zytoplasma, meist > 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm SB 147 | +++ | 100 % | diffuses Verteilungsmuster |
| *S.*Tm "MOSKAU" | + | ca. 10 % | überwiegend Gruppenbildung im Zytoplasma, meist < 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | +(+) | ca. 20 % | überwiegend Gruppenbildung im Zytoplasma, meist < 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Dubl 442/012 | +(+) | ca. 30 % | häufig Gruppenbildung, v.a. an der Zellperipherie, ∅ 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | + | ca. 20 % | häufig Gruppenbildung, v.a. an der Zellperipherie, meist < 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Gall 1910/93 | (+) | ca. 5 % | Verteilungsmuster nicht zu beurteilen, da nur ganz vereinzelt Bakterien sichtbar waren |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | +++ | ca. 90 % | diffuses Verteilungsmuster, gelegentlich Gruppenbildung, meist 10 - 30 Bakterien / Gruppe |

TABELLE 9 Adhäsivität von *Salmonella*-Stämmen auf HEF-Zellen

(Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung von Giemsa-gefärbten Präparaten; MOI 100, 3 h Inkubation, Vergrößerung x 1000)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl der Bakterien im Präparat** | **Anteil der befallenen Wirtszellen** | **Verteilungsmuster der Bakterien auf den Wirtszellen** |
|---|---|---|---|
| *S.*Tm SL 1344 | ++ | ca. 50 % | oft vereinzelte Bakterien, gelegentlich Gruppenbildung, selten >10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm SB 147 | +++ | > 95 % | diffuses Verteilungsmuster |
| *S.*Tm "MOSKAU" | +(+) | ca. 30 % | oft vereinzelte Bakterien, gelegentlich Gruppenbildung, selten >10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | + | ca. 20 % | oft vereinzelte Bakterien, gelegentlich Gruppenbildung, selten >10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Dubl 442/012 | +(+) | ca. 20 % | diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung, v.a. an der Zellperipherie, meist < 20 Bakterien / Guppe |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | + | ca. 10 % | diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung v.a. an der Zellperipherie, meist < 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Gall 1910/93 | (+) | ca. 5 % | Verteilungsmuster nicht zu beurteilen |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | ++++ | 100 % | diffuses Verteilungsmuster,<br>Zellen sehen degeneriert aus, lösen sich ab |

TABELLE 10 Adhäsivität von *Salmonella*-Stämmen auf FKL-Zellen

(Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung von Giemsa-gefärbten Präparaten; MOI 100, 3 h Inkubation, Vergrößerung x 1000)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Anzahl der Bakterien im Präparat** | **Anteil der befallenen Wirtszellen** | **Verteilungsmuster der Bakterien auf den Wirtszellen** |
|---|---|---|---|
| *S.*Tm SL 1344 | ++ | ca. 80 % | Diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung meist um die 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm SB 147 | +++ | 100 % | diffuses Verteilungsmuster |
| *S.*Tm "MOSKAU" | +(+) | ca. 30 % | überwiegend Gruppenbildung im Zytoplasma, meist 5 - 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | + | ca. 20 % | überwiegend Gruppenbildung im Zytoplasma, meist 4 - 8 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Dubl 442/012 | ++ | ca. 40 % | diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung, v.a. an der Zellperipherie, meist < 10 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | + | ca. 20 % | diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung, v.a. an der Zellperipherie, meist < 8 Bakterien / Gruppe |
| *S.*Gall 1910/93 | (+) | ca. 5 % | Verteilungsmuster nicht zu beurteilen, da nur ganz vereinzelt Bakterien sichtbar waren |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | +++ | ca. 90 % | diffuses Verteilungsmuster und Gruppenbildung, meist 10 - 20 Bakterien / Gruppe |

### 3.2.3.3 Adhäsivität (quantitativ)

Die Adhäsivität der *Salmonella*-Stämme wurde im Gentamicin-Invasionstest quantitativ ermittelt. Es wurden verschiedene Zellkulturmonolayer mit *Salmonella*-Stämmen inkubiert (MOI 100, 3 h). Danach wurde der Zellrasen lysiert und aus den Lysaten die Anzahl der KbE pro Vertiefung bestimmt. Dabei wurde die Adhäsivität durch die Zahl der zellassoziierten (adhärierenden und intrazellulären) Bakterien pro Testansatz repräsentiert. Da die Meßwerte statistisch linksschief verteilt waren, werden die Ergebnisse als geometrisches Mittel aus sechs unabhängigen Versuchen inklusive Streufaktor angegeben. Sie werden in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die Meßwerte sind im Detail in Tabelle 11 aufgelistet.

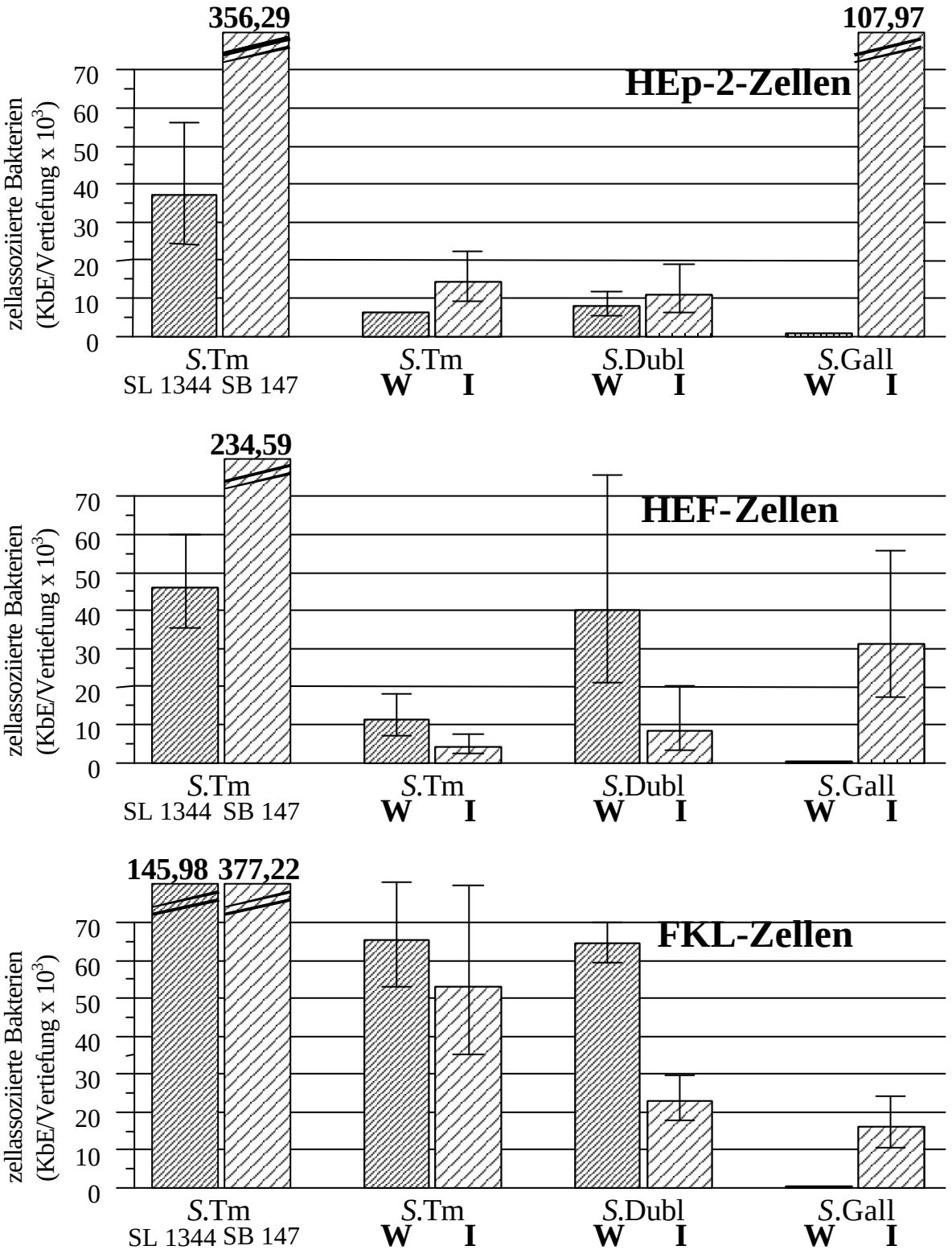
Alle *Salmonella*-Stämme adhärierten an alle drei Zielzellarten. Die Werte lagen zwischen 0,16 x $10^3$ KbE/Vertiefung (*S.*Gall 1910/93 auf HEF-Zellen) und 377,23 x $10^3$ KbE/Vertiefung (*S.*Tm SB 147 auf FKL-Zellen). Das entspricht einer Anzahl von 0,005 bis 12,57 zellassoziierten Bakterien pro ausgesäter Wirtszelle. Die Werte für den invasiven Referenzstamm *S.*Tm SL 1344 lagen zwischen 1,23 (HEp-2-Zellen) und 4,87 (FKL-Zellen) KbE/Vertiefung.

Es gab Unterschiede in Abhängigkeit von der Zielzelle. So war zu erkennen, daß die Adhäsivität von *S.*Tm und *S.*Dubl bei den FKL-Zellen am größten war und bei den HEF-Zellen am geringsten. Die Adhäsivität von *S.*Gall war in der HEp-2-Zellkultur am größten und in der FKL-Zellkultur am geringsten. Der Zelltyp (fibroblastisch oder epitheloid) schien insofern einen Einfluß zu haben, als das Reaktionsmuster im Gentamicin-Invasionstest für die fibroblastischen FKL-Zellen und HEF-Zellen relativ ähnlich war und vom Reaktionsmuster der epitheloiden HEp-2-Zellen abwich. Zudem gab es stammspezifische Unterschiede. So adhärierte der Stamm *S.*Tm SB 147 unabhängig vom Wirtszelltyp am stärksten (234,59 x $10^3$ bis 377,23 x $10^3$ Bakterien/Vertiefung) und der *S.*Gall-Wildtypstamm 1910/93 immer am geringsten (0,16 x $10^3$ bis 0,62 x $10^3$ Bakterien/Vertiefung).

Bei jeder der drei Wirtszellarten gab es signifikante Adhäsivitätsunterschiede zwischen den Impfstämmen und ihren zugehörigen Wildtypstämmen. So zeigte *S.*Tm "ZOOSALORAL H" eine im

Vergleich zu seinem Mutterstamm größere Adhäsivität ($p \leq 0,01$) auf HEp-2-Zellen. Auf HEF- und FKL-Zellen gab es keinen signifikanten Unterschied. Demgegenüber war der *S.*Dubl-Wildtypstamm 442/012 seinem auxotrophen Tochterstamm *S.*Dubl "BOVISALORAL" überlegen ($p \leq 0,01$; HEF- und FKL-Zellen). *S.*Gall 9R "NOBILIS" war im Vergleich zum Wildtypstamm *S.*Gall 1910/93 auf allen drei Zellarten vermehrt adhäsiv ($p \leq 0,001$). Der Stamm *S.*Tm SB 147 adhärierte auf allen drei Zielzellarten stärker als der Stamm *S.*Tm SL 1344 ($p \leq 0,001$).

Die Annahme, daß ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der *Salmonella*-Stämme im Versuchsmilieu die Ausprägung der Adhäsivität beeinflußt, konnte nicht bestätigt werden, da im $\chi^2$-Test eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Gesamtkeimgehalt nach Inkubation und der Adhäsivität in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden konnte. Das Wachstumsverhalten der *Salmonella*-Stämme im Versuchsmedium wurde demnach in den Ergebnissen nicht berücksichtigt.




**W** = Wildtypstamm **I** = Impfstamm

**Abbildung 9** Adhäsivität von *Salmonella*-Stämmen auf drei Zielzellarten

(Ergebnisse des Gentamicin-Invasionstest; MOI 100, 3 h Inkubation)

TABELLE 11: Adhäsivität von *Salmonella*-Stämmen auf drei Zielzellarten
(Ergebnisse des Gentamicin-Invasionstest; MOI 100, 3 h Inkubation)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Zahl der zellassoziierten Bakterien (KbE/Vertiefung x $10^3$)*** | | |
|---|---|---|---|
| | HEp-2-Zellen | HEF-Zellen | FKL-Zellen |
| *S.*Tm SL 1344 | 36,92 (1,52) | 46,08 (1,30) | 145,98 (1,44) |
| *S.*Tm SB 147 | 356,29 (1,14) | 234,59 (1,74) | 377,23 (1,34) |
| *S.*Tm "MOSKAU " | 6,33 (1,23) | 11,37 (1,58) | 65,24 (1,23) |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 14,22 (1,57) | 4,37 (1,74) | 52,99 (1,50) |
| *S.*Dubl 442/012 | 8,03 (1,44) | 40,03 (1,88) | 64,46 (1,08) |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 10,81 (1,73) | 8,36 (2,44) | 23,11 (1,29) |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,62 (1,26) | 0,16 (2,93) | 0,32 (1,56) |
| *S.*Gall 9R"NOBILIS" | 107,96 (1,28) | 31,05 (1,79) | 16,17 (1,50) |

* Werte ohne Klammer: geometrisches Mittel aus 6 Meßwerten
Werte mit Klammer: Streufaktor

### 3.2.3.4 Invasivität

Die Invasivität der Salmonellen wurde quantitativ im Gentamicin-Invasionstest bestimmt. Es wurden verschiedene Zellkulturmonolayer mit *Salmonella*-Stämmen inkubiert (MOI 100, 3 h). Der Zellrasen wurde nach Gentamicin-Einwirkung (100 µg/ml, 1 h, 37 °C) lysiert und aus den Lysaten die Anzahl der KbE pro Vertiefung bestimmt, die vom Gentamicin nicht getötet wurden. Die hierbei anzüchtbaren Salmonellen wurden als intrazelluläre Bakterien definiert. Da die Invasion als ein von einer vorherigen Adhäsion abhängiger Prozeß betrachtet wird (FRANCIS *et al*., 1992), wurde die Invasivität als prozentualer Anteil der intrazellulären Keime an den zellassoziierten Keimen angegeben. Dieser sogenannte Invasionsindex errechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Invasionsindex (\%)} = \frac{\text{Anzahl der intrazellulären Keime (KbE/Vertiefung)}}{\text{Anzahl der zellassoziierten Keime (KbE/Vertiefung)}} \times 100$$

Abbildung 10 und Tabelle 12 zeigen die Invasionsindices untersuchter *Salmonella*-Stämme in Abhängigkeit von der Art der Zielzellen. Der Invasionsindex wird als geometrischer Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen mit Streufaktor angegeben. Der geometrische Mittelwert wurde gewählt, da beide Werte, die für die Berechnung des Invasionsindexes herangezogen wurden, linksschief verteilt waren.

Jede der drei eingesetzten Zellarten wurde von allen *Salmonella*-Stämmen invadiert. Dabei traten zellspezifische Unterschiede auf. So waren die Invasionsindices der *Salmonella*-Stämme in HEp-2-Zellen mit einem durchschnittlichen Wert > 50 % am größten. Die Invasionsindices in den FKL-Zellkulturen waren mit durchschnittlich knapp 40 % etwas und in den HEF-Zellkulturen mit durchschnittlich ca. 15 % deutlich niedriger.

Der höchste Invasionsindex betrug 82,21 % (*S.*Gall 1910/93 in HEp-2-Zellkulturen), der niedrigste lag bei 0,45 % (*S.*Tm SB 147 in HEp-2-Zellkulturen). Der invasive Referenzstamm *S.*Tm SL 1344 erreichte in HEp-2-Zellkulturen einen Invasionsindex von 80,97 %.

Die Anzahl der intrazellulären Bakterien in den verschiedenen Zellkulturen ist in Tabelle 13 dargestellt. Sie lag zwischen 0,02 x $10^3$ KbE/Vertiefung (*S.*Gall 1910/93 in HEF-Zellkulturen) und 78,89 x $10^3$ KbE/Vertiefung (*S.*Tm SL 1344 in FKL-Zellkulturen). Das entspricht einer Anzahl von 0,0003 bis 2,63 Bakterien pro ausgesäter Zielzelle. Die Werte für die invasionsdefekten Referenzstamm *S.*Tm SB 147 lagen zwischen 0,054 (HEp-2-Zellen) und 0,64 (FKL-Zellen) KbE/Vertiefung.

Es wurden signifikante Invasivitätsunterschiede zwischen einzelnen Impfstämmen und ihren zugehörigen Wildtypstämmen gefunden. So zeigte *S.*Tm "ZOOSALORAL H" in der HEp-2-Zellkultur einen niedrigeren Invasionsindex als sein Mutterstamm ($p \leq 0,05$). Der Invasionsindex *S.*Gall-Impfstamm 9R "NOBILIS" war in FKL-Zellkulturen im Vergleich zum *S.*Gall-Wildtypstamm

1910/93 höher ($p \leq 0,05$). Die *S.*Dubl-Stämme wiesen auf beiden Primärzellkulturen (HEF und FKL) einen signifikanten Unterschied auf, zeigten jedoch keine einheitliche Tendenz: Bei den FKL-Zellen war der Impfstamm vermindert invasiv ($p \leq 0,05$). Bei den HEF-Zellen war der Invasionsindex des Impfstammes (*S.*Dubl "BOVISALORAL") dagegen höher ($p \leq 0,01$). Die beiden Kontrollstämme verhielten sich auf allen drei Zellarten einheitlich. Der Invasionsindex des Stammes *S.*Tm SL 1344 war immer höher als der des Stammes *S.*Tm SB 147 ($p \leq 0,001$). Insgesamt waren die Invasionsindices der verschiedenen *Salmonella*-Stämme stark von der Art der Wirtszelle abhängig.

Eine Beeinflussung der Invasivität durch unterschiedliches Wachstumsverhalten der *Salmonella*-Stämme im Versuchsmilieu wurde durch eine statistische Gegenüberstellung des Gesamtkeimgehaltes nach dreistündiger Inkubation und der erzielten Invasionsindices im $\chi^2$-Test überprüft. Es konnte niemals eine Korrelation nachgewiesen werden, weshalb das Wachstumsverhalten der *Salmonella*-Stämme im Versuchsmedium in der Darstellung der Ergebnisse keinen Eingang fand.

TABELLE 12: Invasivität von *Salmonella*-Stämmen in drei Zielzellarten (Invasionsindices)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Invasionsindices (%)*** | | |
|---|---|---|---|
| | HEp-2-Zellen | HEF-Zellen | FKL-Zellen |
| *S.*Tm SL 1344 | 80,97 (1,13) | 28,75 (1,28) | 54,04 (1,29) |
| *S.*Tm SB 147 | 0,45 (1,59) | 1,73 (1,78) | 5,11 (1,25) |
| *S.*Tm "MOSKAU " | 61,12 (1,52) | 18,29 (1,15) | 46,24 (1,35) |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 33,14 (1,91) | 21,40 (1,65) | 39,68 (1,58) |
| *S.*Dubl 442/012 | 56,26 (1,41) | 4,23 (2,49) | 48,37 (1,65) |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 61,26 (1,50) | 18,71 (1,52) | 30,32 (1,49) |
| *S.*Gall 1910/93 | 82,21 (1,32) | 14,45 (1,53) | 30,35 (1,41) |
| *S.*Gall 9R"NOBILIS" | 71,66 (1,41) | 14,97 (2,47) | 57,86 (1,25) |

* Werte ohne Klammer: geometrisches Mittel aus 6 Meßwerten
Werte mit Klammer: Streufaktor

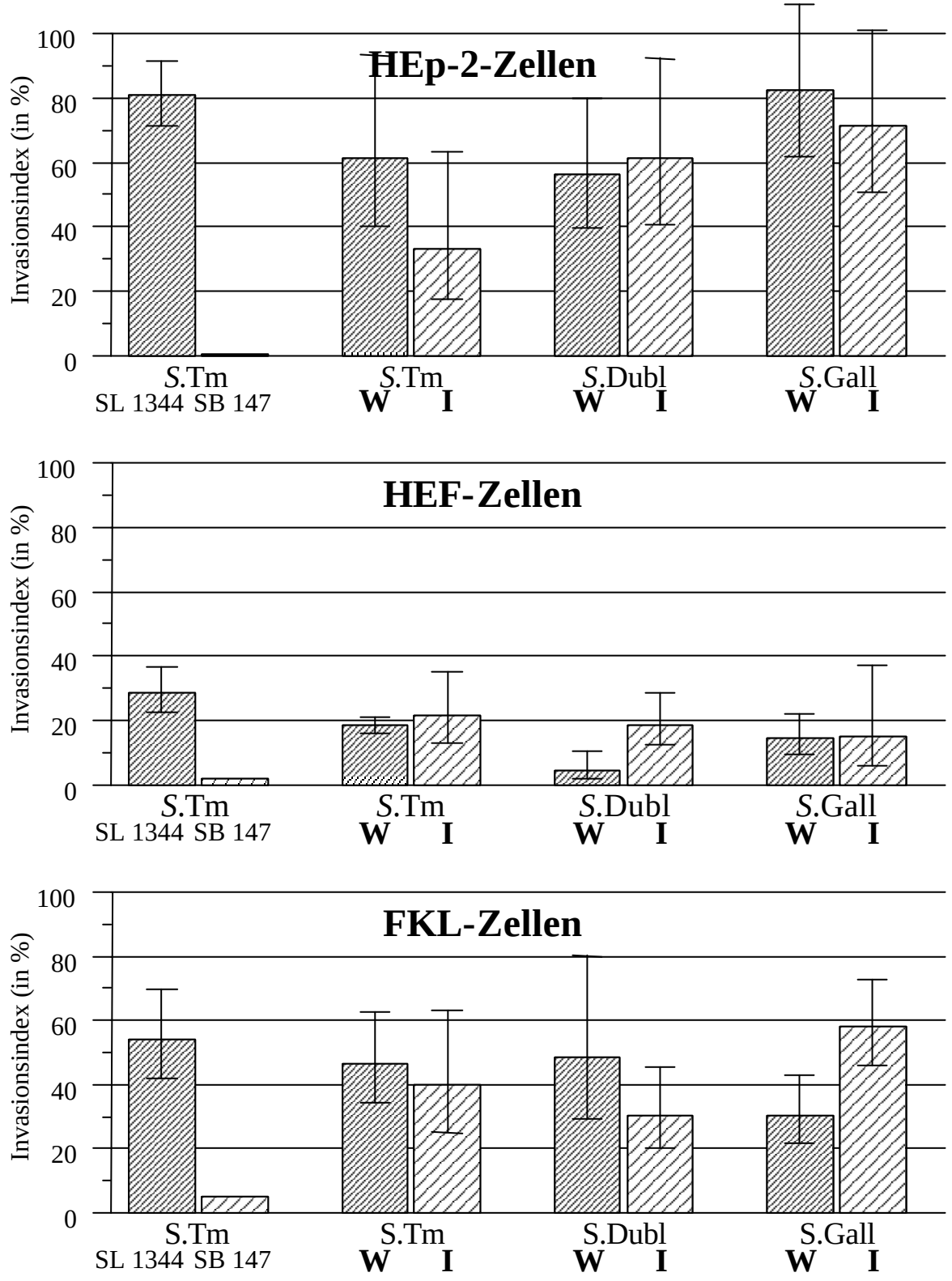



**Abbildung 10** Invasivität von *Salmonella*-Stämmen in drei Zielzellarten

(Ergebnisse des Gentamicin-Invasionstests; MOI 100, 3 h Inkubation)

TABELLE 13: Invasivität von *Salmonella*-Stämmen in drei Zielzellarten
(Zahl der intrazellulären Bakterien)

| ***Salmonella*-Stamm** | **Zahl der intrazellulären Bakterien* (KbE/Vertiefung x $10^3$)** | | |
|---|---|---|---|
| | HEp-2-Zellen | HEF-Zellen | FKL-Zellen |
| *S.*Tm SL 1344 | 29,89 (1,65) | 13,25 (1,10) | 78,89 (1,46) |
| *S.*Tm SB 147 | 1,61 (1,48) | 4,05 (1,40) | 19,26 (1,32) |
| *S.*Tm "MOSKAU " | 3,87 (1,80) | 2,08 (1,48) | 30,17 (1,56) |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 4,71 (2,49) | 0,94 (1,48) | 21,03 (1,58) |
| *S.*Dubl 442/012 | 4,52 (1,75) | 1,69 (1,90) | 31,18 (1,59) |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 6,62 (2,30) | 1,56 (3,03) | 7,01 (1,88) |
| *S.*Gall 1910/93 | 0,51 (1,26) | 0,02 (2,46) | 0,10 (1,62) |
| *S.*Gall 9R"NOBILIS" | 77,38 (1,35) | 4,65 (2,24) | 9,36 (1,43) |

* Werte ohne Klammer: geometrisches Mittel aus 6 Meßwerten
Werte mit Klammer: Streufaktor

### 3.2.3.5 Intrazelluläre Überlebensfähigkeit

Die intrazelluläre Überlebensfähigkeit von Salmonellen wurde im modifizierten Gentamicin-Invasionstest ermittelt. Es handelte sich um eine Verlaufskontrolle der intrazellulären Keimzahlen über einen Zeitraum von einer Woche. Im 24-stündigen Abstand wurde die Anzahl der im Zellrasen verbliebenen Keime bestimmt. Die Animpfdosis wurde so angepaßt, daß die Anzahl der intrazellulären Keime am Tag 0 zwischen Impf- und Wildstamm nicht allzusehr differierte. Aus der Anzahl der KbE errechnete sich der Überlebensindex. Er wurde in % ausgedrückt und über folgende Formel berechnet:

$$\text{Überlebensindex (\%)} = \frac{\text{Anzahl der intrazellulären Bakterien (KbE/ml) am Tag X}}{\text{Anzahl der intrazellulären Bakterien (KbE/ml) am Tag 0}} \times 100$$

In den Tabellen 14 - 16 sind die Ergebnisse dieses Testes zusammengefaßt und in den Abbildungen 11 - 13 graphisch dargestellt.

Alle *Salmonella*-Stämme konnten in den drei Zellarten mindestens zwei Tage überleben. Dabei gab es allerdings zellspezifische Unterschiede. Am besten war die Überlebensfähigkeit in FKL-Zellkulturen (insbesondere die der *S.*Tm-Stämme) und am schlechtesten in HEF-Zellkulturen. Außerdem gab es stammspezifische Unterschiede. Die beiden *S.*Tm-Referenzstämme konnten sich in allen drei Zielzellarten vermehren. Dabei lag der Stamm *S.*Tm SL 1344 mit seinem Überlebensindex stets unter dem des Stammes *S.*Tm SB 147. Deutlich waren die Unterschiede zwischen den beiden anderen *S.*Tm-Stämmen. Bei dem auxotrophen Impfstamm (*S.*Tm "ZOOSALORAL H") war nie eine Vermehrung nachzuweisen. Der *S.*Tm-Wildtypstamm "MOSKAU" vermehrte sich dagegen immer mindestens am zweitbesten von allen eingesetzten *Salmonella*-Stämmen. Der *S.*Tm-Impfstamm lag mit seinem Überlebensindex am Tag 1 durchschnittlich um den Faktor 40 niedriger als sein Mutterstamm. Bei den *S.*Dubl-Stämmen waren die Ergebnisse von der Zielzellart abhängig. In der HEF-Zellkultur wies der Mutterstamm (*S.*Dubl 442/012) den höheren Überlebensindex auf, in den beiden anderen Zellkulturen der Impfstamm (*S.*Dubl "BOVISALORAL"). Die *S.*Gall-Stämme zeigten in keiner der drei Zielzellarten eine Vermehrungsfähigkeit und allgemein die geringste Überlebensfähigkeit.

TABELLE 14 Intrazelluläre Überlebensfähigkeit der *Salmonella*-Stämme in **HEp-2-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **intrazelluläre Überlebensfähigkeit*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 92500 | 161,9 | 4,7 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 22580 | 360,0 | 55,2 | 2,7 | 0,6 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 10550 | 229,0 | 85,2 | 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 6230 | 2,7 | 0,8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 43190 | 54,5 | 11,5 | 29,0 | 1,2 | 0,8 | 0,2 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 41870 | 156.0 | 50,1 | 4,3 | 0,6 | 0,3 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 1810 | 29,3 | 0,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 57890 | 16,7 | 0,9 | 0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* am Tag 0: Anzahl der KbE/Vertiefung; an den Tagen 1 - 7: Überlebensindex in %

TABELLE 15 Intrazelluläre Überlebensfähigkeit der *Salmonella*-Stämme in **HEF-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **intrazelluläre Überlebensfähigkeit*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 66250 | 115,8 | 11,0 | 0,5 | 0,03 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 37020 | 279,7 | 32,8 | 3,5 | 0,2 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 20580 | 217,9 | 15,8 | 1,4 | 0,1 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 7625 | 17,6 | 0,5 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 92080 | 134,0 | 12,2 | 1,3 | 0,2 | 0,01 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 81980 | 27,8 | 3,3 | 0,3 | 0,02 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 4080 | 9,6 | 1,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 24100 | 0,8 | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* am Tag 0: Anzahl der KbE/Vertiefung; an den Tagen 1 - 7: Überlebensindex in %

TABELLE 16 Intrazelluläre Überlebensfähigkeit der *Salmonella*-Stämme in **FKL-Zellen**

| ***Salmonella*-Stamm** | **intrazelluläre Überlebensfähigkeit*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tag 0 | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 | Tag 6 | Tag 7 |
| *S.*Tm SL 1344 | 26770 | 144,1 | 29,9 | 5,8 | 2,6 | 0,4 | 0 | 0 |
| *S.*Tm SB 147 | 19040 | 596,2 | 204,2 | 55,5 | 15,8 | 4,6 | 2,9 | 1,2 |
| *S.*Tm "MOSKAU" | 41660 | 611,8 | 149,5 | 37,6 | 12,4 | 4,2 | 2,8 | 1,1 |
| *S.*Tm "ZOOSALORAL H" | 20760 | 22,9 | 2,3 | 0,3 | 0,1 | 0,01 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl 442/012 | 60240 | 87,7 | 7,3 | 1,1 | 0,1 | 0,01 | 0 | 0 |
| *S.*Dubl "BOVISALORAL" | 15520 | 123,5 | 6,3 | 2,4 | 0,3 | 0,02 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 1910/93 | 2100 | 67,9 | 1,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S.*Gall 9R "NOBILIS" | 14060 | 37,8 | 0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* am Tag 0: Anzahl der KbE/Vertiefung; an den Tagen 1 - 7: Überlebensindex in %

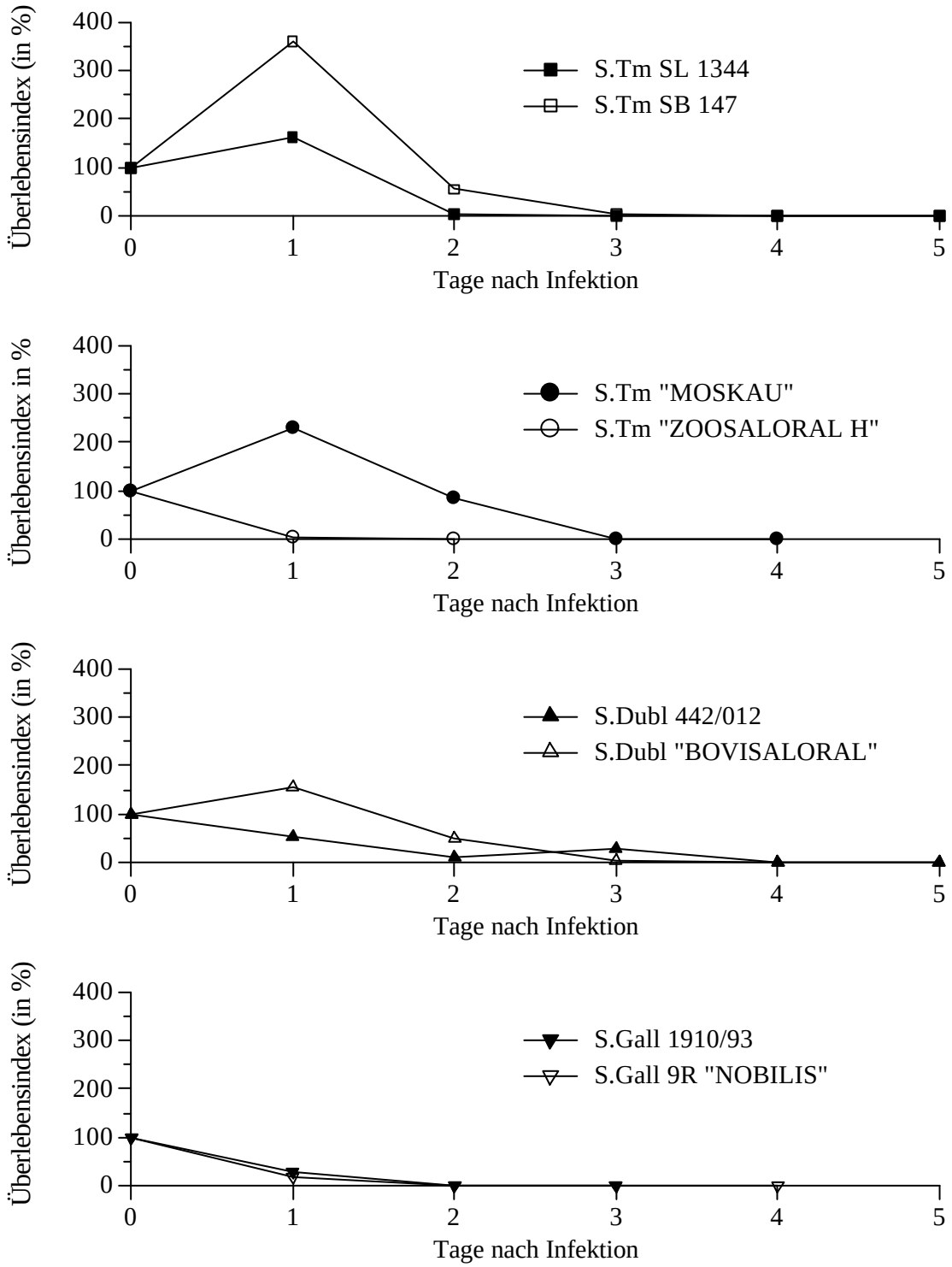



**Abbildung 11** Intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *Salmonella*-Stämmen in HEp-2-Zellen

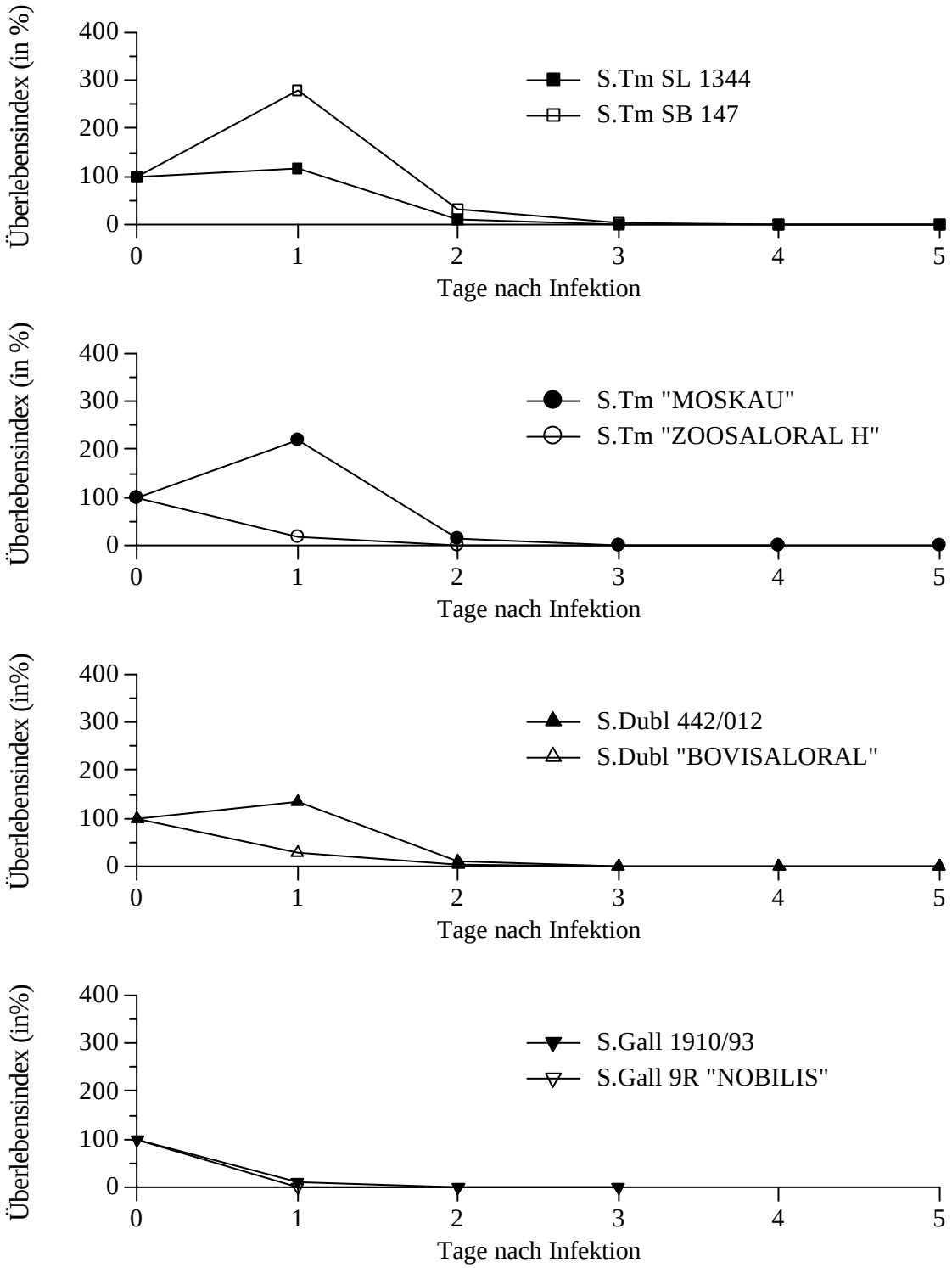



**Abbildung 12** Intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *Salmonella*-Stämmen in HEF-Zellen

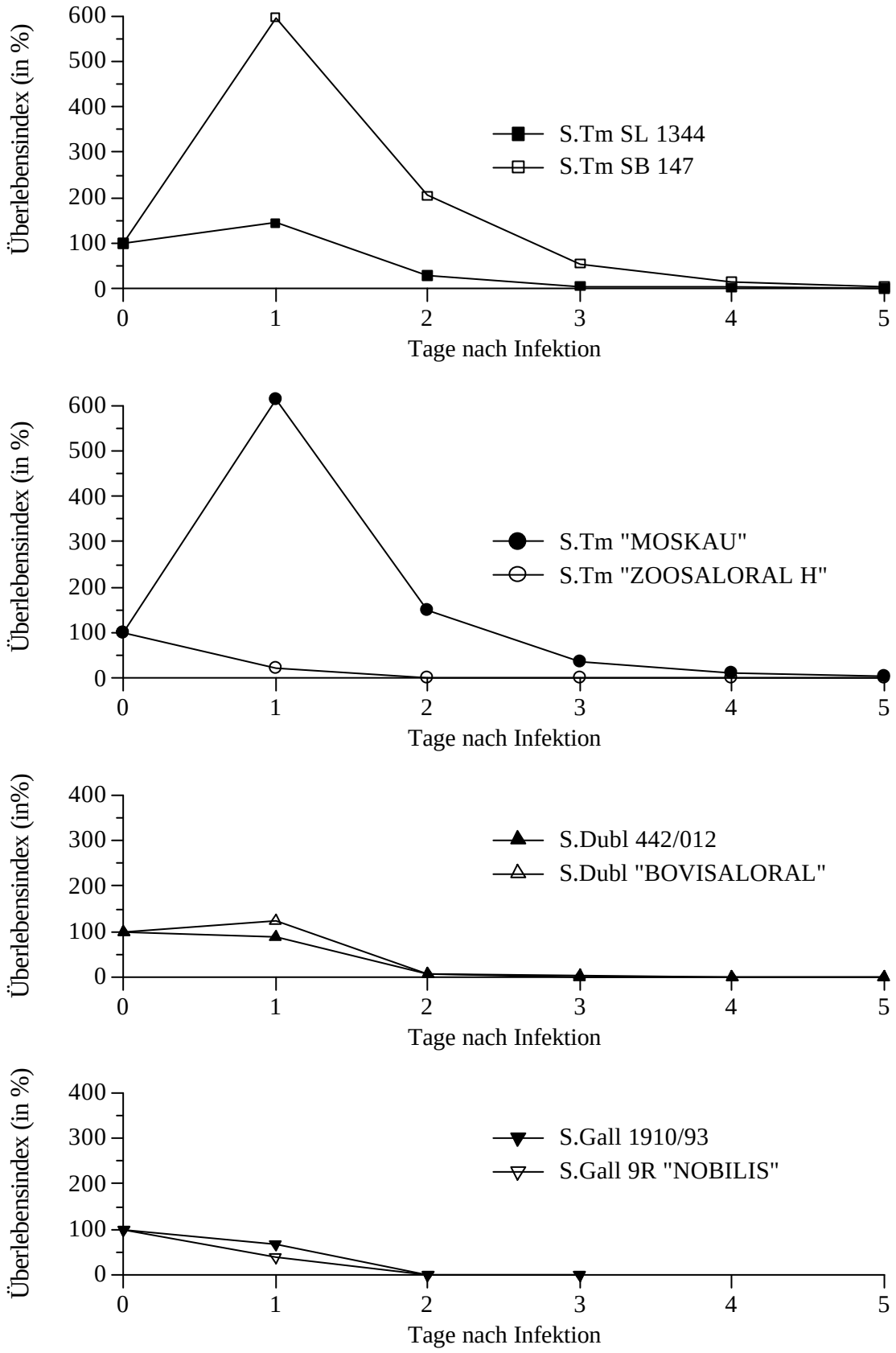



**Abbildung 13** Intrazelluläre Überlebensfähigkeit von *Salmonella*-Stämmen in FKL-Zellen

b

# 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß der Impfstamm *S.*Tm "ZOOSALORAL H" *in vitro* eine verminderte intrazelluläre Persistenz aufweist und der Impfstamm *S.*Dubl "BOVISALORAL" in der FKL-Zellkultur weniger adhäsiv und invasiv als sein Mutterstamm *S.*Dubl 442/012 ist. Der Virulenzverlust des Impfstammes *S.* Gall 9R "NOBILIS" läßt sich nicht mit einer reduzierten Adhäsivität, Invasivität oder intrazellulären Replikation erklären.

*S.*Tm "ZOOSALORAL H" war gegenüber seinem Mutterstamm *S.*Tm "MOSKAU" in allen drei Zellarten deutlich vermindert überlebensfähig. Der Mutterstamm konnte sich in allen drei Zellarten vermehren und erreichte am ersten Tag nach der Infektion intrazelluläre Bakterienzahlen von bis zu ca. 185 x $10^3$ KbE, während die Anzahl intrazellulärer Bakterien beim Impfstamm bereits am ersten Tag deutlich abnahm und nie mehr als ca. 4,8 x $10^3$ KbE betrug. *S.*Tm "ZOOSALORAL H" lag mit seinem Überlebensindex am ersten Tag um den Faktor 40 niedriger als sein Mutterstamm. Diese *in-vitro*-Ergebnisse korrelieren mit der Erfahrung *in vivo*, daß *S.*Typhimurium "ZOOSALORAL H" nach oraler Applikation an Hühnerküken in Kot- und Organproben von diesen Tieren nicht so lange nachgewiesen werden kann wie der vollvirulente Elternstamm (MEYER *et al.*, 1986). Bei diesem Impfstamm sind augenscheinlich wichtige Eigenschaften für das parasitäre Leben in der Wirtszelle beeinträchtigt. Ein kausaler Zusammenhang mit der Adenin- und Histidin-Auxtrophie dieses Stammes scheint wahrscheinlich, da auch andere Untersuchungen gezeigt haben, daß auxotrophe *Salmonella*-Stämme in ihrer intrazellulären Replikationsfähigkeit eingeschränkt sein können. So führen z.B. *purD*$^-$-, Pyr$^-$-, sowie *aroA*$^-$- Mutationen zur verminderten intrazellulären Replikationsfähigkeit in epithelialen Zellen und Makrophagen (LEUNG & FINLAY, 1991; HENSEL *et al.*, 1997a, BÄUMLER *et al.*, 1994; STOCKER, 1988). Die intrazelluläre Replikationsfähigkeit ist für die Virulenz von *Salmonella* essentiell (LEUNG & FINLAY, 1991; HENSEL *et al.*, 1998). So sind Rep$^-$-Mutanten, die sich zwar extrazellulär, nicht aber intrazellulär vermehren können, *in vivo* trotz mindestens dreiwöchiger Persistenz in Leber und Milz hochgradig attenuiert im Mausmodell (FINLAY, 1994). Auch für hochgradig attenuierte Purin-auxotrophe *S.*Tm-Mutanten (*purD*$^-$) ist

eine verminderte intrazelluläre Replikationsfähigkeit bereits nachgewiesen (LEUNG & FINLAY, 1991). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte *S.*Dublin-Impfstamm ("BOVISALORAL") war trotz seiner Purin-Auxotrophie jedoch intrazellulär nicht weniger replikationsfähig als sein vollvirulenter Mutterstamm. Die genetische Grundlage für diese Purin-Auxotrophie ist noch immer unbekannt. Es könnte also sein, daß die Purin-Auxotrophie des Stammes *S.*Dubl "BOVISALORAL" auf Mechanismen beruht, die die Bakterienzelle im Gegensatz zu einer *purD*$^-$-Mutation im Inneren der Wirtszelle kompensieren kann.

Der *S.*Dublin-Impfstamm "BOVISALORAL" zeigte sich gegenüber seinem Mutterstamm auf HEF- und FKL-Zellen vermindert adhäsiv. Zusätzlich war seine Invasivität in die Rinderzelle (FKL) reduziert. Daraus ergab sich, daß der Impfstamm am ersten Tag *post infectionem* intrazelluläre Bakterienzahlen erreichte, die etwa nur einem Drittel (FKL) bzw. einem Fünftel (HEF) des korrespondierenden Wildstammes entsprachen. Diese verminderte intrazelluläre Präsenz geht konform mit der Beobachtung, daß *S.*Dubl. "BOVISALORAL" nach oraler Applikation an Rinder in Kot- und Organproben von diesen Tieren nicht so lange nachgewiesen werden kann wie der vollvirulente Elternstamm (MEYER *et al*., 1980) und könnte ursächlich für die verminderte Virulenz des Impfstammes sein. Die Tatsache, daß eine reduzierte Adhäsion und/oder Invasion sich attenuierend auswirkt, wurde in vielen voneinander unabhängigen Untersuchungen bestätigt (AMIN *et al*., 1994; BARROW *et al*., 1992; PENHEITER *et al*., 1997; PORTER & CURTISS III, 1997; RUBINO *et al*., 1993; VAN DER VELDEN *et al*., 1998). Die Beobachtung, daß die verminderte Adhäsivität sich nur gegenüber HEF- bzw. FKL-Zellen, nicht aber gegenüber HEp-2-Zellen zeigt, könnte ein Hinweis auf die Beeinträchtigung eines Zelltyp-spezifischen Adhäsins des Impfstammes sein. Bei *S.*Tm wurde eine solche Zelltypspezifität von Adhäsinen bereits beschrieben. So vermittelten beispielsweise lpf-Fimbrien im Zellkulturmodell nur die Adhäsion an HEp-2-, nicht jedoch die Adhäsion an T84-, Henle-407-, HeLa- oder MDCK-Zellen (BÄUMLER *et al*., 1996c). Die Invasivität des *S.*Dublin-Impfstammes war nur in der Rinder-Zellkultur signifikant vermindert. Das könnte ein Hinweis auf eine tierartspezifische Komponente bei der Invasion sein, wie sie bislang noch nicht beschrieben wurde.

Der Stamm *S.*Gall 9R "NOBILIS" ist gegenüber seinem Elternstamm SG9 attenuiert. Während der Elternstamm in Geflügelbeständen eine Mortalität von 60 - 90 % erzeugt (persönl. Mitteilung P. Barrow, Compton, England), verursacht der 9R-Stamm keine erhöhte Mortalität, wohl aber Hepatitis und Milzläsionen in verschiedenen Hühnerrassen (SILVA *et al*., 1981). Abgesehen vom unvollständigen LPS (SMITH & WILLIAMS, 1956) ist über die Attenuierungsmechanismen des 9R-Stammes nichts bekannt. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung gab es für die Attenuierung letztlich keine befriedigende Erklärung. Auffallend war jedoch, daß der *S.*Gall-Impfstamm auf allen drei Zellarten sehr viel stärker adhärierte als der *S.*Gall-Wildtypstamm. Die Vergleichbarkeit der beiden Stämme ist zwar begrenzt, da der Mutterstamm SG9 nicht zur Verfügung stand und der Impfstamm *S.*Gall 9R "NOBILIS" daher einem nicht isogenen *S.*Gall-Wildtypstamm gegenübergestellt wurde. Die relative Adhäsivität des Impfstammes war trotzdem bemerkenswert hoch. Ein Erklärungsansatz bietet die Beobachtung, daß *S.*Gall 9R unvollständige LPS-Moleküle in seine äußere Membran einbaut. *Salmonella*-Stämme mit unvollständigem LPS weisen in der Zellkultur eine erhöhte Adhäsivität auf (KIHLSTRÖM & EDEBO, 1976). Das könnte einerseits daran liegen, daß die Oberfläche dieser Bakterienzellen hydrophober als die von Zellen mit intaktem LPS ist (KIHLSTRÖM & EDEBO, 1976). Vielleicht wird aber auch ein vorher verdecktes Adhäsin durch das Fehlen von maskierenden LPS-Seitenketten nun leichter zugänglich. Es ist jedoch fraglich, ob die erhöhte Adhäsivität an Zellkulturen für die Geschehnisse *in vivo* eine Relevanz hat. Diese erhöhte Adhäsivität *in vitro* geht nämlich nicht unbedingt mit einer erhöhten Adhäsivität *in vivo* einher, da ein Stamm mit unvollständigem LPS Schwierigkeiten hat, den intestinalen Mucus zu durchdringen (KROGFELD *et al*., 1996). Die Fähigkeit von *Salmonella* zur Kolonisierung des Mäusedarms nimmt jedenfalls umso stärker ab, je kürzer die O-Seitenkette ist (NEVOLA *et al.*, 1985; LICHT *et al.*, 1996). Zudem ist ein unvollständiges LPS für *Salmonella* ein Handicap in der Auseinandersetzung mit der Wirtsabwehr. So wird eine intakte O-Seitenkette beispielsweise zum Schutz gegen Gallensalze und Verdauungsenzyme benötigt (LOOS & WASSENAAR, 1994). Ein Adhäsions-steigernder Effekt, falls er sich *in vivo* manifestieren würde, würde daher wahrscheinlich von anderen, für den Keim ungünstigen Effekten überlagert werden. Abgesehen vom unvollständigen LPS ist über weitere Attenuierungsmechanismen des 9R-Stammes nichts bekannt. Fest steht jedoch, daß der Stamm *S.*Gall 9R im praktischen Einsatz eine recht hohe Restvirulenz aufwies (LAX *et al.*,

1995), in Deutschland als Impfstoff nicht zugelassen ist und nur in Ausnahmefällen nach behördlicher Genehmigung zum Einsatz kommt (RYLL & HINZ, 1995). Die hohe Restvirulenz könnte mit der ausgesprochen hohen *in-vitro*-Adhäsivität in Zusammenhang stehen, die mit einer deutlichen Zytotoxizität in der HEF- und FKL- Zellkultur einherging (eigene Untersuchungen, Daten nicht gezeigt). Die FKL- und HEF- Zellen begannen sich nach 3 h abzulösen und gingen durch die zusätzlichen Waschschritte verloren. Aus dieser Zytotoxizität erklärt sich auch der Widerspruch, daß S.Gall 9R "NOBILIS" im Giemsa-Test auf beiden Zellarten eine ausgesprochen hohe Adhäsivität zeigte, die sich in der quantitativen Untersuchung im Gentamicin-Invasionstest nicht in demselben Ausmaß bestätigte.

Eine tierartspezifische Reaktion der wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovare war in dieser Untersuchung nicht zu erkennen. Alle *Salmonella*-Stämme adhärierten an alle Wirtszelltypen und drangen in sie ein. Der vollvirulente *S.*Gall-Stamm vermehrte sich in HEF-Zellen genausowenig wie in anderen Zellen und adhärierte an HEp-2-Zellen sogar am besten. Dieses steht im Widerspruch zur bekannten Wirtsspezifität von *S.*Dublin und *S.*Gallinarum. *S.*Dublin präferiert in erster Linie das Rind, wenngleich auch bei anderen Tierarten (Huhn, Hund, Ziege, Schaf und Schwein) sowie auch beim Menschen vor allem extraintestinale Infektionen beschrieben wurden (BARROW *et al*., 1994; MILSTEIN, 1975; GITTER & SOJKA, 1970; HARP *et al*., 1981; FANG & FIERER, 1991; IKEDA *et al*., 1986). *S.*Gallinarum ist hochgradig Geflügel-adaptiert, Infektionen bei anderen Tierarten oder beim Menschen sind nicht bekannt. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Untersuchung lassen jedoch darauf schließen, daß auch die nicht-präferierten Tierarten und der Mensch prinzipiell für die hochgradig wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovare empfänglich sind. Es ist aber damit zu rechnen, daß Abwehr-Mechanismen bei nicht-permissiven Wirten die Infektion rasch und effektiv begrenzen. Aus der Literatur sind verschiedene Mechanismen bekannt, die als Ursache der Wirtsadaptation diskutiert werden und in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Speziesspezifität verschiedener *Salmonella*-Serovare unter anderem darin begründet liegt, daß die Keime in den Makrophagen der von ihnen bevorzugten Wirtsspezies besonders überlebensfähig sind (VLADOIANU *et al.*, 1990; ISHIBASHI & ARAI, 1996; SCHWAN & KOPECKO, 1997). So überlebt beispielsweise das

menschenadaptierte Serovar *S.*Typhi in Mäuse-Makrophagen deutlich schlechter als *S.*Typhimurium (VLADOIANU *et al.*, 1990; SCHWAN & KOPECKO, 1997). Zudem können die wirtsadaptierten *Salmonella*-Serovare *S.*Dublin und *S.*Gallinarum in der Leber und der Milz der nicht-präferierten Wirte signifikant schlechter überleben (BARROW *et al.*, 1994). *S.*Gallinarum ist außerdem unfähig, die Peyerschen Platten des Mäusedarms zu invadieren (PASCOPELLA *et al.*, 1995). Aufgrund der fehlenden Beobachtung von Infektionen des Menschen durch *S.*Gallinarum ist nicht davon auszugehen, daß die hohe *in-vitro*-Adhäsivität und -Invasivität des 9R-Stammes in den humanen HEp-2-Zellen als ein Infektionsrisiko für den Menschen zu interpretieren ist.

Es gab Adhäsivitäts-Unterschiede in Abhängigkeit von der Zielzelle. So war zu erkennen, daß die Adhäsivität bei den FKL-Zellen allgemein am größten und bei den HEF-Zellen allgemein am geringsten war. Dieses mag damit zusammenhängen, daß einige Zellarten aus unbekannten Gründen für die Adhäsion permissiver sind als andere (FINLAY & FALKOW, 1988b). Wahrscheinlicher jedoch ist, daß hier der Größenunterschied der Zellen zum Tragen kommt. Die FKL-Zellen waren von den drei eingesetzten Zellarten die größten und boten somit die größte Oberfläche, an der eine Adhäsion stattfinden konnte. Die HEF-Zellen waren dagegen deutlich kleiner als die anderen beiden Zellarten. Abgesehen von der Adhäsivität waren auch deutliche zellspezifische Invasivitätsunterschiede nachzuweisen. So lag der durchschnittliche Invasionsindex (= prozentualer Anteil der intrazellulären Keime an den gesamt-zellassoziierten Keimen) der *Salmonella*-Stämme in HEp-2-Zellen bei über 50 %, in FKL-Zellen bei knapp 40 % und in HEF-Zellen nur bei ca. 15 %. Das deutet darauf hin, daß einige Zellarten für eine Salmonellen-Invasion empfänglicher sind als andere. Ein ähnliches Phänomen beschrieben schon FINLAY & RUSCHKOWSKI (1991). Sie beobachteten, daß die Invasion von *S.*Typhimurium HeLa-Zellen erfolgreicher verlief als in MDCK-Zellen. Die Autoren postulierten, daß diese zellspezifisch unterschiedlichen Invasionswerte auf eine unterschiedliche Textur des Wirtszytoskeletts zurückzuführen sein könnten. Da die "Ruffles", die im Zuge der Invasion zu beobachten waren, bei HeLa-Zellen lockerer organisiert waren als bei MDCK-Zellen, vermuten die Autoren bei HeLa-Zellen eine lockerere Zytoskelettstruktur, die von den Bakterien leichter zur Invasion genutzt werden kann.

Die Beobachtung, daß annähernd alle im Präparat sichtbaren Bakterien auch zellassoziiert waren, zeigt, daß es sich bei den Ergebnissen des Giemsa-Tests um zellspezifische Anheftungen der Bakterien handelte. Das im Giemsa-Test ermittelte mosaikartige Adhäsionsmuster, bei dem nicht alle Zellen Salmonellen-infiziert waren, deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (FINLAY & FALKOW, 1988a). Es wurden zwei Erklärungsansätze für dieses Phänomen angeboten: Die erste Erklärung ist der sogenannte "Trittbretteffekt", bei dem die Zellen, die bereits mit Salmonellen befallen sind, aus unbekannten Gründen eine erhöhte Anziehungskraft für nachfolgende Salmonellen haben (FRANCIS *et al.*, 1993). Die zweite Erklärung basiert auf einem Untersuchungsergebnis, wonach die Verteilung der Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche mosaikartig ist (GIANNASCA *et al.*, 1996). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Beobachtung, daß erst mit kontinuierlich steigender Bakterienanzahl im Präparat auch die Zahl der befallenen Zellen ebenso kontinuierlich zunimmt, spricht eher für den "Trittbretteffekt". Bei einer mosaikartigen Verteilung der Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche wäre die Verteilung über alle Zellen gesehen gleichmäßiger und auf der einzelnen Zelle mosaikartig. Bei Stämmen mit geringer Invasivität (wie dem Stamm *S.*Tm SB 147) verteilten sich die Bakterien auf den jeweils befallenen Zellen jedoch gleichmäßig über den gesamten Zelleib. Je invasiver ein Stamm war, desto mehr kam es zur Haufenbildung in einigen Bereichen des Zytoplasmas. Dieses deckt sich mit der Beobachtung einer anderen Untersuchung, daß sich die Invasion nur an einigen wenigen Stellen der Zelle vollzieht (HUANG *et al*., 1998).

Bei dem *S.*Tm-Stamm SB 147 ist *invA* deletiert. Das *invA*-Genprodukt ist Teil des Sekretionsapparates, der durch die *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 (SPI1) kodiert wird. Es wird zur Bildung von Kanälen durch die innere Bakterienmembran benötigt. Diese *invA*-negative *S.*Tm-Mutante SB 147 hatte jedoch einen Invasionsindex von bis zu 5,11 %. Das könnte darauf zurückzuführen sein, daß einige extrazelluläre Salmonellen die Gentamicin-Behandlung überlebt haben. Die zellspezifischen Unterschiede in der Anzahl der intrazellulären KBE und vor allem das Auftreten einer intrazellulären Vermehrung dieses Stammes sprechen jedoch gegen eine extrazelluläre Lokalisation der gezählten Bakterien. Gegen die mögliche Erklärung, daß die intrazelluläre Lokalisation von Bakterien durch eine "Background-Phagozytose" zustande kam, spricht die

Tatsache, daß bei denselben Zellen mit anderen *Salmonella*-Stämmen (z.B. *S.*Gall 1910/93) deutlich niedrigere intrazelluläre Bakterienzahlen erzielt wurden. Vielmehr scheint es, daß eine *invA*$^-$-Mutation die Invasivität eines *Salmonella*-Stammes zwar stark vermindert, jedoch nicht völlig unterbindet. Auch GALÁN *et al.* (1992b) sprechen nicht von einer unterbundenen sondern nur von einer stark eingeschränkten Invasivität der *invA*-Insertionsmutante *S.*Tm SB 147. Entweder unterbindet die Ausschaltung dieses einen Gens die *inv*-abhängige *Salmonella*-Invasion nicht völlig oder es muß einen alternativen Invasionsweg geben, der *inv*-unabhängig verläuft. Ein solcher alternativer Invasionsweg wird beispielsweise auch bei der Invasion von *S.*Typhimurium in CHO-Zellen vermutet, da Mutationen in der SPI1 eine Invasion in CHO-Zellen nicht signifikant reduzieren (HONG & MILLER, 1998). Dieser alternative Invasionsweg könnte z.B. über das kürzlich identifizierte *sigDE* (*salmonella* invasion gene)-Operon vonstatten gehen, welches dem Shigella *ipgDE*-Operon homolog und abhängig von *sirA* ist (HONG & MILLER, 1998).

Bei *S.*Gallinarum konnte niemals und bei allen anderen Stämmen nach einem Tag keine intrazelluläre Nettovermehrung mehr nachgewiesen werden. Dieses steht im Widerspruch zu dem Befund, daß sich *S.*Typhimurium und *S.*Dublin mit Ausnahme der Makrophagen gut in allen bisher daraufhin untersuchten Zellen vermehren konnten (LEUNG & FINLAY, 1991; MILLS & FINLAY, 1994; GAHRING *et al.*, 1990; DINJUS *et al.*, 1998; BRACKELSBERG *et al.*, 1997). Hier kommen jedoch mehrere Effekte in Betracht, die dazu beigetragen haben könnten, daß es trotz effektiver Vermehrung innerhalb der Zellen zu einer Abnahme von lebensfähigen Keimen im Versuchsansatz kommen konnte:

1) Gentamicin ist ein Antibiotikum, das in Kurzzeitversuchen (bis 6 h) die intrazellulären Vermehrungskurven von Salmonellen nicht beeinflußt (GAHRING *et al.*, 1990). Sowohl die FKL-Zellen, als auch ganz besonders die HEF-Zellen wurden jedoch im Dauereinsatz von Gentamicin geschädigt, wie im MTT-Test gezeigt wurde. So war unter den im Test auf intrazelluläre Überlebensfähigkeit eingesetzten Gentamicin-Konzentrationen bei beiden Zellarten zumindest ab dem sechsten Tag mit Zellschädigungen zu rechnen. Gentamicin ist normalerweise nicht membrangängig. Sobald jedoch die Zellmembranen geschädigt sind, kann das Gentamicin in das Zytoplasma gelangen und dann auch dort die intrazellulären Keime abtöten.

2) Im Laufe des intrazellulären Status der Salmonellen kann es zu einer Ausschleusung der Bakterien in das umgebende Medium kommen. Diese Bakterien würden dort von dem Gentamicin abgetötet werden und würden fälschlicherweise nicht mehr als intrazelluläre Keime mitgezählt werden können.
3) Durch die Vermehrung der Bakterien kommt es zur Schädigung der Wirtszelle. So wurde z.B. für den auch in dieser Untersuchung verwendeten Stamm *S.*Tm SL 1344 gezeigt, daß er sich intrazellulär in großen Vakuolen vermehrt und zytotoxisch für die Wirtszelle ist (LEUNG & FINLAY, 1991). In den epithelialen Zellinien HT-29 und Caco-2-Zellen lassen sich zudem bereits 12 - 18 h nach einer Salmonellen-Infektion erste Zeichen einer Apoptose beobachten, die durch die intrazelluläre Vermehrung der Salmonellen maximal induziert wird (KIM *et al.*, 1998). Durch ein Absterben der Wirtszellen gelangen die intrazellulären Bakterien in das umgebende Medium und werden durch das Gentamicin abgetötet. Je stärker sich die Bakterien vermehren, desto eher werden die Zellen geschädigt und desto eher werden die Keime demnach abgetötet.

Für die Interpretation der Meßdaten bedeutet dies, daß aus einem Kurvenabfall nicht automatisch auf eine fehlende Vermehrung geschlossen werden darf. Zwar kann bei einem Kurvenanstieg durchaus von einer stattgefundenen Vermehrung ausgegangen werden, bei einem eher milden Kurvenabfall kann man jedoch höchstens davon sprechen, daß eine Vermehrung nicht nachgewiesen werden konnte. Über die Vermehrungsfähigkeit von *S.*Gallinarum in epithelialen oder fibroblastischen Zellen gibt es bislang noch keine publizierten Untersuchungen. Es kann also durchaus sein, daß sich *S.*Gallinarum in den drei hier untersuchten Zellarten tatsächlich überhaupt nicht vermehren kann.

Um die Adhäsivität und Invasivität getrennt voneinander ermitteln zu können, wurden die Keimzahlen in besonderer Weise miteinander verrechnet. Viele Autoren definieren die Anzahl an adhärenten Keimen als die Anzahl der Bakterien, die übrigbleibt, wenn man die Anzahl der intrazellulären Keime von der Zahl aller zellassoziierten Keimen subtrahiert (z.B. DINJUS & HÄNEL, 1997). Dieser Ansatz berücksichtigt nicht, daß bei einem Stamm mit hoher Invasivität die Bakterien schneller von der Zelloberfläche verschwinden, was die in dieser Art und Weise berechnete Adhäsivität geringer erscheinen läßt. Die Adhäsivität wird also in diesem Fall nicht unabhängig von der Invasivität

bestimmt. In der hier vorliegenden Untersuchung wird als Maß für die Adhäsivität die Anzahl der insgesamt zellassoziierten Keime genommen. Diesem Berechnungsansatz liegt die Vorstellung zugrunde, daß die Invasion ein Schritt ist, der der Adhäsion folgt (FINLAY & FALKOW, 1988a). Jeder Keim, der sich kurz nach der Inokulation intrazellulär befindet, muß zuvor an die Wirtszelloberfläche adhäriert haben. Die Anzahl der insgesamt zellassoziierten Keime ist demnach ein Maß für die innerhalb der dreistündigen Inkubationszeit insgesamt stattgefundene Adhäsion. Dieser Berechnungsansatz wäre dann problematisch, wenn die Werte der Adhärenz sich der Sättigung annähern, die durch eine nur begrenzte Anzahl von Adhäsionsrezeptoren auf der Wirtszelloberfläche hervorgerufen würde. So fanden KUSTERS *et al.* (1993), daß in ihrem Versuchsansatz mit verschiedenen Zellkulturen nie mehr als 10 Salmonellen pro Zelle adhärierten und schlossen auf eine Sättigung der Wirtszellrezeptoren. In diesem Fall würde bei der Bestimmung der Adhäsivität durch Zählung der zellassoziierten Keime die Invasivität der Stämme doch wieder eine entscheidende Rolle spielen. Anders ausgedrückt: Je invasiver ein Keim ist, desto schneller sind die Wirtszellrezeptoren wieder frei und desto höher könnten die Werte für die zellassoziierten Keime sein. Dieser Einfluß läßt sich in der hier vorliegenden Untersuchung jedoch ausschließen, da der Keim mit der stets höchsten Adhäsivität die *invA*-negative Mutante *S.*Tm SB 147 war, die allenfalls noch eine Restinvasivität aufweist. Die anderen Stämme, deren Adhäsivitätswerte niedriger lagen, konnten daher noch keine Rezeptorensättigung erreicht haben.

Die Invasivität wird in der gängigen Literatur im allgemeinen in der Weise angegeben, daß man die Anzahl der intrazellulären Bakterien auf die Anzahl der Bakterien im Inokulum bezieht (COLLAZO & GALÁN, 1996; BEHLAU & MILLER, 1993; BAJAJ *et al.*, 1996; FINLAY & FALKOW, 1990; ). Die Autoren verstehen demnach unter der Invasivität die Anzahl der intrazellulären Keime zu einem definierten Zeitpunkt X nach der Inokulation. Sie lassen dabei den Einfluß der Adhäsivität außer Acht. Die Adhäsion wird jedoch als Voraussetzung für die Invasion angesehen (FINLAY & FALKOW, 1988a). Die Invasivität eines Stammes, wie sie gewöhnlich berechnet wird, ist von der Adhäsivität in der Art abhängig, daß aus einer niedrigen Adhäsivität eine geringere Anzahl intrazellulärer Keime resultiert und umgekehrt. Einige Untersuchungen legen daher der Invasivität eine andere Berechnung zugrunde, bei der der Einfluß der unterschiedlich hohen Adhäsivität eliminiert

werden kann (LEE & FALKOW, 1990). In der vorliegenden Arbeit sollte die Invasivität klar von der Adhäsivität abgegrenzt werden. Das geschah dadurch, daß man die Anzahl der intrazellulären Keime direkt auf die Anzahl der zellassoziierten Keime bezog. Invasion war hier also der Vorgang, durch den ein bereits adhärierter Keim ins Innere der Wirtszelle gelangt war, und Invasivität war hier definiert als der Prozentsatz der Keime, die innerhalb von 3 h von einer oberflächlich extrazellulären zu einer intrazellulären Lokalisation übergegangen waren. Dadurch ließ sich die Invasivität als eine eigene, von der Adhäsivität unabhängige Virulenzeigenschaft ermitteln.

In der einschlägigen Literatur sind die Ergebnisse von Adhäsivität und Invasivität aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit in der Regel nur innerhalb eines einzelnen Testansatzes vergleichbar (DOUCE *et al.*, 1991). Im Rahmen dieser Untersuchung ist es gelungen, ein *in-vitro*-Testsystem zu etablieren, welches reproduzierbare quantitative Ergebnisse auch in zeitlich voneinander unabhängigen Testansätzen bietet. Dadurch kommt es zwar zu deutlich höheren Standardabweichungen und Streufaktoren als in zeitlich nicht getrennten Versuchen, was die Ermittlung von signifikanten Unterschieden erschwert. Dafür gewährleistet der Vergleich zeitlich unabhängiger Experimente jedoch, daß die ermittelten Unterschiede nicht nur auf Gegebenheiten zurückzuführen sind, die in jedem einzelnen Testansatz verschieden sein können. Zudem lassen sich in zeitlich unabhängigen Experimenten beliebig viele Bakterienstämme miteinander vergleichen.

# 5. ZUSAMMENFASSUNG

Drei attenuierte *Salmonella enterica*-Stämme, die die Grundlage von kommerziellen *Salmonella*-Lebendimpfstoffen bilden (*S.*Typhimurium "ZOOSALORAL H", *S.*Dublin "BOVISALORAL" und *S.*Gallinarum 9R "NOBILIS"), wurden im Zellkulturmodell auf ihre Adhäsivität, Invasivität und intrazelluläre Überlebensfähigkeit untersucht, um Ursachen für ihre Attenuierung aufzuklären. Zum Vergleich wurden die virulenten Wildtypstämme *S.*Typhimurium "MOSKAU" (Mutterstamm von "ZOOSALORAL H"), *S.*Dublin 442/012 (Mutterstamm von "BOVISALORAL") und *S.*Gallinarum 1910/93 herangezogen. Als Kontrollstämme dienten der *S.*Typhimurium-Wildtypstamm SL 1344 und die *invA*$^-$-Defektmutante *S.*Typhimurium SB 147. Als Zielzellen wurden humane Larynx-Epitheliom-Zellen (HEp-2-Zellen), Hühner-Embryo-Fibroblasten (HEF) und fetale Kälber-Lungenzellen Zellen (FKL) eingesetzt. Die bakteriellen Anheftungsmuster wurden mikroskopisch an Giemsa-gefärbten Zellkulturpräparaten untersucht. Um die Adhäsivität, Invasivität und intrazelluläre Überlebensfähigkeit der Salmonellen zu quantifizieren, wurden Gentamicin-Invasionstests (Inkubationsdauer 3 h bis 7 Tage) durchgeführt, in denen die Anzahl der zellassoziierten und intrazellulären Bakterien als koloniebildende Einheiten im Oberflächenverfahren bestimmt wurde.

Alle untersuchten Stämme hefteten sich wie die entsprechenden Wildtypstämme mit einem diffusen Adhäsionsmuster an alle verwendeten Zielzellarten, drangen in die Zellen ein und blieben intrazellulär für mindestens 2 Tage vermehrungsfähig. Der vollständige Verlust einer für die Adhäsion, Invasion oder intrazelluläre Persistenz essentiellen Eigenschaft war damit als Ursache für die reduzierte Virulenz der Impfstämme auszuschließen. Allerdings bestanden zwischen den Impfstämmen und den entsprechenden Wildtypstämmen je nach Zielzellart und Parameter signifikante Unterschiede:

- Der Impfstamm *S.*Tm "ZOOSALORAL H" war gegenüber seinem Mutterstamm in allen drei Zellarten deutlich vermindert überlebensfähig. Ca. 24 h nach der Inokulation betrug die Zahl der intrazellulären Keime beim Impfstamm je nach Zielzellart nur noch 2,7 - 17,6 % des Wertes, der

3 h nach der Inokulation gemessen wurde, während beim virulenten Mutterstamm 217,9 - 611,8 % vorhanden waren.

- Der Impfstamm *S.*Dublin "BOVISALORAL" zeigte sich gegenüber seinem Mutterstamm auf HEF- und FKL-Zellen vermindert adhäsiv (signifikant, $p \leq 0,01$). Zudem war seine Invasivität in die Rinderzelle (FKL) signifikant reduziert ($p \leq 0,05$). Bei *S.*Dublin 442/012 betrug die Anzahl adhäsiver Bakterien $40,03 \times 10^3$ (HEF) bzw. $64,5 \times 10^3$ (FKL) koloniebildende Einheiten (KbE) pro Meßansatz. Der Impfstamm *S.*Dublin "BOVISALORAL" kam unter gleichen Bedingungen nur auf $8,4 \times 10^3$ (HEF), bzw. $23,1 \times 10^3$ (FKL) KbE/Meßansatz. Während beim Wildtypstamm 3 h nach der Inokulation bereits ca. 50 % der zellassoziierten Bakterien intrazellulär vorlagen (FKL), waren dies beim Impfstamm nur ca. 30 %. Aus der verminderten Adhäsivität und Invasivität ergab sich, daß die Anzahl der intrazellulären Keime des Impfstammes 24 h nach der Inokulation nur ca. 30 % (FKL) bzw. ca. 20 % (HEF) der Keimzahl des korrespondierenden Wildtypstammes entsprach.

- Der *S.*Gallinarum-Impfstamm 9R "NOBILIS" adhärierte unabhängig von der Zielzellart zahlenmäßig sehr viel stärker als der zum Vergleich herangezogene *S.*Gallinarum-Wildtypstamm (signifikant, $p \leq 0,001$). So betrug die Anzahl der adhärierenden Keime beim Impfstamm 2 % (FKL), bzw. 0,5 % (HEF), bzw. 0,6 % (HEp-2) der entsprechenden Keimzahlen des Wildtypstammes. Die erhöhte Adhäsivität machte sich auch in höheren Zahlen intrazellulärer Keime bemerkbar.

- Ein statistisch faßbarer Zusammenhang zwischen dem Verhalten der untersuchten *Salmonella*-Stämme in der Zellkultur und der tierartlichen Herkunft der verwendeten Zielzellarten bzw. den bekanntermaßen unterschiedlichen Wirtsspektren der untersuchten Serovare war nicht nachweisbar.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Attenuierung des Impfstammes *S.*Tm "ZOOSALORAL H" zumindest teilweise die Folge einer Beeinträchtigung von Eigenschaften ist, die

für das Überleben der Salmonellen in den Phagosomen von nicht-professionell phagozytischen Zellen des Wirtes erforderlich sind. Dagegen deuten die Meßergebnisse für den Impfstamm *S*.Dublin "BOVISALORAL" darauf hin, daß der Virulenzverlust hier primär auf einem Defekt im Anheftungsprozeß beruht. Für den attenuierenden Mechanismus bei dem Impfstamm *S*.Gallinarum 9R "NOBILIS" ergaben sich in dem verwendeten Zellkulturmodell keine Anhaltspunkte. Ferner läßt sich aus den Ergebnissen ableiten, daß die Adaptation von *S*.Dublin an die Tierart Rind und von S.Gallinarum an Hühnervögel weder durch tierartlich spezifische Vorgänge bei der Adhäsion und Invasion noch durch spezifische Abläufe während der intrazellulären Lebensphase in epithelialen Wirtszellen bedingt ist.

# 6. SUMMARY

Three *Salmonella* live vaccine strains for use in animals (*S*.Typhimurium "ZOOSALORAL H", *S*.Dublin "BOVISALORAL" and *S*.Gallinarum 9R "NOBILIS") were examined for their adhesive, invasive and intracellular capabilities in a cell culture modell. Virulent wild type strains *S*.Typhimurium "MOSKAU" (parent strain of "ZOOSALORAL H"), *S*.Dublin 442/012 (parent strain of "BOVISALORAL") and *S*.Gallinarum 1910/93 were used for pairwise comparison. *S*.Typhimurium strains SL 1344 (virulent wild type) and SB 147 (*invA*$^-$-mutant) served as positive and negative controls, respectively. Host cells were chick embryonal fibroblasts (HEF), fetal calf lung cells (FKL), and cells from a human laryngeal carcinoma cell line (HEp-2). Bacterial adhesion patterns were assessed by light microscopy after staining with Giemsa. A gentamicin invasion assay (coincubation of bacteria and host cells for 3 h to 7 days) was used for the quantification of adhesion, invasion and intracellular survival. The numbers of host cell associated and intracellular bacteria were determined by an agar plating method.

All vaccine and wild type strains adhered to host cell monolayers with a diffuse adherence pattern, invaded into host cells, and could be recovered from the intracellular environment for at least 2 days after inoculation. However, beside this very similar behaviour on the qualitative level there were significant quantitative differences depending on the strain, the host cell and the parameter tested:

- The vaccine strain "ZOOSALORAL H" was less able to survive in host cells than its parent strain. The number of intracellular bacteria of "ZOOSALORAL H" declined to 3 - 18 % within the first 24 h post inoculation. During the same period the numbers of intracellular wild type bacteria increased to 218 - 612 % (numbers of bacteria 3 h post inoculation = 100 %).

- The vaccine strain "BOVISALORAL" significantly less effectively adhered to HEF and FKL cells ($p \leq 0,01$) and less effectively invaded into FKL cells ($p \leq 0,05$) than its parent strain *S*.Dublin 442/012. Numbers of intracellular bacteria of strain 442/012 were $40,03 \times 10^3$ (HEF)

and 64,5 x $10^3$ (FKL) colony forming units (cfu), compared to 8,4 x $10^3$ (HEF) and 23,1 x $10^3$ (FKL) cfu of "BOVISALORAL". After 3h of coincubation with FKL host cells, approximately 50 % (wild type strain) and 30 % (vaccine strain) of the cell-associated bacteria were localized intracellularly, repectively. After 24 h of coincubation numbers of intracellular bacteria of "BOVISALORAL" reached only 30 % (FKL) or 20 % (HEF) of those yielded by *S*.Dublin 442/012.

- The *S*.Gallinarum vaccine strain 9R "NOBILIS" adhered significantly less effectively to all host cells than the wild type strain of *S*.Gallinarum that was used for comparison ($p \leq 0{,}001$). The numbers of adherent bacteria of strain 9R "NOBILIS" were only 2 % (FKL), 0,5 % (HEF), and 0,6 % (HEp-2) of those counted for the wild type strain. Similar quantitative differences were observed when numbers of intracellular bacteria were compared.

- No significant correlation was detected between the recognized host species adaption of a *Salmonella* serotype and the behaviour of the *Salmonella* vaccine and wild type strains in the various cell culture systems.

The results suggest, that the attenuation of these *Salmonella* vaccine strains is rather caused by downregulation of adhesion, invasion, and intracellular survival capabilities than due to a complete loss of these properties. Thus, the reduced virulence of "ZOOSALORAL H" may be determined by a reduced intracellular survival in the phagosomes of non-professional host phagocytes. Similarily, an adhesion defect may contribute to the avirulent phenotype of *S*.Dublin strain "BOVISALORAL". Results also suggest that the attenuated phenotype of *S*.Gallinarum strain 9R "NOBILIS" may not be determined by impaired adhesion, invasion or intracellular survival. Furthermore, the host species adaption of certain *Salmonella* serovars seems not to be caused by a host species specific interaction between the bacterial cells and the non-professional phagoycytes.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

**Abshire, K. Z., and F. C. Neidhardt.** 1993a. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella* Typhimurium during growth within a host macrophage.
J. Bacteriol., **175**: 3734-3743

**Abshire, K. Z., and F. C. Neidhardt.** 1993b. Growth rate paradox of *Salmonella* Typhimurium within host macrophages.
J. Bacteriol., **175**: 3744-3748

**Alpuche-Aranda, C. M., J. A. Swanson, W. P. Loomis, and S. I. Miller.** 1992. *Salmonella* Typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 10079-10083

**Alpuche-Aranda, C. M., E. L. Racoosin, J. A. Swanson, and S. I. Miller.** 1994. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes.
J. Exp. Med., **179**: 601-608

**Altmeyer, R. M., J. K. McNern, J. C. Bossio, I. Rosenshine, B. B. Finlay, and J. E. Galán.** 1993. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells.
Mol. Microbiol., **7**: 89-98

**Amin, I. I., G. R. Douce, M. P. Osborne, and J. Stephen.** 1994. Quantitative studies of invasion of rabbit ileal mucosa by *Salmonella* Typhimurium strains which differ in virulence in a model of gastroenteritis.
Infect. Immun., **62**: 569-578

**Aslanzadeh, J., and L. J. Paulissen.** 1992. Role of type 1 and type 3 fimbriae on the adherence and pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis in mice.
Microbiol. Immunol., **36**: 351-359

**Bäumler, A. J., J. G. Kusters, I. Stojiljkovic, and F. Heffron.** 1994. *Salmonella* Typhimurium loci involved in survival within macrophages.
Infect. Immun., **62**: 1623-1630

**Bäumler, A. J., and F. Heffron.** 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium.
J. Bacteriol., **177**: 2087-2097

**Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996a. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 279-283

**Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, F. A. Bowe, J. G. Kusters, S. Hoffmann, and F. Heffron.** 1996b. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse.
Infect. Immun., **64**: 61-68

**Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996c. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **64**: 1862-1865

**Bäumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1997. Fimbrial adhesins of *Salmonella* Typhimurium.
Adv. Exp. Med. Biol., **412**: 149-158

**Bajaj, V., C. Hwang, and C. A. Lee.** 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes.
Mol. Microbiol., **18**: 715-727

**Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression.
Mol. Microbiol., **22**: 703-714

**Barrow, P. A., and M. A. Lovell.** 1989. Invasion of Vero cells by *Salmonella* species.
J. Med. Microbiol., **28**: 59-67

**Barrow, P. A., J. O. Hassan, and A. Berchieri.** 1990. Reduction in faecal excretion of *Salmonella* Typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *Salmonella* Typhimurium organisms.
Epidemiol. Infection, **104**: 413-426

**Barrow, P. A., M. A. Lovell, and D. C. Old.** 1992. *In-vitro* and *in-vivo* characteristics of Tn*pho*A mutant strains of *Salmonella* serotype Gallinarum not invasive for tissue culture cells.
J. Med. Microbiol., **36**: 389-397

**Barrow, P. A., M. B. Huggins, and M. A. Lovell.** 1994. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system.
Infect. Immun., **62**: 4602-4610

**Barrow, P. A.** 1997. Novel approaches to control of bacterial infecions in animals.
Acta Vet. Hung., **45**: 317-329

**Bearson, S., B. Bearson, and J. W. Foster.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria.
FEMS Microbiol. Lett., **147**: 173-180

**Bebora, L. C., P. N. Nyaga, and C. O. Kimoro.** 1998. Comparison of immune responses of two *Salmonella* Gallinarum strains viewed as possible vaccines for fowl typhoid in Kenya.
Onderstepoort J. Vet. Res., **65**: 67-73

**Behlau, I., and S. I. Miller.** 1993. A *phoP*-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells.
J. Bacteriol., **175**: 4475-4484

**Berridge, M. J.** 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers.
Ann. Rev. Biochem., **56**: 159-193

**Beyer, W., and L. Geue.** 1992. Characterization of the virulence regions in the plasmids of three live *Salmonella* vaccines.
Zentralbl. Bakteriol., **277**: 10-21

**Boyd, E. F., J. Li, H. Ochman, and R. K. Selander.** 1997. Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*.
J. Bacteriol., **179**: 1985-1991

**Brackelsberg, C. A., L. K. Nolan, and J. Brown.** 1997. Characterization of *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Typhimurium (Copenhagen) isolated from cattle.
Vet. Res. Commun., **21**: 409-420

**Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1989. Intracellular survival of wild-type *Salmonella* Typhimurium and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages.
Infect. Immun., **57**: 1-7

**Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages.
Science, **248**: 730-732

**Buchmeier, N. A., and F. Heffron.** 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **59**: 2232-2238

**Buchmeier, N. A., C. J. Lipps, M. Y. H. So, and F. Heffron.** 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella* Typhimurium are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages.
Mol. Microbiol., **7**: 933-936

**Buchmeier, N. A., and S. J. Libby.** 1997. Dynamics of growth and death within a *Salmonella* Typhimurium population during infection of macrophages.
Can. J. Microbiol., **43**: 29-34

**Buchmeier, N. A., S. Bossie, C.-Y. Chen, F. C. Fang, D. G. Guiney, and S. J. Libby.** 1997. SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella* Typhimurium, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages.
Infect. Immun., **65**: 3725-3730

**Burns-Keliher, L. L., C. A. Nickerson, B. J. Morrow, and R. Curtiss III.** 1998. Cell-specific proteins synthesized by *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **66**: 856-861

**Carlson, S. A., and B. D. Jones.** 1998. Inhibition of *Salmonella* Typhimurium invasion by host cell expression of secreted bacteriel invasion proteins.
Infect. Immun., **66**: 5295-5300

**Carpenter, G., and S. Cohen.** 1990. Epidermal growth factor.
J. Biol. Chem., **265**: 7709-7712

**Chatfield, S. N., R. A. Strugnell, and G. Dougan.** 1989. Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants.
Vaccine, **7**: 495-498

**Chen, L. M., K. Kaniga, and J. E. Galán.** 1996. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages.
Mol. Microbiol., **21**: 1101-1115

**Chiu, C. H., and J. T. Ou.** 1999. Intracellular *Salmonella* Typhimurium induce lysis of human polymorphonuclear leukocytes which is not associated with the *Salmonella* virulence plasmid.
Microbiol. Immunol., **43**: 9-14

**Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival.
Mol. Microbiol., **30**: 175-188

**Clark, M. A., M. A. Jepson, N. L. Simmons, and B. H. Hirst.** 1994. Preferential interaction of *Salmonella* Typhimurium with mouse Peyer's patch M cells.
Res. Microbiol., **145**: 543-552

**Clark, S., and M. Dunlop.** 1991. Modulation of phospholipase $A_2$ activity by epidermal growth factor (EGF) in CHO cells transfected with human EGF receptor.
Biochem. J., **274**: 715-721

**Collazo, C. M., M. K. Zierler, and J. E. Galán.** 1995. Functional analysis of the *Salmonella* Typhimurium invasion genes *invL* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus.
Mol. Microbiol., **15**: 25-38

**Collazo, C. M., and J. E. Galán.** 1996. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **64**: 3524-3531

**Collazo, C. M., and J. E. Galán.** 1997a. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review.
Gene, **192**: 51-59

**Collazo, C. M., and J. E. Galán.** 1997b. The invasion-associated type-III system of *Salmonella* Typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell
Mol. Microbiol., **24**: 747-756

**Collins, R. M.** 1974. Vaccines and cell-mediated immunity.
Bact. Rev., **38**: 371-402

**Conlan, J. W., and R. J. North.** 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella* Typhimurium involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes.
Infect. Immun., **60**: 5164-5171

**Crago, A. M., and V. Koronakis.** 1998. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization.
Mol. Microbiol., **30**: 47-56

**Craven, S. E., N. A. Cox, J. S. Bailey, and L. C. Blankenship.** 1992. Binding of *Salmonella* strains to immobilized intestinal mucosal preparations from broiler chickens.
Avian Dis., **36**: 296-303

**Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.
Curr. Microbiol., **3**: 95-99

**Daefler, S., and M. Russel.** 1998. The *Salmonella* Typhimurium InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG.
Mol. Microbiol., **28**: 1367-1380

**Daefler, S.** 1999. Type III secretion by *Salmonella* Typhimurium does not require contact with a eukaryotic host.
Mol. Microbiol., **31**: 45-51

**Daniels, J. J., I. B. Autenrieth, A. Ludwig, and W. Goebel.** 1996. The gene *slyA* of *Salmonella* Typhimurium is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine.
Infect. Immun., **64**: 5075-5084

**Deiwick, J., T. Nikolaus, J. E. Shea, C. Gleeson, D. W. Holden, and M. Hensel.** 1998. Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents.
J. Bacteriol., **180**: 4775-4780

**Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel.** 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression.
Mol. Microbiol., **31**: 1759-1773

**Dinjus, U. und I. Hänel.** 1997. *In-vitro*-Untersuchungen zu Adhäsions- und Invasionseigenschaften von *Salmonella*-Stämmen bovinen Ursprungs.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **110**: 369-372

**Dinjus, U., I. Hänel, W. Rabsch und R. Helmuth.** 1998. Studies of the presence of virulence factors, adhesion, invasion, intracellular multiplication and toxin formation in salmonellas of different origin.
Zentralbl. Bakteriol., **287**: 387-398

**Douce, G. R., I. I. Amin, and J. Stephen.** 1991. Invasion of HEp-2 cells by strains of *Salmonella* Typhimurium of different virulence in relation to gastroenteritis.
J. Med. Microbiol., **35**: 349-357

**Eichelberg, K., C. C. Ginocchio, and J. E. Galán.** 1994. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* Typhimurium invasion genes *invB* and *invC*: homology of InvC to the $F_0F_1$ ATPase family of proteins.
J. Bacteriol., **176**: 4501-4510

**Ernst, R. K., D. M. Dombroski, and J. M. Merrick.** 1990. Anaerobiosis, type-1-fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **58**: 2014-2016

**Falkow, S., R. R. Isberg, and D. A. Portnoy.** 1992. The interaction of bacteria with mammalian cells.
Annu. Rev. Cell Biol., **8**: 333-363

**Fang, F. C., and J Fierer.** 1991. Human infection with *Salmonella* Dublin.
Medicine, **70**: 198-207

**Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 5189-5193

**Fields, P. I., E. A. Groisman, and F. Heffron.** 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells.
Science, **243**: 1059-1062

**Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1988a. A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella, Shigella* and *Yersinia* species.
aus: Bacteria-host cell interactions: S. 227-243

**Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1988b. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella Choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication.
Biochimie, **70**: 1089-1099

**Finlay, B. B., B. Gumbiner, and S. Falkow.** 1988. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer.
J. Cell Biol., **107**: 221-230

**Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite.
Mol. Microbiol., **3**: 1833-1841

**Finlay, B. B., F. Heffron, and S. Falkow.** 1989. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion.
Science, **243**: 940-943

**Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells.
J. Inf. Dis., **162**: 1096-1106

**Finlay, B. B., S. Chatfield, K. Y. Leung, G. Dougan, and S. Falkow.** 1991. Characterization of a *Salmonella Choleraesuis* mutant that cannot multiply within epithelial cells.
Can. J. Microbiol., **37**: 568-572

**Finlay, B. B., and S. Ruschkowski.** 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells.
J. Cell Sci., **99**: 283-296

**Finlay, B. B.** 1994. Molecular and cellular mechanisms of *Salmonella* pathogenesis.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., **192**: 163-185

**Foster, J. W., and H. K. Hall.** 1990. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium.
J. Bacteriol., **172**: 771-778

**Foster, J. W.** 1993. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins.
J. Bacteriol., **175**: 1981-1987

**Francis, C. L., M. N. Starnbach, and S. Falkow.** 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella* Typhimurium grown under low-oxygen conditions.
Mol. Microbiol., **6**: 3077-3087

**Francis, C. L., T. A. Ryan, B. D. Jones, S. J. Smith, and S. Falkow.** 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria.
Nature, **364**: 639-642

**Francis, K. P., P. D. Taylor, C. J. Inchley, and M. P. Gallagher.** 1997. Identification of the *ahp* operon of *Salmonella* Typhimurium as a macrophage-induced locus.
J. Bacteriol., **179**: 4046-4048

**Frech, G., M. Weide-Botjes, E. Nussbeck, W. Rabsch und S. Schwarz.** 1998. Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT009 isolates: differentiation of the live vaccine strain Zoosaloral from field isolates.
FEMS Microbiol. Lett., **167**: 263-269

**Fu, Y., and J. E. Galán.** 1998a. The *Salmonella* Typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton.
Mol. Microbiol., **27**: 359-368

**Fu, Y., and J. E. Galán.** 1998b. Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella* Typhimurium.
J. Bacteriol., **180**: 3393-3399

**Gahring, L. C., F. Heffron, B. B. Finlay, and S. Falkow.** 1990. Invasion and replication of *Salmonella* Typhimurium in animal cells.
Infect. Immun., **58**: 443-448

**Galán, J. E., and R. Curtiss III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 6383-6387

**Galán, J. E., and R. Curtiss III.** 1990. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling.
Infect. Immun., **58**: 1879-1885

**Galán, J. E., J. Pace, and M. J. Hayman.** 1992a. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella* Typhimurium.
Nature, **357**: 588-589

**Galán, J. E., C. Ginocchio, and P. Costeas.** 1992b. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of InvA to members of a new protein family.
J. Bacteriol., **174**: 4338-4349

**Galán, J. E., V. L. Miller, and D. Portnoy.** 1993. Discussion of *in vitro* and *in vivo* assays for studying bacterial entry into and survival within eukaryotic cells.
Infect. Agents Dis., **2**: 288-290

**Galán, J. E.** 1994. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways?
Trends Cell Bio., **4**: 196-199

**Galán, J. E., and C. Ginocchio.** 1994. The molecular genetic bases of *Salmonella* entry into mammalian cells.
Biochem. Soc. Trans., **22**: 301-306

**Galán, J. E.** 1996. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., **209**: 43-60

**Galán, J. E., and J. B. Bliska.** 1997. Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells.
Ann. Rev. Cell Dev. Biol., **12**: 221-255

**Garcia-del-Portillo, F., J. W. Foster, M. E. Maguire, and B. B. Finlay.** 1992. Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells.
Mol. Microbiol., **6**: 3289-3297

**Garcia-del-Portillo, F., M. B. Zwick, K. Y. Leung, and B. B. Finlay.** 1993. *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 10544-10548

**Garcia-del-Portillo, F., and B. B. Finlay.** 1995a. Targeting of *Salmonella* Typhimurium to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors.
J. Cell Biol., **129**: 81-97

**Garcia-del-Portillo, F., and B. B. Finlay.** 1995b. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments.
Trends Microbiol., **3**: 373-380

**Garcia-del-Portillo, F.** 1996. Interaction of *Salmonella* with lysosomes of eukaryotic cells. Microbiologia, **12**: 259-266

**Gast, R. K., and S. T. Benson.** 1996. Intestinal colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis phage type 4 and other phage types isolated from poultry in the United States.
Avian Dis., **40**: 853-857

**Germanier, R.** 1972. Immunity in experimental Salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **2**: 792-797

**Giannasca, K. T., P. J. Giannasca, and M. R. Neutra.** 1996. Adherence of *Salmonella* Typhimurium to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor.
Infect. Immun., **64**: 135-145

**Ginocchio, C. C., J. Pace, and J. E. Galán.** 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella* Typhimurium gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 5976-5980

**Ginocchio, C. C., S. B. Olmsted, C. L. Wells, and J. E. Galán.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella* Typhimurium.
Cell, **76**: 717-724

**Ginocchio, C. C., and J. E. Galán.** 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella* Typhimurium InvA family of proteins.
Infect. Immun., **63**: 729-732

**Gitter, M., and W. J. Sojka.** 1970. *Salmonella* Dublin abortion in sheep.
Vet. Rec., **87**: 774-778

**Gomez-Duarte, O. G., B. Lucas, Z. X. Yan, K. Panthel, R. Haas, and T. F. Meyer.** 1998. Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single dose oral immunization with attenuated *Salmonella* Typhimurium producing urease subunits A and B. Vaccine, **16**: 460-471

**Green, L. M., J. L. Reade, and C. F. Ware.** 1984. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J. Immunol. Meth., **70**: 257-268

**Groisman, E. A., E. Chiao, C. J. Lipps, and F. Heffron.** 1989. *Salmonella* Typhimurium *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 7077-7081

**Groisman, E. A., and M. H. Saier.** 1990. *Salmonella* virulence: new clues to intramacrophage survival. TIBS, **15**: 30-33

**Groisman; E. A., C. Parra-Lopez, M. Salcedo, C. J. Lipps, and F. Heffron.** 1992. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 11939-11943

**Groisman, E. A., and H. Ochman.** 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri*. EMBO J., **12**: 3779-3787

**Groisman, E. A.** 1994. How bacteria resist killing by host-defense peptides. Trends Microbiol., **2**: 444-449

**Groisman, E. A.** 1998. The ins and outs of virulence gene expression: $Mg^{2+}$ as a regulatory signal. Bioessays, **20**:96-101

**Guilloteau, L. A., T. S. Wallis, A. V. Gautier, S. MacIntyre, D. J. Platt, and A. J. Lax.** 1996. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. Infect. Immun., **64**: 3385-3393

**Hall, P. A., P. J. Coates, B. Ansari, and D. Hopwood.** 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. J. Cell Sci., **107**: 3569-3577

**Hardt, W.-D., and J. E. Galán.** 1997. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**: 9887-9892

**Hardt, W. D., H. Urlaub, and J. E. Galán.** 1998. A substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *Salmonella* Typhimurium is encoded by a cryptic bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**: 2574-2579

**Harp, J. A., L. L. Myers, J. E. Rich, and N. L. Gates.** 1981. Role of *Salmonella* Arizonae and other infective agents in enteric disease of lambs.
Am. J. Vet. Res., **42**: 596-599

**Heffernan, E. J., J. Harwood, J. Fierer, and D. Guiney.** 1992. The *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid complement resistant gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*.
J. Bacteriol., **174**: 84-91

**Heithoff, D. M., C. P. Conner, U. Hentschel, F. Govantes, P. C. Hanna, and M. J. Mahan.** 1999. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection.
J. Bacteriol., **181**: 799-807

**Hensel, M., J. E. Shea, B. Raupach, D. Monack, S. Falkow, C. Gleeson, T. Kubo, and D. W. Holden.** 1997a Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2.
Mol. Microbiol., **24**: 155-167

**Hensel, M., J. E. Shea, A. J. Bäumler, C. Gleeson, F. Blattner, and D. W. Holden.** 1997b. Analysis of the boundaries of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12.
J. Bacteriol., **179**: 1105-1111

**Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, and D. W. Holden.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages.
Mol. Microbiol., **30**: 163-174

**Hersh, D., D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, and A. Zychlinsky.** 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**: 2396-2401

**Hohmann, A. W., G. Schmidt, and D. Rowley.** 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice.
Infect. Immun., **22**: 763-770

**Hong, K. H., and V. L. Miller.** 1998. Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*.
J. Bacteriol., **180**: 1793-1802

**Hormaeche, C. E., H. S. Joysey, L. Desilve, M. Izhar, and B. A. D. Stocker.** 1990. Immunity induced by live attenuated *Salmonella* vaccines.
Res. Microbiol., **141**: 757-764

**Horiuchi, S., Y. Inagaki, N. Okamura, R. Nakaya, and N. Yamamoto.** 1992. Type I pili enhance the invasion of *Salmonella* Braenderup and *Salmonella* Typhimurium to HeLa cells.
Microbiol. Immunol., **36**: 593-602

**Horne, S. M., T. J. Kottom, L. K. Nolan, and K. D. Young.** 1997. Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella* Typhimurium Copenhagen.
Infect. Immun., **65**: 806-810

**Huang, X. Z., B. Tall, W. R. Schwan, and D. J. Kopecko.** 1998. Physical limitations on *Salmonella* Typhi entry into cultured human intestinal epithelial cells.
Infect. Immun., **66**: 2928-2937

**Hueck, C. J., M. J. Hantman, V. Bajaj, C. Johnston, C. A. Lee, and S. I. Miller.** 1995. *Salmonella* Typhimurium secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins.
Mol. Microbiol., **18**: 479-490

**Ikeda, J. S., D. C. Hirsh, S. S. Jang, and E. L. Biberstein.** 1986. Characteristics of *Salmonella* isolated from animals at a veterinary medical teaching hospital.
Am. J. Vet. Res., **47**: 232-235

**Isaacson, R. E., and M. Kinsel.** 1992. Adhesion of *Salmonella* Typhimurium to porcine intestinal epithelial surfaces: Identification and characterization of two phenotypes.
Infect. Immun., **60**: 3193-3200

**Ishibashi, Y., and T. Arai.** 1990. Specific inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages mediated by *Salmonella* Typhimurium infection.
FEMS Microbiol. Immunol., **2**: 35-43

**Ishibashi, Y., and T. Arai.** 1996. A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars.
Microb. Pathog., **21**: 435-446

**Johnston, C., D. A. Pegues, C. J. Hueck, A. Lee, and S. I. Miller.** 1996. Transcriptional activation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily.
Mol. Microbiol., **22**: 703-714

**Jones, B. A., and G. J. Gores.** 1997. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine.
Am. J. Physiol., **273**: G1174-1178

**Jones, B. D., H. F. Paterson, A. Hall, and S. Falkow.** 1993. *Salmonella* Typhimurium induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 10390-10394

**Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow.** 1994. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches.
J. Exp. Med., **180**: 15-23

**Jones, B. D., and S. Falkow.** 1994. Identification and characterization of a *Salmonella* Typhimurium oxygen-regulated gene required for bacterial internalization.
Infect. Immun., **62**: 3745-3752

**Kaniga, K., J. C. Bossio, and J. E. Galán.** 1994. The *Salmonella* Typhimurium invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins.
Mol. Microbiol., **13**: 555-568

**Kaniga, K., S. Tucker, D. Trollinger, and J. E. Galán.** 1995a. Homologues of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella* Typhimurium entry into cultured epithelial cells.
J. Bacteriol., **177**: 3965-3971

**Kaniga, K., D. Trollinger, and J. E. Galán.** 1995b. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella* Typhimurium that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins.
J. Bacteriol., **177**: 7078-7085

**Kaniga, K., J. Uralil, J. B. Bliska, and J. E. Galán.** 1996. A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella* Typhimurium.
Mol. Microbiol., **21**:633-641

**Kihlström, E., and L. Edebo.** 1976. Association of viable and inactivated *Salmonella* Typhimurium 395 MS and MR 10 with HeLa cells.
Infect. Immun., **14**: 851-857

**Kim, J. M., L. Eckmann, T. C. Savidge, D. C. Lowe, T. Witthoft, and M. F. Kagnoff.** 1998. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion.
J. Clin. Invest., **102**: 1815-1823

**Kohbata, S., H. Yokoyama, and E. Yabuuchi.** 1986. Cytopathogenic effect of *Salmonella* Typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study.
Microbiol. Immunol., **30**: 1225-1237

**Kornfeld, S., and I. Mellman.** 1989. The biogenesis of lysosomes.
Annu. Rev. Cell Biol., **5**: 483-525

**Krogfelt, K. A., T. R. Licht, and S. Molin.** 1996. Lipopolysaccharide's role in the association of *Salmonella* cells to the mouse intestine studied by ribosomal *in situ* hybridization.
Adv. Exp. Med. Biol., **408**: 123-128

**Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galán, and S. I. Aizawa.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system.
Science, **280**: 602-605

**Kukkonen, M., T. Raunio, R. Virkola, K. Lähteenmäki, R. H. Mäkelä, P. Klemm, S. Clegg, and T. K. Korhonen.** 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin.
Mol. Microbiol., **7**: 229-237

**Kusters, J. G., G. A. W. M. Mulders-Kremers, C. E. M. van Doornik, and B. A. M. van der Zeijst.** 1993. Effects of multiplicity of infection, bacterial protein synthesis, and growth phase on adhesion to and invasion of human cell lines by *Salmonella* Typhimurium.
Infect. Immun., **61**: 5013-5020

**Lajarin, F., G. Rubio, J. Galvez, and P. Garcia-Penarrubia.** 1996. Adhesion, invasion and intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium in a murine hepatocyte cell line. Effect of cytokines and LPS on antibacterial activity of hepatocytes.
Microb. Pathog., **21**: 319-329

**Lax, A. J., P. A. Barrow, P. W. Jones, and T. S. Wallis.** 1995. Current perspectives in salmonellosis.
Br. Vet. J., **151**: 351-377

**Lee, C. A., S. Falkow.** 1990. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**: 4304-4308

**Lee, C. A., B. D. Jones, and S. Falkow.** 1992. Identification of a *Salmonella* Typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 1847-1851

**Lee, I. S., J. L. Slonezewski, and J. W. Foster.** 1994. A low-pH inducible stationary phase acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium.
J. Bacteriol., **176**: 1422-1426

**Lee, I. S., J. Lin, H. K. Hall, B. Bearson, and J. W. Foster.** 1995. The stationary-phase sigma factor $\sigma^S$ (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella* Typhimurium.
Mol. Microbiol., **17**: 155-167

**Lee, M. D., R. Curtiss III, and T. Peay.** 1996. The effect of bacterial surface structures on the pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium infection in chickens.
Avian Dis., **40**: 28-36

**Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, and T. Ganz.** 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells.
Annu. Rev. Immunol., **11**: 105-128

**Leung, K. Y., and B. B. Finlay.** 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella* Typhimurium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 11470-11474

**Levine, M. M., J. Galen, E. Barry, F. Noriega, S. Chatfield, M. Sztein, G. Dougan, and C. Tacket.** 1996. Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors.
J. Biotechnol., **44**: 193-196

**Libby, S. J., W. Goebel, A. Ludwig, N. Buchmeier, F. Bowe, F. C. Fang, D. G. Guiney, J. G. Songer, and F. Heffron.** 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 489-493

**Licht, T. R., K. A. Krogfelt, P. S. Cohen, L. K. Poulsen, J. Urbance, and S. Molin.** 1996. Role of lipopolysaccharide in colonisation of the mouse intestine by *Salmonella* Typhimurium studied by in situ hybridization.
Infect. Immun., **64**: 3811-3817

**Linde, K.** 1981a. Hochimmunogene *Salmonella*-Mutanten mit zwei unabhängig voneinander attenuierten Markern als potentielle Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Bakterien. I: Eignung der Purin-Auxotrophie für die Herstellung hochimmunogener, stabiler Doppelmarker-Stämme.
Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, **249**: 203-214

**Linde, K.** 1981b. Hochimmunogene *Salmonella*-Mutanten mit zwei unabhängig voneinander attenuierten Markern als potentielle Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Bakterien. II: Spontane chromosomale Antibiotika-Resistenz als Möglichkeit zur Isolierung virulenzgeminderter Klone.
Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, **249**: 350-361

**Linde, K., C. Wonitzki und B. Randhagen.** 1981. Hochimmunogene *Salmonella*-Mutanten mit zwei unabhängig voneinander attenuierten Markern als potentielle Impfstoffe aus vermehrungsfähigen Bakterien. III: Spontane chromosomale Noxenresistenz als Methode zur Isolierung virulenzgeminderter Klone.
Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, **250**: 478-489

**Linde, K.** 1982. Hohe Sensibilität gegen Tenside als zusätzlicher Marker für potentielle Impfstämme aus vermehrungsfähigen Salmonellen.
Arch. Exp. Vet. Med., **36**: 657-662

**Lindgren, S. W., I. Stojiljkovic, and F. Heffron.** 1996. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella* Typhimurium.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 4197-4201

**Lindgren, S. W., and F. Heffron.** 1997. To sting or be stung: bacteria-induced apoptosis.
Trends Microbiol., **5**: 263-264

**Lindquist, B. L., E. Lebenthal, P.-C. Lee, M. W. Stinson, and J. M. Merrick.** 1987. Adherence of *Salmonella* Typhimurium to small-intestinal enterocytes of the rat.
Infect. Immun., **55**: 3044-3050

**Lockman, H. A., and R. Curtiss III.** 1992. Virulence of non-type 1-fimbriated and nonfimbriated nonflagellated *Salmonella* Typhimurium mutants in murine typhoid fever.
Infect. Immun., **60**: 491-496

**Loos, M. und T. M. Wassenaar.** 1994. Pathogenitätsfaktoren von enteritischen Salmonellen.
Immun. Infekt., **22**: 14-19

**Lundberg, U., U. Vinatzer, D. Berdnik, A. von Gabain, and M. Baccarini.** 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes.
J. Bacteriol., **181**: 3433-3437

**MacBeth, K. J., and C. A. Lee.** 1993. Prolonged inhibition of bacterial protein synthesis abolishes *Salmonella* invasion.
Infect. Immun., **61**: 1544-1546

**Martin, G.** 1992. Eigenschaften von Salmonellen und ihre Beziehungen zu Stimulierung von Immunreaktionen.
Mh. Vet. Med., **47**: 632-636

**Martinez-Moya, M., M. A. de Pedro, H. Schwarz, and F. Garcia-del Portillo.** 1998. Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells.
Res. Microbiol., **149**: 309-318

**McConkey, D. J., and S. Orrenius.** 1994. Signal transduction pathways to apoptosis.
Trends Cell Biol., **4**: 370-374

**McCormick, B. A., S. P. Colgan, C. Delp-Archer, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1993. *Salmonella* Typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signaling to subepithelial neutrophils.
J. Cell Biol., **123**: 895-907

**McCormick, B. A., P. M. Hofman, J. Kim, D. K. Carnes, S. I. Miller, and J. L. Madara.** 1995a. Surface attachment of *Salmonella* Typhimurium to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils.
J. Cell Biol., **131**: 1599-1609

**McCormick, B. A., S. I. Miller, D. Carnes, and J. L. Madara.** 1995b. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis.
Infect. Immun., **63**: 2302-2309

**McNeil, A., S. J. Dunstan, S. Clark, and R. A. Strugnell.** 1995. *Salmonella* Typhimurium displays normal invasion of mice with defective epidermal growth factor receptors.
Infect. Immun., **63**: 2770-2772

**Ménard, R., P. Sansonetti, C. Parsot, and T. Vasselon.** 1994. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*.
Cell, **79**: 515-525

**Meyer, H., O. Deja und U. Fach.** 1980. Bovisal-oral "Dessau" – ein mit der Tränke zu verabreichender Lebendimpfstoff gegen die *Salmonella* Dublin-Infektion des Kalbes.
Mh. Vet. Med., **35**: 405-410

**Meyer, H., S. Fischer, I. Hahn, H. Koch, W. Schöll und G. Steinbach, 1986.** Zoosaloral "Dessau" – ein *Salmonella* Typhimurium-Lebendimpfstoff zur Immunprophylaxe in der Rinderproduktion.
Medicamentum, Sonderausgabe für Veterinärmedizin: 6-10

**Meyer, H. G. Steinbach und U. Methner.** 1993. Bekämpfung von *Salmonella*-Infektionen in Tierbeständen – Grundlage der Reduzierung des Salmonelleneintrags in Lebensmitteln.
Dtsch. Tierärzt. Wschr., **100**: 292-295

**Meyer, P. N., M. R. Wilmes-Riesenberg, C. Stathopoulos, and R. Curtiss III.** 1998. Virulence of a *Salmonella* Typhimurium OmpD mutant.
Infect. Immun., **66**: 387-390

**Michetti, P., N. Porta, M. J. Mahan, J. M. Slauch, J. J. Medalanos, A. L. Blum, J.-P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra.** 1994. Monoclonal immunoglobulin A prevents adherence and invasion of polarized epithelial cell monolayers by *Salmonella* Typhimurium. Gastroenterology, **107**: 915-923

**Miller, S. I., and J. J. Mekalanos.** 1990. Constitutive expression of the *phoP* regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages.
J. Bacteriol., **172**: 2485-2490

**Mills, S. D., and B. B. Finlay.** 1994. Comparison of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells. Microb. Pathog., **17**: 409-423

**Mills, S. D., S. R. Ruschkowski, M. A. Stein, and B. B. Finlay.** 1998. Trafficking of porin-deficient *Salmonella* Typhimurium mutants inside HeLa cells: *ompR* and *envZ* mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments.
Infect. Immun., **66**: 1806-1811

**Mills, S. D., and B. B. Finlay.** 1998. Isolation and characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia pseudotuberculosis*-containing phagosomes from infected mouse macrophages: *Y. pseudotuberculosis* traffics to terminal lysosomes where they are degraded.
Eur. J. Cell Biol., **77**: 35-47

**Milstein, M.** 1975. *Salmonella* Dublin septicemia in a Scottish terrier recently imported from England.
Can. Vet. J., **16**: 179-180

**Miras, I., D. Hermant, N. Arricau, and M. Y. Popoff.** 1995. Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi.
Res. Microbiol., **146**: 17-20

**Mitov, I., V. Denchev, and K. Linde.** 1992. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization wirh live oral vaccines of *Salmonella* Typhimurium: auxotrophic mutants with two attenuating markers.
Vaccine, **10**: 61-66

**Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, and S. Falkow.** 1996. *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 9833-9838

**Mroczenski-Wildey, M. J., J. L. Di Fabio, and F. C. Cabello.** 1989. Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella* Typhi: the role of lipopolysaccharide.
Microb. Pathog., **6**: 143-152

**Nardelli-Haeflinger, D., R. B. Roden, J. Benyacoub, R. Sahli, J. P. Kraehenbühl, J. T. Schiller, P. Lachat, A. Potts, and P. De Grandi.** 1997. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella* Typhimurium elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice.
Infect. Immun., **65**: 3328-3336

**Naughton, P. J., G. Grant, R. J. Spencer, S. Bardocz, and A. Pusztai.** 1996. A rat model of infection by *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Enteritidis.
J. Appl. Bacteriol., **81**: 651-656

**Negm, R. S., and T. G. Pistole.** 1998. Macrophages recognize and adhere to an OmpD-like protein of *Salmonella* Typhimurium.
FEMS Immunol. Med. Microbiol., **20**:191-199

**Nevola, J. J., B. A. D. Stocker, D. C. Laux, and P. S. Cohen.** 1985. Colonization of the mouse intestine by an avirulent *Salmonella* Typhimurium strain and its lipopolysaccharide-defective mutants.
Infect. Immun., **50**: 152-159

**Nickerson, C. A., and R. Curtiss III.** 1997. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella* Typhimurium infection.
Infect. Immun., **65**: 1814-1823

**Nietfeld, J. C., D. E. Tyler, L. R. Harrison, J. R. Cole, K. S. Latimer, and W. A. Crowell.** 1992. Invasion of enterocytes in cultured porcine small intestinal mucosal explants by *Salmonella* Choleraesuis.
Am. J. Vet. Res., **53**: 1493-1499

**Norris, T. L., R. A. Kingsley, and A. J. Bäumler.** 1998. Expression and transcriptional control of the *Salmonella* Typhimurium *lpf* fimbrial operon by phase variation.
Mol. Microbiol., **29**: 311-320

**Ochman, H., and E. A. Groisman.** 1995. The evolution of invasion by enteric bacteria. Can. J. Microbiol., **41**: 555-561

**Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 7800-7804

**Ogunniyi, A. D., I. Kotlarski, R. Morona, and P. A. Manning.** 1997. Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. Infect. Immun., **65**: 708-717

**Oh, Y. K., C. Alpuche-Aranda, E. Berthiaume, T. Jinks, S. I. Miller, and J. A. Swanson.** 1996. Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella* Typhimurium. Infect. Immun., **64**: 3877-3883

**Owen, R.** 1994. M cells - entryways of opportunity for enteropathogens. J. Exp. Med., **180**: 7-9

**Pace, J., M. J. Hayman, and J. E. Galán.** 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *Salmonella* Typhimurium. Cell, **72**: 505-514

**Pantaloni, D., and M.-F. Carlier.** 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4. Cell, **75**: 1007-1014

**Pardon, P, R. Sanchis, J. Marly, F. Lantier, L. Guilloteau, D. Buzoni-Gatel, I. P. Oswald, M. Pepin, B. Kaeffer, and P. Berthon.** 1990. Experimental ovine Salmonellosis (*Salmonella* Abortus ovis): Pathogenesis and vaccination. Res. Microbiol., **141**: 945-953

**Pascopella, L., B. Raupach, N. Ghori, D. Monack, S. Falkow, and P. L. C. Small.** 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella* Typhi and *Samonella* Gallinarum. Infect. Immun., **63**: 4329-4335

**Pegues, D. A., M. J. Hantman, I. Behlau, and S. I. Miller.** 1995. PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes: evidence for a role in protein secretion. Mol. Microbiol., **17**: 169- 181

**Penheiter, K. L., N. Mathur, D. Giles, T. Fahlen, and B. D. Jones.** 1997. Non-invasive *Salmonella* Typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. Mol. Microbiol., **24**: 697-709

**Porter, S. B., and R. Curtiss III.** 1997. Effect of *inv* mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks.
Avian Dis., **41**: 45-57

**Pring, M., A. Weber, and M. R. Bubb.** 1992. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end.
Biochemistry, **31**: 1827-1836

**Rakeman, J. L., H. R. Bonifield, and S. I. Miller.** 1999. A HilA-independent pathway to *Salmonella* Typhimurium invasion gene transcription.
J. Bacteriol., **181**: 3096-3104

**Rathman, M., M. D. Sjaastad, and S. Falkow.** 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella* Typhimurium in murine macrophages.
Infect. Immun., **64**: 2765-2773

**Rathman, M., L. P. Barker, and S. Falkow.** 1997. The unique trafficking pattern of *Salmonella* Typhimurium-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry.
Infect. Immun., **65**: 1475-1485

**Reed, K. A., T. A. Booth, B. H. Hirst, and M. A. Jepson.** 1996. Promotion of *Salmonella* Typhimurium adherence and membrane ruffling in MDCK epithelia by staurosporine.
FEMS Microbiol. Lett., **145**: 233-238

**Rice, D. H., T. E. Besser, and D. D. Hancock.** 1997. Epidemiology and virulence assessment of *Salmonella* Dublin.
Vet. Microbiol., **56**: 111-124

**Richter-Dahlfors, A., A. M. J. Buchan, and B. B. Finlay.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes *in vivo.*
J. Exp. Med., **186**: 569-580

**Riikonen, P., P. H. Mäkelä, H. Saarilahti, S. Sukupolvi, S. Taira, and M. Rhen.** 1992. The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages.
Microb. Pathog., **13**: 281-291

**Robertsson, J. A., A. A. Lindberg, S. Hoiseth, and B. A. D. Stocker.** 1983. *Salmonella* Typhimurium infection in calves: Protection and survival of virulent challenge bacteria after immunization with live or inactivated vaccines.
Infect. Immun., **41**: 742-750

**Roland, K. L., L. E. Martin, C. R. Esther, and J. K. Spitznagel.** 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella* Typhimurium LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence.
J. Bacteriol., **175**: 4154-4164

**Rosenshine, I., and B. B. Finlay.** 1993. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria.
Bioessays, **15**: 17-24

**Rosenshine, I., S. Ruschkowski, V. Foubister, and B. B. Finlay.** 1994. *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells: role of the induced host cell tyrosine protein phosphorylation.
Infect. Immun., **62**: 4969-4974

**Rubino, S., G. Leori, P. Rizzu, G. Erre, M. M. Colombo, S. Uzzau, G. Masala, and P. Cappuccinelli.** 1993. Tn*phoA Salmonella* Abortusovis mutants unable to adhere to epithelial cells and with reduced virulence in mice.
Infect. Immun., **61**: 1786-1792

**Ruschkowski, S., I. Rosenshine, and B. B. Finlay.** 1992. *Salmonella* Typhimurium induces an inositol phosphate flux in infected epithelial cells.
FEMS Microbiol. Lett., **74**: 121-126

**Saarinen, M., L. J. Felliniemi, and K. Granfors.** 1996. Survival and degradation of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in intestinal epithelial cells *in vitro*.
J. Med. Microbiol., **45**: 463-471

**Sansonetti, P. J.** 1994. *Shigella flexneri*: from *in vitro* invasion of epithelial cells to infection of the intestinal barrier.
Biochem. Soc. Trans., **22**: 295-298

**Schiemann, D. A., and S. R. Shope.** 1991. Anaerobic growth of *Salmonella* Typhimurium results in increased uptake by Henle-407 epithelial and mouse peritoneal cells *in vitro* and repression of a major outer membrane protein.
Infect. Immun., **59**: 437-440

**Schwan, W. R., and D. J. Kopecko.** 1997. Serovar specific differences in *Salmonella* survival within macrophage cells.
Adv. Exp. Med. Biol., **412**: 277-278

**Schwarz, S., B. Liebisch, M. Mitsching, H.-J. Selbitz und S. Springer.** 1995. Die komplexe Charakterisierung von *Salmonella*-Stämmen für Lebendimpfstoffe – dargestellt am Beispiel einer auxotrophen *Salmonella* Typhimurium-Mutante.
Tierärztl. Umschau, **50**: 832-843

**Shariff, A., and E. J. Luna.** 1992. Diacylglycerol-stimulated formation of actin nuclation sites at plasma membranes.
Science, **256**: 245-247

**Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**: 2593-2597

**Shea, J. E., C. R. Beuzokn, C. Gleeson, R. Mundy, and D. W. Holden.** 1999. Influence of the *Salmonella* Typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in mice.
Infect. Immun., **67**: 213-219

**Silva, E., G. H. Snoeyenbos, O. M. Weinack, and C. F. Smyser.** 1981. Studies on the use of *Salmonella* Gallinarum as vaccine in chickens.
Avian Dis., **25**: 38-52

**Sizemore, D. R., E. A. Elsinghorst, L. C. Eck, A. A. Branstrom, D. L. Hoover, R. L. Warren, and F. A. Rubin.** 1997. Interaction of *Salmonella* Typhi strains with cultured human monocyte-derived macrophages.
Infect. Immun., **65**: 309-312

**Small, P. L. C., R. R. Isberg, and S. Falkow.** 1987. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEp-2 cells.
Infect. Immun., **55**: 1674-1679

**Smith, I. M., and H. Williams.** 1956. The use of live vaccines in experimental *Salmonella* Gallinarum infection in chickens with observation on their interference effect.
J. Hyg., **54**: 419-432

**Stein, M. A., K. Y. Leung, M. Zwick, F. Garcia del Portillo, and B. B. Finlay.** 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells.
Mol. Microbiol., **20**: 151-164

**Stocker**, B. A. 1988. Auxotrophic *Salmonella* as live vaccine.
Vaccine, **6**: 141-145

**Tada, H., O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, and K. Tsukamoto.** 1986. An improved colorimetric assay for interleukin 2.
J. Immunol. Meth., **93**: 157-165

**Takeuchi, A.** 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection: penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella* Typhimurium.
Am. J. Path., **50**: 109-136

**Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli, and B. B. Finlay.** 1993. Methods to study bacterial invasion.
J. Microbiol. Meth., **18**: 227-240

**Tannock, G. W., R. V. H. Blumershine, and D. C. Savage.** 1975. Association of *Salmonella* Typhimurium with, and its invasion of, the ileal mucosa in mice.
Infect. Immun., **11**: 365-370

**Tartera, C., and E. S. Metcalf.** 1993. Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella* Typhi adherence to and invasion of human intestinal cells.
Infect. Immun., **61**: 3084-3089

**Thankavel, K., A. H. Shah, M. S. Cohen, T. Ikeda, R. G. Lorenz, R. Curtiss III, and S. N. Abraham.** 1999. Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella* Typhimurium type 1 fimbriae
J. Biol. Chem., **274**: 5797-5809

**Thiagarajan, D., M. Saeed, J. Turek, and E. Asem.** 1996. *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella* Enteritidis phage type 8.
Infect. Immun., **64**: 5015-5021

**Thorns, C. J., C. Turcotte , C. G. Gemmell, and M. J. Woodward.** 1996. Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis.
Microb. Pathog., **20**: 235-246

**Toebe, C. S., J. D. Clements, L. Cardenas, G. J. Jennings, and M. F. Wiser.** 1997. Evaluation of immunogenicity of an oral *Salmonella* vaccine expressing recombinant Plasmodium berghei merozoite surface protein-1.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **56**: 192-199

**van der Velden, A. W., A. J. Bäumler, R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice.
Infect. Immun., **66**: 2803-2808

**Verjans, G. M., J. H. Ringrose, L. van Alphen, T. E. W. Feltkamp, and J. G. Kusters.** 1994. Entrance and survival of *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia enterocolitica* within human B- and T-cell lines.
Infect. Immun., **62**: 2229-2235

**Véscovi, E. G., F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 1994. The role of PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence.
Res. Microbiol., **145**: 473-480

**Vielitz, E., C. Conrad, M. Voss, U. Löhren, J. Bachmeier und I. Hahn.** 1992. Immunisierung gegen *Salmonella*-Infektionen mit Lebend- und Inaktivat-Vakzinen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., **90**: 483-485

**Vladoianu, I.-R., H. R. Chang, and J.-C. Pechère.** 1990. Expression of host resistance to *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium: bacterial survival within macrophages of murine and human origin.
Microb. Pathog., **8**: 83-90

**Watson, P. R., S. M. Paulin, A. P. Bland, P. W. Jones, and T. S. Wallis.** 1995. Characterization of intestinal invasion by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Dublin and effect of a mutation in the *invH* gene.
Infect. Immun., **63**: 2743-2754

**Weide-Botjes, M. B. Liebisch, S. Schwarz, and J. L. Watts.** 1996. Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis field isolates and differentiation from homologous live vaccine strains suisaloral and SC-54.
J. Clin. Microbiol., **34**: 2460-2463

**Wells, C. L., R. P. Jechorek, S. B. Olmstedt, and S. L. Erlandsen.** 1993a. Effect of LPS on epithelial integrity and bacterial uptake in the polarized human enterocyte-like cell line Caco-2.
Circ. Shock, **40**: 276-288

**Wells, C. L., B. A. Feltis, D. F. Hanson, R. P. Jechorek, and S. L. Erlandsen.** 1993b. Oral infectivity and bacterial interactions with mononuclear phagocytes.
J. Med. Microbiol., **38**: 345-353

**Wells, C. L., E. M. van de Westerlo, R. P. Jechorek, and S. L. Erlandsen.** 1996. Intracellular survival of enteric bacteria in cultured human enterocytes.
Shock, **6**: 27-34

**Wilson, D. R., S. Chatfield, J. Betts, A. Griffiths, K. Y. Leung, G. Dougan, and B. B. Finlay.** 1990. Alternative methods of attenuating *Salmonella* species for potential vaccine use.
Res. Microbiol., **141**: 827-830

**Wood, M. W., R. Rosqvist, P. B. Mullan, M. H. Edwards, and E. E. Galyov.** 1996. SopE, a secreted protein of *Salmonella* Dublin, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry.
Mol. Microbiol., **22**: 327-338

**Worton, K. J., D. C. A. Candy, T. S. Wallis, G. J. Clarke, M. P. Osborne, S. J. Haddon, and J. Stephen.** 1989. Studies on early association of *Salmonella* Typhimurium with intestinal mucosa *in vivo* and *in vitro*; relationship to virulence.
J. Med. Microbiol., **29**: 283-294

**Zhang-Barber, L., A. K. Turner, and P. A. Barrow.** 1999. Vaccination control for *Salmonella* in poultry.
Vaccine, **17**: 2538-2545

**Zierler, M. K., and J. E. Galán.** 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella* Typhimurium invasion protein InvJ.
Infect. Immun., **63**: 4024-4028

# 8. ANHANG

## 8.1 Bezugsquellen für Chemikalien und Geräte

| verwendete Reagenzien | Bezugsquelle | Artikel-Nr. |
|---|---|---|
| Bacto-Trypton | Difco, Augsburg | 0123-17-3 |
| Fetales Kälberserum (FKS) | PanSystems | 30-102-74 |
| Gentamicin | Sigma, Deisenhofen | G 1522 |
| Glutamin (200 mM) | Gibco, Eggenstein | 25030-024 |
| HEPES | Gibco, Eggenstein | 066-01344 M |
| MTT | Sigma, Deisenhofen | M-2128 |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Gibco, Eggenstein | 15140-114 |
| RPMI 1640-Medium | Gibco, Eggenstein | 074-01800 P |
| SDS (Natrium-Dodecylsulfat) | Serva, Heidelberg | 20763 |
| Triton-X-100 | Sigma, Deisenhofen | T 8787 |
| Trypsinlösung 0,25 % | Gibco, Eggenstein | 25050-022 |

alle weiteren Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen

| verwendete Geräte | Bezugsquelle | Typ |
|---|---|---|
| Schüttelinkubator | Janke und Kunkel | KS 500 |
| Plattenphotometer | Flow Laboratories | Multiscan MCC 340 |
| Tischphotometer | Kontron Instruments | Uvikon 810 |
| Tischzentrifuge 1 | Eppendorf, Hamburg | 5415 C |
| Tischzentrifuge 2 | Heraeus, Hanau | Sepatech Omnifuge 2.0RS |
| Polystyrolkulturflaschen | Nunc, Wiesbaden | 260 ml und 500 ml |
| Mikrotiterplatten | Nunc, Wiesbaden | F-Form |
| Brutschrank | Heraeus, Hanau | BB 6220 CU |

## 8.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

### 8.2.1 Nährmedien für die Bakterienanzucht

**Blutagar-Nährboden:**

| | |
|---|---|
| Blutagar-Trockensubstanz | 50,00 g |
| Schüttelblut | 50,00 ml |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

**Gassner-Nährboden:**

| | |
|---|---|
| Gassner-Agar-Trockensubstanz | 77,00 g |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

**Luria-Bertani-Medium (LBM):**

| | |
|---|---|
| NaCl | 5,00 g |
| Hefe-Extrakt | 5,00 g |
| Bacto-Trypton | 10,00 g |
| NaOH 1M | 4,00 ml |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**Müller-Hinton-Bouillon (MHB):**

| | |
|---|---|
| Müller-Hinton-Bouillon-Trockensubstanz | 21,00 g |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

**Müller-Hinton-Agar:**

| | |
|---|---|
| Müller-Hinton-Agar-Trockensubstanz | 34,00 g |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

**NB I-Stichagar:**

| | |
|---|---|
| Standard I Nährbouillon-Trockensubstanz | 25,00 g |
| Agar | 2,00 g |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

**Trypticase-Soja-Agar:**

| | |
|---|---|
| Trypticase-Soja-Agar-Trockensubstanz | 40,00 g |
| Aqua bidest. | 1000,00 ml |

### 8.2.2 Nährmedien und Puffer für Zellkultur und Infektionsversuche

**Zellkulturmedium 1:**

| | |
|---|---|
| RPMI 1640 | 10,31 g |
| 200 mM Glutamin | 10,00 ml |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung ($10^4$ U/ml Pen.; $10^4$ U/ml Strep.) | 10,00 ml |
| FKS | 100,00 ml |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**Zellkulturmedium 2:**

wie Zellkulturmedium 1, nur ohne Zusatz von Penicillin-Streptomycin-Lösung

**Zellkulturmedium 3:**

| | |
|---|---|
| BME-Konzentrat | |
| Tryptose-Phosphat-Brühe | 100,00 ml |
| HEPES | 15,00 ml |
| Moronal-Suspension (100 000 IE/ml) | 0,50 ml |
| Gentamicin (50 mg/ml) | 1,00 ml |
| NaOH (5mol) | 1,60 ml |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**EDTA-Puffer (0,2% in HEPES-Puffer):**

| | |
|---|---|
| Tritriplex IIIR | 2,00 g |
| HEPES-Puffer (s.d.) | ad 1000,00 ml |

**Einfriermedium:**

| | |
|---|---|
| FKS | 5,00 ml |
| DMSO | 1,00 ml |

**Giemsa-Färbelösung:**

| | |
|---|---|
| Giemsa-Lösung | 1,50 ml |
| Aqua bidest | ad 15,00 ml |

**HEPES-Puffer pH 7,4:**

| | |
|---|---|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,30 g |
| HEPES | 2,38 g |
| Glucose | 2,00 g |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,2:**

| | |
|---|---|
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,20 g |
| $KH_2PO_4$ | 2,00 g |
| $NaH_2PO_4$ x 2 $H_2O$ | 9,70 g |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**SDS-Lösung:**

| | |
|---|---|
| Natrium-Dodecylsulfat | 100,00 g |
| HCl 1N | 10,00 ml |
| Aqua bidest. | ad 1000,00 ml |

**Trypanblaulösung:**

| | |
|---|---|
| NaCl | 4,38 g |
| Trypanblau | 0,10 g |
| Aqua bidest. | ad 500,00 ml |

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die Bereitstellung der Mittel, die zur Erstellung dieser Arbeit notwendig waren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. habil. Rolf Bauerfeind für die konstruktive Betreuung, seine stets gewährte produktive Diskussionsbereitschaft und sein nicht nachlassendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. Christian Menge und Frau Anja Schwanitz danke ich für die Einführung in die zellkulturtechnischen Arbeiten sowie für die jederzeit gewährte technische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta und den Mitarbeitern des Institutes für Geflügelkrankheiten danke ich für die wöchentliche Bereitstellung frischer HEF-Zellkulturen. Bei Herrn Dr. Werner Herbst bedanke ich mich für die Bereitstellung der FKL-Zellkulturen.

Für die statistische Ausarbeitung der Daten bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biomathematik, Herrn Dr. K. Failing und Herrn Heiter.

Zu guter Letzt bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere für die freundliche Aufnahme, die erwiesene Hilfsbereitschaft und besonders für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, das mir den Aufenthalt am Institut so angenehm gestaltete.