

**Virulenz von klinischen *Salmonella* Infantis
Isolaten im Mausmodell**

Masterarbeit
im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von
Antje Cornelius

Hamburg, am 10. Juni 2014

Diese Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in der Arbeitsgruppe „Entzündungsmodelle“ am Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä

2. Gutachter: Prof. Dr. Guntram A. Grassl

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig, ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Wörtlich oder dem Sinn gemäß aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Antje Cornelius

Hamburg, 10. Juni 2014

*„My head's under water, but I'm breathing fine“
(John Legend)*

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabellenverzeichnis..... | VII |
| Abbildungsverzeichnis..... | VIII |
| Abkürzungsverzeichnis..... | X |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Wirt-Pathogen-Interaktion | 2 |
| 1.2. <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis in Israel..... | 4 |
| 1.3. Das Maus-Colitis-Modell..... | 6 |
| 1.4. Zelllinien | 7 |
| 1.4.1. Caco-2/BBE 1 Epithelzellen | 7 |
| 1.4.2. ANA-1 Makrophagen..... | 9 |
| 2. Zielsetzung | 11 |
| 3. Materialien und Methoden | 12 |
| 3.1. Materialien | 12 |
| 3.1.1. Verwendete Chemikalien | 12 |
| 3.1.2. Pufferlösungen und Nährmedien..... | 14 |
| 3.1.3. Bakterienstämme | 16 |
| 3.1.4. Kits..... | 16 |
| 3.1.5. Antikörper..... | 17 |
| 3.1.6. Geräte und Hersteller | 18 |
| 3.2. Methoden..... | 19 |
| 3.2.1. Bestimmung der Wachstumskurven verwendeter Bakterienstämme | 19 |
| 3.2.2. Bestimmung der <i>in vitro</i> -Infektionsdosis von Bakterienkulturen über die optische Dichte..... | 20 |
| 3.2.3. <i>In vivo</i> -Infektionen im Mausmodell | 20 |
| 3.2.3.1. Maushaltung | 20 |
| 3.2.3.2. Infektion der Mäuse und Organentnahme | 21 |
| 3.2.3.3. Bestimmung der Keimlast je Organ..... | 22 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.3.4. | Histologie..... | 23 |
| 3.2.3.4.1. | Fixierung, Paraffineinbettung und Schnittpräparation | 23 |
| 3.2.3.4.2. | Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)..... | 23 |
| 3.2.3.4.3. | Pathologische Beurteilung..... | 24 |
| 3.2.3.4.4. | Immunhistologische Fluoreszenzfärbung | 25 |
| 3.2.4. | <i>In vitro</i> -Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen | 25 |
| 3.2.4.1. | Versuche mit Epithelzellen (Caco-2/BBe 1) | 26 |
| 3.2.4.1.1. | Differenzierung und Polarisierung (Caco-2/BBe 1) | 26 |
| 3.2.4.1.2. | Versuchsdurchführung (Caco-2/BBe 1)..... | 27 |
| 3.2.4.2. | Versuche mit Makrophagen (ANA-1)..... | 28 |
| 3.2.4.2.1. | Versuchsdurchführung (ANA-1) | 28 |
| 3.2.4.3. | Fixierung der Zellen <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.2.5. | Molekularbiologische Analytik..... | 30 |
| 3.2.5.1. | RNA-Isolierung | 30 |
| 3.2.5.2. | Reverse Transkription..... | 30 |
| 3.2.5.3. | quantitative real-time PCR (q-PCR)..... | 30 |
| 3.2.5.4. | Proteinbestimmung mittels ELISA | 32 |
| 3.2.5.5. | Immunfluoreszenzfärbung <i>in vitro</i> (Caco-2/BBe 1) | 32 |
| 3.2.5.6. | Inside-Outside-Staining von <i>Salmonella</i> (ANA-1)..... | 33 |
| 3.2.6. | Statistische Analyse | 34 |
| 4. | Ergebnisse | 35 |
| 4.1. | Wachstumskurven der verwendeten <i>Salmonella</i> -Stämme | 35 |
| 4.2. | <i>In vivo</i> -Infektionen im Mausmodell | 37 |
| 4.2.1. | Vergleich der intestinalen und systemischen Besiedlung nach unterschiedlich langen Infektionsphasen | 39 |
| 4.2.2. | Bestimmung der Gewichte isolierter Caeca | 43 |
| 4.2.3. | Bestimmung des Entzündungsgrades der isolierten Caeca | 45 |
| 4.2.4. | Visualisierung caecaler Zellstrukturen mittels Immunfluoreszenzfärbung..... | 49 |

| | | |
|----------|---|----|
| 4.2.5. | Untersuchung der proinflammatorischen Zytokin-Expression mittels qPCR..... | 52 |
| 4.2.6. | Bestimmung der Konzentration einzelner Zytokine mittels ELISA..... | 55 |
| 4.3. | <i>In vitro</i> -Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen..... | 57 |
| 4.3.1. | Versuche mit Epithelzellen (Caco-2/BBe 1)..... | 58 |
| 4.3.1.1. | Messung des transepithelialen Widerstandes eines Caco-2/BBe 1-Monolayers nach bakterieller Infektion | 59 |
| 4.3.1.2. | Charakterisierung des Caco-2/BBe 1-Monolayers nach bakterieller Translokation mittels Immunfluoreszenzfärbung | 62 |
| 4.3.1.3. | Quantifizierung der bakteriellen Translokation..... | 64 |
| 4.3.2. | Versuche mit der Makrophagen-Zelllinie ANA-1 | 66 |
| 4.3.2.1. | Quantitative Bestimmung der intrazellulären und adhärenenten Salmonellen | 66 |
| 4.3.2.2. | Immunfluoreszenzfärbung von infizierten Makrophagen (Inside-Outside Staining)..... | 68 |
| 5. | Diskussion..... | 72 |
| 5.1. | Eigenschaften des Virulenzplasmids pESI..... | 72 |
| 5.2. | <i>In vivo</i> -Virulenz von <i>S. Infantis</i> im Mausmodell..... | 73 |
| 5.2.1. | pESI verstärkt die intestinale Besiedlung und systemische Belastung | 73 |
| 5.2.2. | pESI verstärkt den Schweregrad der intestinalen Entzündung..... | 75 |
| 5.2.3. | pESI verursacht die massive Hochregulation proinflammatorischer Zytokine..... | 76 |
| 5.3. | <i>In vitro</i> -Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen..... | 77 |
| 5.3.1. | pESI nimmt keinen Einfluss auf die bakterielle Translokation durch die epitheliale Barrierschicht | 77 |
| 5.3.2. | pESI hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation in Makrophagen..... | 78 |
| 6. | Zusammenfassung | 80 |
| 7. | Literatur | 81 |
| 8. | Anhang | i |
| 9. | Danksagung | i |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Zur Analytik verwendeten Chemikalien | 12 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung für den PBS-Puffer (10x) | 14 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung für den TBST-Puffer | 14 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung für den Lyse-Puffer..... | 14 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung für den Standard-Färbepuffer..... | 15 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung für das Zellkultur-Medium <i>Caco-2/BBe 1</i> | 15 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung für das Zellkultur-Medium <i>ANA-1</i> | 15 |
| Tabelle 8: Bakterienstämme und deren Eigenschaften | 16 |
| Tabelle 9: Verwendete Kits..... | 16 |
| Tabelle 10: Primäre Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung | 17 |
| Tabelle 11: Sekundäre Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung..... | 17 |
| Tabelle 12: Verwendete Geräte und Software..... | 18 |
| Tabelle 13: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen für die jeweiligen Bakterienstämme | 19 |
| Tabelle 14: Scoring-Tabelle zur Beurteilung des Entzündungsgrads bei..... <i>in vivo</i> -Versuchen..... | 24 |
| Tabelle 15: Primer-Paarungen und deren Sequenzen für die quantitative real-time PCR | 31 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Entwicklung von <i>Salmonella</i> -Isolaten in Israel (1995 - 2013)..... | 5 |
| Abbildung 2: Dimorphe Mikrovillus-Strukturen der Zelllinie Caco-2/BBe 1 | 8 |
| Abbildung 3: Morphologie von ANA-1 Makrophagen..... | 10 |
| Abbildung 4: OD ₆₀₀ -basierte Wachstumskurven der ursprünglichen <i>Salmonella</i> - Isolate | 36 |
| Abbildung 5: cfu-basierte Wachstumskurven der ursprünglichen <i>Salmonella</i> - Isolate | 37 |
| Abbildung 6: Intestinale Keimlast nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit <i>Salmonella</i> | 40 |
| Abbildung 7: Systemische Keimlast nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit <i>Salmonella</i> | 41 |
| Abbildung 8: Intestinale Keimlast nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit <i>Salmonella</i> | 42 |
| Abbildung 9: Systemische Keimlast nach 96 h-Infektionen von C57BL/6- Mäusen mit <i>Salmonella</i> | 42 |
| Abbildung 10: Reduktion des Caecum-Gewichtes als Folge einer Salmonellen- induzierten Colitis..... | 44 |
| Abbildung 11: Pathologische Veränderungen von Caeca nach Infektionen mit <i>Salmonella</i> | 46 |
| Abbildung 12: Pathologische Bewertung infizierter Caeca..... | 48 |
| Abbildung 13: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung eines Caecum-Paraffin- schnitts von nicht infizierten C57BL/6-Mäusen..... | 49 |
| Abbildung 14: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Caecum-Paraffin- schnitten nach Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprüng- lichen <i>Salmonella</i> -Isolaten | 50 |
| Abbildung 15: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Caecum-Paraffin- schnitten nach Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit <i>S. Infantis</i> -Mutanten..... | 51 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 16: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprünglichen <i>Salmonella</i> -Isolaten..... | 53 |
| Abbildung 17: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit <i>S. Infantis</i> -Mutanten | 14 |
| Abbildung 18: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprünglichen <i>Salmonella</i> -Isolaten..... | 54 |
| Abbildung 19: Zytokin-Konzentrationen nach 24 h-Infektionen mit <i>Salmonella</i> | 14 |
| Abbildung 20: Zytokin-Konzentrationen nach 96 h-Infektionen mit ursprünglichen <i>Salmonella</i> -Isolaten | 57 |
| Abbildung 21: TER-Zunahme während der Ausbildung eines Monolayers | 59 |
| Abbildung 22: TER-Abnahme nach 1,5 h-Infektionen mit ursprünglichen <i>Salmonella</i> -Isolaten..... | 61 |
| Abbildung 23: TER-Abnahme nach 1,5 h-Infektionen mit <i>S. Infantis</i> -Mutanten | 62 |
| Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbungen von ZO-1 nach 1,5 h-Infektionen mit <i>Salmonella</i> | 16 |
| Abbildung 25: Bakterielle Translokation durch eine epitheliale Barrierschicht nach 1,5 h-Infektionen mit <i>Salmonella</i> | 66 |
| Abbildung 26: <i>Salmonella</i> infizieren Makrophagen und überleben intrazellulär | 68 |
| Abbildung 27: Inside-Outside Staining von mit <i>S. T. SL1344</i> infizierten und nicht infizierten ANA-1 Makrophagen..... | 70 |
| Abbildung 28: Inside-Outside Staining von ANA-1 Makrophagen nach Infektionen mit den ursprünglichen <i>S. Infantis</i> -Isolaten..... | 71 |
| Abbildung 29: Inside-Outside Staining von ANA-1 Makrophagen nach Infektionen mit den mutierten <i>S. Infantis</i> -Isolaten | 71 |
| Abbildung I: Vergleich der OD ₆₀₀ -basierten Wachstumskurven der ursprünglichen <i>S. Infantis</i> -Isolate in LB und LB inkl. Streptomycin | i |
| Abbildung II: Vergleich der cfu-basierten Wachstumskurven der ursprünglichen <i>S. Infantis</i> -Isolate in LB und LB inkl. Streptomycin | i |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| <i>A. dest</i> | <i>Aqua destillata</i> |
| AK | Antikörper |
| BBe | Brush border expressing |
| cfu | colony forming unit |
| Ct-Methode | Cycle Threshold-Methode |
| DAPI | 4', 6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | Dendritische Zelle |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HCL | Salzsäure (in Wasser gelöst) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IVC | individually ventilated cage |
| MCH | Major Histocompatibility Complex |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein-1 |
| mLK | mesenterischer Lymphknoten |
| MOI | Multiplicity of Infection |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NLR | NOD-like Rezeptor |
| NTS | nicht-typhoide Salmonellose |
| OD | optische Dichte |
| PAMP | pathogen-associated molecular pattern |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| Pen /Strep | Penicillin / Streptomycin |
| PFGE | Pulsed-Field-Gelelektrophorese |
| PMN | Polymorphnukleäre Leukozyten |
| RELM- β | Resistin-like molecule- β |
| RT | Raumtemperatur |
| <i>S. Infantis</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis |
| <i>S. Typhi</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi |
| <i>S. Typhimurium</i> | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium |
| SCV | <i>Salmonella</i> umschließende Vakuole |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SPI | <i>Salmonella</i> Pathogenitäts-Insel |
| T3SS | Typ 3-Sekretionssystem |

| | |
|---------------|----------------------------------|
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| TER | Transepithelialer Widerstand |
| TJ | Tight Junction |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| ü. N. | über Nacht |

1. Einleitung

Eine Infektion mit Salmonellen führt sehr häufig zu schwerwiegenden gesundheitlichen Problemen und wird allgemein als Salmonellose bezeichnet. Dabei wird nach Erregern zwischen einer durch *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) und *S. Paratyphi* induzierten Salmonellose und einer nicht-typhoiden Salmonellose (NTS), unterschieden (de Jong *et al.*, 2012). Mit bis zu 93,8 Millionen Fällen weltweit und geschätzten 155000 Todesfällen pro Jahr zählt die NTS zu einer der häufigsten bakteriellen Erkrankungen (Majowicz *et al.*, 2010) und hat damit eine hohe Relevanz in der Forschung zur Entwicklung neuer Therapien und Impfstoffe.

Die Erreger der Gattung *Salmonella* sind gram-negative, stäbchenförmige, frei-bewegliche und fakultativ anaerobe Bakterien (Coburn *et al.*, 2007). Sie werden in die zwei Spezies *Salmonella bongori* und *Salmonella enterica* differenziert, wobei *S. enterica* nochmals in sechs Subspezies eingeteilt wird und über 2600 Serovare zusammenfasst (Aviv *et al.*, 2013). Während typhoide Salmonellen an den Menschen adaptiert sind, besitzen viele nicht-typhoide Salmonellen ein sehr breites Wirtsspektrum und können sowohl Säugetiere, als auch Geflügel und Pflanzen infizieren (Hernández-Reyes und Schikora, 2013).

Als die häufigsten Isolate gelten *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) und serovar Enteritidis, welche nach oraler Aufnahme zu einer Gastroenteritis (bei Menschen und Geflügel) oder einer Colitis (bei Mäusen) führen (Grassl *et al.*, 2008). Neben diesen Isolaten tritt in jüngster Zeit vor allem ein weiterer Serovar immer mehr in den Vordergrund: *Salmonella enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*). Bei Untersuchungen der jährlichen Entwicklungen von NTS-Infektionen in Israel zwischen 1995 und 2009 wurde gezeigt, dass nach einer Phase mit stetig abnehmenden Fallzahlen ab 2006 ein erneuter Anstieg der Inzidenz zu beobachten war. Diese Zunahme der NTS-Infektionen wurde durch den parallelen Anstieg des Serovars *S. Infantis* begleitet – statt dem bis 2005 eher niedrigen relativen Anteil von weniger als 10 % an gesamt gemeldeten Salmonellosen, zählten 2009 34 % aller aus Israel stammenden Isolate zum Serovar *S. Infantis* (Gal-Mor *et al.*, 2010).

1. Einleitung

1.1. Wirt-Pathogen-Interaktion

Die meisten bis heute gewonnenen Erkenntnisse zur Charakterisierung der NTS basieren auf Versuchen mit *S. Typhimurium*. Dabei verläuft eine Infektion mit nicht-typhoiden Salmonellen über mehrere Schritte: Nachdem das Pathogen durch kontaminierte Lebensmittel oral aufgenommen wurde und in den Magen-Darm-Trakt vorgedrungen ist, erfolgt die Invasion in die Epithelschicht des Darms. Diese Invasion kann sowohl durch passive als auch aktive Mechanismen zwischen *S. Typhimurium* und den Wirtszellen umgesetzt werden – zum einen kann das Pathogen passiv durch spezialisierte Zellen wie beispielsweise dendritische Zellen (engl.: „Dendritic cells“ - DCs), Neutrophile, Makrophagen oder M-Zellen phagozytisch aufgenommen werden oder selbst aktiv in Epithelzellen eindringen (Kawakami und Ando, 2013).

Eine aktive Interaktion mit der Wirtszelle wird durch verschiedene Virulenzfaktoren der Bakterien ermöglicht, welche unter anderem auf Chromosomenregionen mit der Bezeichnung *Salmonella* Pathogenitäts-Insel (engl.: „*Salmonella* Pathogenicity Islands“ - SPIs) kodiert sind (de Jong *et al.*, 2012). Zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion sind die beiden Typ 3-Sekretionssysteme 1 und 2 (T3SS1/2), welche jeweils auf den SPI-1/-2 kodiert sind, beteiligt. Im frühen Stadium der Wirt-Pathogen-Interaktion dient das T3SS1 der Kontaktaufnahme zwischen *Salmonella* und dem Wirt und der Injektion von Proteinen in das Zytosol der Wirtszelle, welche auch als Effektoren bezeichnet werden. Diese Effektoren (z.B.: SipA, SopB, SopE und SopE2) führen zu einer Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle, dem Aufbrechen von Tight Junctions und der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Raffatelli *et al.*, 2005; Sasakawa, 2009). Als Folge der beschriebenen Modifikation innerhalb der Wirtszelle wird die Invasion der Salmonellen erleichtert und die Bildung von intrazellulären Einschlüssen, auch als *Salmonella* umschließende Vakuole (engl.: „*Salmonella*-containing vacuoles“ - SCVs) bezeichnet, gefördert (Völk, 2011; Sterzenbach *et al.*, 2013). Das Überleben und die Replikation der in den SCVs befindlichen Salmonellen werden in der späten Phase der Invasion durch das T3SS2

1. Einleitung

unterstützt. Das Ansäuern des Milieus innerhalb der SCVs löst die Induktion von weiteren Effektorproteinen durch T3SS2 in das Wirtszytosol aus. Diese Effektorproteine wie beispielsweise SifA sichern die Integrität der SCVs, schützen vor phagozytotischen Enzymen und begünstigen die Replikation von *Salmonella*. So sind die SCVs zwar am frühen Endozytose-Transportweg beteiligt, aber die intrazelluläre Verschmelzung mit Lysosomen und damit der Kontakt mit Schutzmechanismen des Wirts werden unterbunden (Hautefort *et al.*, 2008).

Neben diesen hochkonservierten Sekretionssystemen gibt es noch weitere Faktoren, welche die Virulenz der Salmonellen ausmachen. So konnte gezeigt werden, dass viele Isolate Virulenzplasmide tragen, welche über horizontalen Gentransfer übertragbar sind und *Salmonella* unterschiedliche pathogene Eigenschaften verleihen. Alle identifizierten Plasmide weisen dabei eine Gemeinsamkeit auf: Sie haben eine 8 kb-Region, welche auch als *spv*-Regulon (engl.: „*Salmonella* plasmid virulence“ – *spv*) bezeichnet wird und für die *spv*-Gene kodiert (Fierer *et al.*, 1993). Die Expression dieses Genclusters wird nach einer Invasion sowohl in Epithelzellen als auch in Makrophagen hochreguliert und trägt zum intrazellulären Überleben und Wachstum des Pathogens bei (Hautefort *et al.*, 2008; de Jong *et al.*, 2012). Zusätzlich verfügen *Salmonella* über viele Antibiotika-Resistenzen, welche ebenfalls auf Plasmiden oder auch Transposons und Integrons lokalisiert sein können (Rychlik *et al.*, 2006).

Die beschriebene passive wie auch aktive Invasion des Pathogens in die Wirtszelle führt zur Aktivierung von wirtseigenen Abwehr- und Entzündungsmechanismen. Die Wirtszelle ist in der Lage, *Salmonella* durch spezifische konservierte mikrobielle Strukturen (engl.: „pathogen-associated molecular patterns“ - PAMPs) von wirtseigenen Strukturen zu unterscheiden. Die Erkennung dieser PAMPs induziert die Expression verschiedener Zytokine wie IL-1 β , IL-18, TNF- α und IFN- γ was zu einer Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Makrophagen, der Rekrutierung von Neutrophilen und der Freisetzung von antimikrobiellen Komponenten zur Abwehr des Pathogens führt (Santos *et al.*, 2009, Thiennimitr *et al.*, 2012).

Neben dem Erkennen der PAMPs führen verschiedene Pathogen-induzierte Prozesse ebenfalls zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Immunantwort. Die Trans-

1. Einleitung

lokation von Effektorproteinen über T3SS1 in der frühen Phase der Infektion wird durch das Einbringen von T3SS1-Komponenten (PrgJ) und Flagellin, dem Strukturprotein der Geißeln, in das Zytosol der Wirtszelle begleitet (de Jong *et al.*, 2012). Beide wirtsfremden Strukturen werden in Makrophagen durch einen NOD-like Rezeptor (NLR) erkannt – auch als NLRC4 bezeichnet – und führen über die Bildung eines Inflammasoms zur Aktivierung von Caspase-1 (de Jong *et al.*, 2012; Thiennimitr *et al.*, 2012). Als Bestandteil der Apoptose-Signalkaskade führt die Aktivierung von Caspase-1 zu einem proinflammatorischen Zelltod der Makrophagen, welcher auch als Pyroptose bezeichnet wird. Die resultierende Freisetzung von *Salmonella* hat zwei unterschiedliche Folgen: einerseits können die ungeschützten Erreger durch die Aufnahme in neutrophile Granulozyten unschädlich gemacht werden, andererseits wird den Salmonellen die Möglichkeit geboten erneut in angelockte Makrophagen einzudringen und den Infektions-Kreislauf von vorn zu beginnen (Völk, 2011; Thiennimitr *et al.*, 2012).

1.2. *Salmonella enterica* serovar *Infantis* in Israel

Neben *S. Typhimurium* gehört ein weiteres Serovar zu den häufig auftretenden Isolaten: *Salmonella enterica* serovar *Infantis*. Obwohl es zu den schwach-invasiven Serovaren gezählt wird (Imre *et al.*, 2013), zeigen neueste Prävalenzstudien verschiedener Länder die zunehmende Bedeutung dieses Isolates auf (Aviv *et al.*, 2013). Bei epidemiologischen Untersuchungen in Israel konnte festgestellt werden, dass mit *S. Infantis* vor allem Stämme der C1- und C2-Serogruppen zu den häufigsten klinischen Isolaten zählen und dadurch ein lokal abweichender Trend von der weltweiten Entwicklung begründet ist (Gal-Mor *et al.*, 2010).

Nachdem der Zeitraum zwischen 1995 bis 2005 durch eine Abnahme der Fallzahlen von NTS in Israel und einem geringen relativen Anteil von *S. Infantis* gekennzeichnet war, konnte ab 2006 ein erneuter Anstieg der Inzidenzen beobachtet werden. Dieser Anstieg wurde durch eine sehr starke Zunahme des relativen Anteils von *S. Infantis* gegenüber der Gesamtzahl an *Salmonella*-Isolaten begleitet, welcher seit 2009 mit über 30 % auf einem unverändert hohen Niveau liegt (Abbildung 1).

1. Einleitung

Um die Ursache für die dominante Entwicklung des *Salmonella*-Serovars Infantis zu ermitteln und festzustellen, ob der Ursprung klonal in einem oder von verschiedenen Stämmen ausgeht, wurden über 80 Isolate aus dem Zeitraum von 1995 bis 2009 analysiert. Die molekularbiologische Analyse beinhaltete neben einer Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE), zusätzliche Untersuchungen bezüglich der Antibiotika-Resistenz und der Lokalisation der entsprechenden Gene.

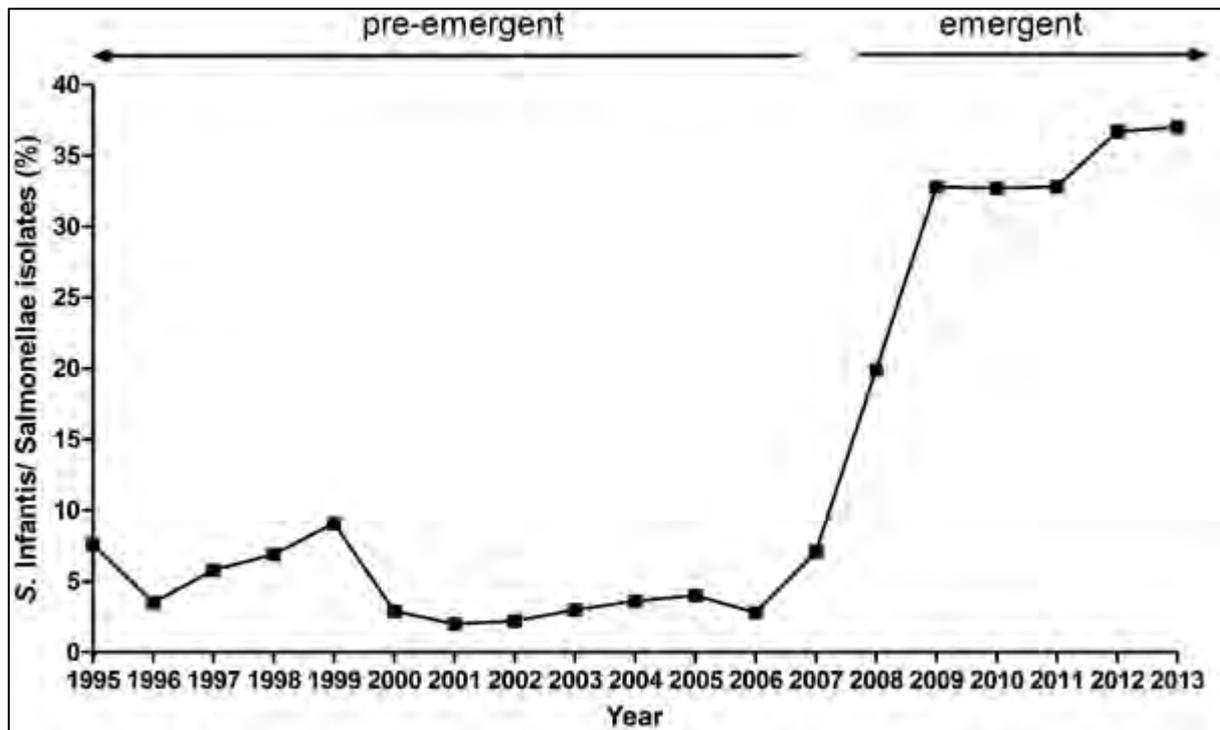


Abbildung 1: Entwicklung von *Salmonella*-Isolaten in Israel (1995 - 2013)

Relative Anteile von *S. Infantis* in Bezug auf alle *Salmonella*-Isolate, welche im National *Salmonella* Reference Center in Israel im Zeitraum von 1995-2013 analysiert wurden. Seit 2006 ist eine starke Zunahme der *S. Infantis*-Isolate als Ursache von NTS-Infektionen zu beobachten, welche seit 2009 mit über 33 % relativem Anteil die vorherrschenden klinischen Serovare in Israel darstellen.

(Quelle: Dr. O. Gal-Mor, Infectious Diseases Research Laboratory, Sheba Medical Center, Israel)

Es konnte gezeigt werden, dass die neu aufkommenden *S.*-Isolate (2007 - 2009) mit ca. 82 % Übereinstimmung ein bisher unbekanntes und deutlich homogenes PFGE-Profil aufwiesen, während die früheren *S.*-Isolate (1970 - 2005) sehr heterogene PFGE-Profile verursachten. Zudem wurde festgestellt, dass ca. 93 % aller neu aufkommenden *S.*-Isolate über eine Multiresistenz gegen Antibiotika wie Nalidixinsäure, Nitrofurantoin und Tetracyclin verfügen, welche in früheren *S.*-Isolaten nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass der erneute Anstieg der NTS-Infektionen durch die Verbreitung eines einzigen neuen

1. Einleitung

Phänotyps von *S. Infantis* verursacht wurde, dessen Ursprung wahrscheinlich in der Geflügelindustrie liegt und sich in vielen Eigenschaften von früheren *S.*-Isolaten unterscheidet (Gal-Mor *et al.*, 2010).

1.3. Das Maus-Colitis-Modell

Obwohl *Salmonella enterica* ein sehr breites Wirtsspektrum aufweisen und beim infizierten Menschen sowohl zur Entstehung einer Gastroenteritis als auch einer systemischen Erkrankung führen können, entwickeln infizierte Mäuse häufig nur eine leichte Colitis und ein Krankheitsbild, welches dem des Typhus ähnelt (Barthel *et al.*, 2003). Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *S. Typhimurium* führt nach dem Überwinden der intestinalen Epithel-Barriere zu einer Besiedlung der Peyerschen Plaques und der mesenterischen Lymphknoten (engl. „mesenteric lymph nodes“ - mLK) (Carter und Collins, 1974). Anschließend erfolgt die Besiedlung der Leber und der Milz, welche zur vollständigen systemischen Erkrankung und dem Versterben der Tiere führt (Hohman *et al.*, 1978; Wallis und Galyov, 2000). Da eine Infektion bei Wildtyp Mäusen somit zu kaum quantifizierbaren Symptomen einer Enteritis führt, kann dieses Modell nur zur Untersuchung der systemischen Erkrankung genutzt werden.

Zur besseren Charakterisierung der enterischen Salmonellose wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, welche neben Rindern auch abgebundene Darmschlingen-Modelle des Ileums von Kaninchen umfassten und für ein besseres Verständnis der NTS sorgten (Wallis und Galyov, 2000; Barthel *et al.*, 2003). Im Jahr 2003 gelang es dann ein Modell zu entwickeln, welches die Möglichkeit bietet den Einfluss des Wirts auf eine Infektion mit nicht-typhoiden Salmonellen zu untersuchen: das Colitis-Modell mit Streptomycin-vorbehandelten Mäusen (Barthel *et al.*, 2003).

Durch die orale Gabe von 20 mg Streptomycin pro Maus 24 h vor der Infektion mit *S. Typhimurium*, konnte die natürliche intestinale Mikrobiota abgeschwächt, somit eine bessere Kolonisierung der Bakterien im Darm erzielt und eine Entzündung im Caecum hervorgerufen werden. Diese Entzündung wird durch submukosales Ödem, Krypt-Abzesse, einer reduzierten Anzahl von Goblet-Zellen und der Infiltration von

1. Einleitung

polymorphnukleären Leukozyten (PMNs) in die Submukosa des caecalen Gewebes charakterisiert (Barthel *et al.*, 2003). Zudem konnte auch eine schwache Besiedlung des Colons festgestellt werden, welcher ebenfalls durch Ödem und infiltrierende PMNs geschädigt wurde. Die systemische Infektion wurde durch eine leicht erhöhte Besiedlung der mLKs, der Milz und der Leber gekennzeichnet, wobei die Keimlast nach kurzer Infektionsdauer nur gering von der Nachweisgrenze abwich.

Neben diesen Symptomen konnte auf makroskopischer Ebene eine Vergrößerung des proximalen Colons und eine Schrumpfung des Caecums beobachtet werden. Parallel dazu wurde die Kotbildung beeinträchtigt (wässriger Stuhl) und die Gewichte der entzündeten Caeca waren deutlich geringer als die von gesunden Kontrolltieren (Barthel *et al.*, 2003).

Diese Ergebnisse belegen die gute Vergleichbarkeit einer durch *S. Typhimurium* induzierten Enterocolitis beim Menschen und der in Mäusen induzierten Colitis durch die vorherige Behandlung der Tiere mit Streptomycin und damit die Attraktivität dieses Tiermodells.

1.4. Zelllinien

1.4.1. Caco-2/BBE 1 Epithelzellen

Die fortschreitende Entwicklung in der Medizin fordert Modelle, welche die Charakterisierung der Aufnahme- und Transportmechanismen über die Epithelzellen des Darms ermöglichen. Dabei wurde als Alternative zu *in vivo*-Modellen ein besonderes Augenmerk auf *in vitro*-Modelle gelegt.

Die Zelllinie Caco-2, welche im Jahr 1974 von Dr. J. Fogh aus einem colorektalen Adenokarzinom isoliert wurde (Fogh *et al.*, 1977; Pinto *et al.*, 1983), stellt auf Grund ihrer morphologischen und biochemischen Eigenschaften eine gute Alternative zu Tiermodellen dar. Diese aus dem menschlichen Colon entstammenden Zellen, weisen nach einer spontanen Differenzierung und Polarisierung viele Eigenschaften von Enterozyten auf (Sambuy *et al.*, 2005; Gan und Thakker, 1997).

1. Einleitung

Werden Caco-2 Zellen über einen längeren Zeitraum unter Standardbedingungen auf permeablen Membranen kultiviert, lässt sich die Entstehung eines dichten Monolayers mit klarer Ausbildung von Tight Junctions und einer basalen wie auch apikalen Plasmamembran erkennen. Beide Membran-Domänen unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung und werden durch die ringförmige Anordnung der Tight Junctions (TJs) voneinander getrennt (Matter et al., 1990). Eine weitere Besonderheit ist die Ausformung von apikalen Strukturen, welche denen der Mikrovilli von Enterozyten gleichen (Bolton et al., 2000). Da die Zelllinie Caco-2 jedoch eine sehr hohe morphologische Variabilität aufwies und nicht alle Zellen in der Lage waren Mikrovilli-Strukturen auszubilden, wurden Subpopulationen durch gezielte Klonierungstechniken angezogen, welche hinsichtlich ihrer homogenen Morphologie und durchgehenden Ausbildung von Mikrovilli-Strukturen selektiert wurden.

Die resultierenden Klone Caco-2/BBe 1 und Caco-2/BBe 2 (engl.: „brush border expressing“ - BBe) stellten sich dabei als vielversprechende Zelllinie heraus (Peterson und Mooseker, 1992). Die Zellen wiesen hoch geordnete Mikrovillus-Strukturen an der apikalen Plasmamembran auf, welche sich bei Betrachtung unter dem Trans-

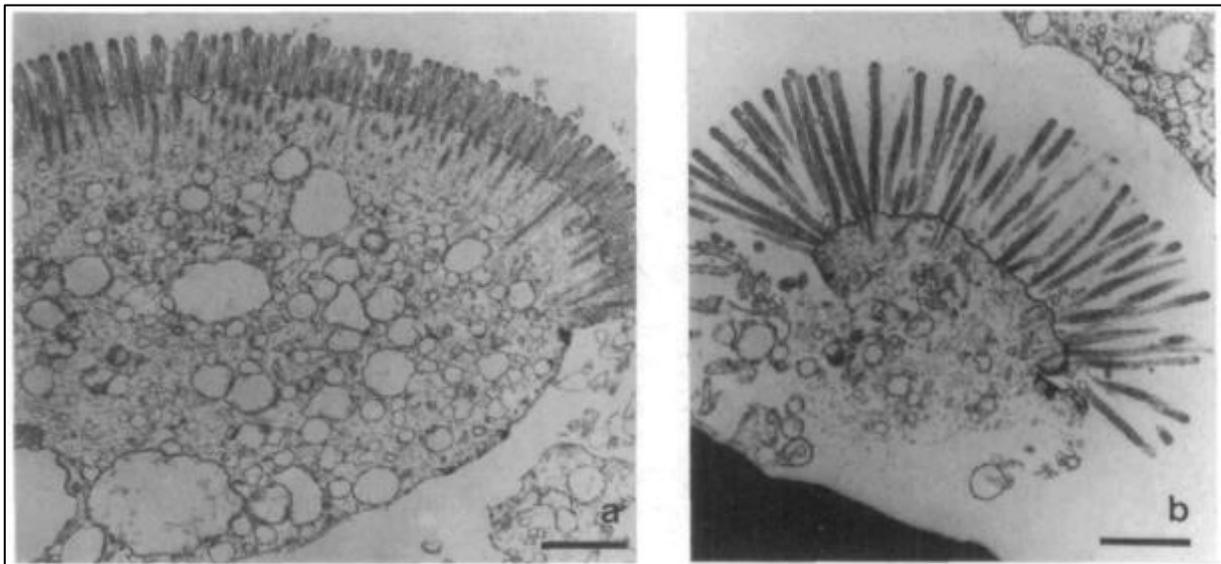


Abbildung 2: Dimorphe Mikrovillus-Strukturen der Zelllinie Caco-2/BBe 1

Darstellung der unterschiedlichen Ausprägungen von Mikrovilli unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM). (a) Viele Zellen weisen eher kürzere Villi mit einer Länge von $0,6 \mu\text{m}$ auf, welche eher denen des Colons zuzuordnen sind. (b) Jedoch sind auch längere Villi mit ca. $1,6 \mu\text{m}$ Länge zu erkennen, welche strukturell denen der Enterozyten des Dünndarms entsprechen. (Balkenlänge: $1 \mu\text{m}$, Quelle: Peterson und Mooseker, 1992)

1. Einleitung

missionselektronenmikroskop (TEM) als dichter Teppich über die Zelloberfläche legen, dabei jedoch in ihrer Größe zwei unterschiedliche Ausprägungen zeigten (Abbildung 2). Der überwiegende Teil der Mikrovilli ähnelte mit einer Länge von ca. $0,6\ \mu\text{m}$ denen den menschlichen Colons, während eine kleinere Untereinheit mit einer Länge von bis zu ca. $1,6\ \mu\text{m}$ viele morphologische Parallelen zu den Enterozyten des menschlichen Dünndarms zeigte.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Caco-2 Zellen apikale Hydrolasen wie beispielsweise Sukrase-Isomaltase und Dipeptidylpeptidase IV synthetisieren, welche vergleichbar mit Hydrolase-Aktivitäten *in vivo* waren (Quaroni und Hochman, 1996). Neben den bisher genannten Charakteristika dieser Zelllinie ist die Permeabilität des Monolayers, welche die Barrierefunktion der Darm-Epithelzellen nachbilden soll, sehr wichtig und wird durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (engl.: „Transepithelial Resistance“ - TER) bestimmt. Nach dem Aus säen der Zellen auf einer permeablen Membran finden die Differenzierung und Polarisierung zwischen Tag 7 und Tag 20 statt (Rousset, 1986). Dieser Prozess ist durch einen Anstieg des TER gekennzeichnet, welcher am Ende der Polarisierung in ein Plateau übergeht (Alvarez-Hernandez et al., 1991). Die Caco-2 Zellen des entstandenen Monolayers haben eine zylindrische polarisierte Struktur, ausgebildete Mikrovilli auf der apikalen Membran und deutliche Tight Junction-Strukturen, welche benachbarte Zellen miteinander verbinden und die parazelluläre Barriere bilden (Sambuy et al., 2005).

1.4.2. ANA-1 Makrophagen

Auf zellulärer Ebene des Immunsystems spielen vor allem Makrophagen eine zentrale Rolle und können sowohl aktiv als auch passiv durch die Sekretion von Zytokinen zur Abschwächung des Pathogens beitragen. Um die Interaktion zwischen den Pathogenen und Makrophagen während einer Salmonellose besser charakterisieren und die sekretorische Aktivität der stimulierten Makrophagen untersuchen zu können, wurde eine *in vitro* kultivierbare murine Makrophagen-Zelllinie verwendet.

1. Einleitung

Die Zelllinie ANA-1 resultierte aus der Infektion von frischem murinem Knochenmark einer C57BL/6-Maus mit einem Retrovirus. Dies führte zur selektiven Reifung von Monozyten und der Immortalisierung dieser Makrophagen-Zelllinie (Blasi et al., 1985). Weiterhin zeigt ANA-1 ein dimorphes Wachstumsverhalten: Zum einen sind die kultivierten Zellen adhärent und zum anderen wachsen sie als reine Suspensionskulturen, wobei beide Ausprägungen während einer Kultivierung auftreten können. Dabei können sowohl der momentane Zellzyklus als auch die Dichte der Zellen einen Einfluss auf das jeweilige Wachstumsmuster haben.

Mikroskopische Aufnahmen der Zellen zeigten eine Vielzahl von zytosolischen Vakuolen und einen deutlich definierten Zellkern (Abbildung 3, Cox et al., 1989). Zudem sind die Zellen von sphärischer Gestalt und lassen nur in adhärennten Stadien eine leichte Abflachung und Verlängerung erkennen. Ein weiterer wichtiger Indikator für Zellen welche sich aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln, ist deren Fähigkeit zur Lysozym-Sekretion nach externer Stimulation. Die Zugabe des Zytokins IFN- γ ins Zellmedium erhöhte zum einen das messbare Lysozym-Level um den Faktor 1,75 und zum anderen konnte die Expression des MHC (engl.: „Major Histocompatibility Complex“)-Komplexes der Klasse II nachgewiesen werden (Cox et al., 1989).

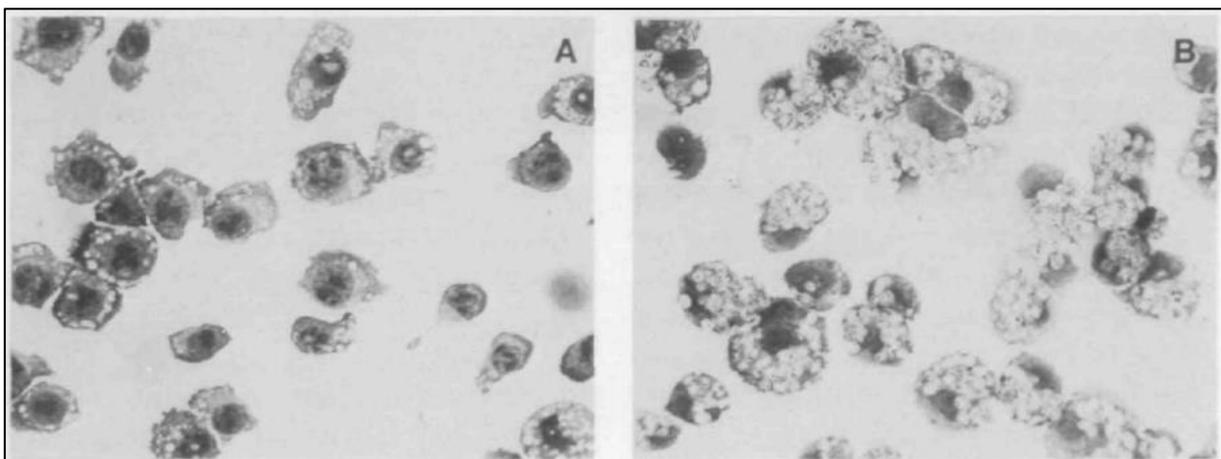


Abbildung 3: Morphologie von ANA-1 Makrophagen

Die Zelllinie ANA-1 wurde nach der Infektion von frischem murinem Knochenmark mit einem Retrovirus gewonnen und immortalisiert. Unter dem Mikroskop lassen sich die (A) sphärische Gestalt der Zellen, sowie eine große Anzahl von zytosolischen Vakuolen und einem deutlich ausgeprägten Zellkern und (B) die Phagozytose von vielen Partikeln durch eine Vergrößerung des Zellvolumens und granulären Ansammlungen innerhalb des Zytosols erkennen. (originaler Vergrößerungsfaktor: 400. Quelle: Cox et al., 1989)

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Virulenz eines frühen und eines neu auftretenden Isolats von *S. Infantis* vergleichend im Mausmodell und in Zellkultur untersucht. Die Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. O. Gal-Mor vom Sheba Medical Center, Tel Hashomer in Israel durchgeführt, welcher alle analysierten *S. Infantis*-Stämme zur Verfügung gestellt hat. Die Analyse umfasste neben einem *S. Typhimurium* (*S. T.*)-Stamm SL1344, welcher als positiver Kontroll-Organismus einer NTS-Infektion eingesetzt wurde, vier verschiedene *S. Infantis*-Stämme:

- *S. Infantis* 335-3 (aus der Gruppe der frühen Isolate, 1970)
- *S. Infantis* 119944 (aus der Gruppe der neu auftretenden Isolate, 2008)
- *S. Infantis* 335-3 AR (Mutante von *S. Infantis* 335-3 mit Azid-Resistenz)
- *S. Infantis* 335-3 AR/pESI (Mutante von *S. Infantis* 335-3 mit Azid-Resistenz und dem Virulenzplasmid pESI aus *S. Infantis* 119944)

Die durchgeführten Experimente waren in zwei Abschnitte unterteilt: zum einen wurde der Einfluss von *S. Infantis* auf den Gesamtorganismus der C57BL/6-Maus mittels des Maus-Colitis-Modells untersucht und zum anderen erfolgten *in vitro*-Versuche mit humanen Epithel- (Caco-2/BBe 1) und murinen Makrophagen-Zelllinien (ANA-1).

In vivo-Experimente wurden mit zwei unterschiedlich langen Infektionsphasen von 24 h und 96 h durchgeführt. Die Beurteilung der induzierten Colitis erfolgte anhand der Besiedlung verschiedener Darmabschnitte und der mLK, sowie der Milz und der Leber. Zusätzlich wurden histologische Proben angefertigt und das Expressionsmuster spezifischer Zytokine mittels PCR (engl.: „Polymerase chain reaction“) untersucht.

In vitro-Experimente wurden sowohl mit Epithelzellen als auch Makrophagen durchgeführt, um die Prozesse während der frühen und späten Phase der Infektion mit *Salmonella* näher charakterisieren zu können.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Zur Analytik verwendeten Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|---|
| 100x MEM non-essential Amino Acids Solution, Gibco® (MEM n.e. AA) | Life Technologies™, Darmstadt |
| 4', 6-Diamidin-2-phenylindol, Molecular Probes® (DAPI) | Life Technologies™, Darmstadt |
| <i>Aqua destillata (A. dest)</i> | Deionisierungsanlage, Forschungszentrum Borstel |
| Alexa Fluor® 546 Phalloidin <i>for research only</i> | Life Technologies™, Darmstadt |
| DEPC-Treated Water, Ambion® (DEPC-H ₂ O) | Life Technologies™, Darmstadt |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse EMSURE® (Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Dimethyl sulfoxide HybriMax™, sterile-filtered, suitable for hydridoma, ≥ 99,7 % (DMSO) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| DMEM with 4,5 g/l Glucose, 4 mM L-Glutamine and NaPyruvate | PAN Biotech, Aidenbach |
| Dulbecco's PBS, steril, ohne Mg & Ca | GE Healthcare, Freiburg |
| Entellan® Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie | Merck, Darmstadt |
| Eosin Y Solution, 5 wt. % in H ₂ O | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Fetal Bovine Serum (FCS) | Biochrom AG, Berlin |
| Fluorescein labeled Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) | Vector Laboratories, UK |
| Fluorescence Mounting Medium | Dako, Dänemark |
| Formaldehydlösung 37 % (stabilisiert mit ca. 10 % Methanol) zur Synthese | Merck, Darmstadt |
| Gentamicin Solution 50 mg/mL in deionized water, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| HEPES (1 M), Buffer Solution | GE Healthcare, Freiburg |
| Hämatoxylin | Sigma-Aldrich, Steinheim |

3. Materialien und Methoden

| Chemikalie | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| Kaliumchlorid für die Molekularbiologie, $\geq 99\%$ (KCl) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kaliumdihydrogenphosphat für die Molekularbiologie, $\geq 98\%$ (KH_2PO_4) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| LB-Agar (Lennox), für die Molekularbiologie | Roth, Karlsruhe |
| LB-Medium (Lennox), für die Molekularbiologie | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcarbonat wasserfrei zur Analyse EMSURE® ISO (Na_2CO_3) | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid für die Molekularbiologie, $\geq 98\%$ (NaCl) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse EMSURE® ACS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat zur Analyse EMSURE® ACS (NaHCO_3) | Merck, Darmstadt |
| Paraffin | Sherwood Medical, USA |
| Penicillin-Streptomycin Solution stabilized, with 10000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL, sterile-filtered (Pen/ Strep) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| RNAlater®, Stabilization Solution, Ambion® | Life Technologies™, Darmstadt |
| Schwefelsäure 95 - 98 %, p.a., ISO, max. 0,005 ppm Hg (H_2SO_4) | Roth, Karlsruhe |
| Sodium Dodecyl Sulfate BioUltra, $\geq 99\%$ (GC) (SDS) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Sodium Pyruvate Solution (100 mM) | Life Technologies™, Darmstadt |
| StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent | Life Technologies™, Darmstadt |
| Streptomycin sulfate salt, powder, suitable for mouse embryo cell culture | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tetracyclin-Hydrochlorid $\geq 900 \mu\text{g}/\text{mg}$, CELLPURE® | Roth, Karlsruhe |
| Triton™ X-100, for molecular biology | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypanblau 0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung | Biochrom AG, Berlin |
| Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %/ 0,02 %), in PBS, ohne Mg & Ca | Biochrom AG, Berlin |
| TWEEN® 20 Detergent, Molecular Biology Grade | Merck, Darmstadt |
| Xylol zur Analyse, EMSURE® ACS, ISO | Merck, Darmstadt |
| Ziegen-Serum | GE Healthcare, Freiburg |

3.1.2. Pufferlösungen und Nährmedien

Die folgenden Angaben zur Einwaage bzw. der anteiligen Volumina beziehen sich jeweils auf 1 L der entsprechenden Puffer- oder Nährlösung. Alle Puffer wurden mit 2 M HCl und 1 M NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und bei Verwendung für *in vitro*-Versuche bei 121°C autoklaviert. Die genannten Nährmedien wurden bei konstanten 4°C im Kühlschrank gelagert und innerhalb von 4 Wochen verbraucht oder erneuert. Alle übrigen Puffer wurden bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt.

Tabelle 2: Zusammensetzung für den PBS-Puffer (10x)

| Chemikalie | Stoffmengenkon- zentration c [mol/L] | Molare Masse M [g/mol] | Einwaage m [g] | pH-Wert |
|---|---|---------------------------|-------------------|---------|
| KCl | 0,027 | 74,55 | 2,00 | 7,4 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,015 | 136,09 | 2,00 | |
| NaCl | 1,369 | 58,44 | 80,00 | |
| Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O | 0,102 | 177,99 | 18,15 | |

Tabelle 3: Zusammensetzung für den TBST-Puffer

| Chemikalie | Stoffmengenkon- zentration c [mol/L] | Molare Masse M [g/mol] | Einwaage m [g] | pH-Wert |
|------------|---|---------------------------------------|-------------------|---------|
| TRIS | 0,050 | 121,14 | 6,06 | 7,6 |
| NaCl | 0,150 | 58,44 | 8,77 | |
| Chemikalie | Volumenkon- zentration σ [%] | anteiliges Volumen V _x [L] | | |
| TWEEN® 20 | 0,05 | 0,0005 | | |

Tabelle 4: Zusammensetzung für den Lyse-Puffer

| Chemikalie | Volumenkon- zentration σ [%] | anteiliges Volumen V _x [L] | pH-Wert |
|---------------|--|---------------------------------------|---------|
| PBS (1x) | 98,90 | 0,989 | - |
| Triton™ X-100 | 1,00 | 0,010 | |
| SDS | 0,10 | 0,001 | |

3. Materialien und Methoden

Tabelle 5: Zusammensetzung für den Standard-Färbepuffer

| Chemikalie | Volumenkonzentration σ [%] | anteiliges Volumen V_x [L] | pH-Wert |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| PBS (1x) | 99,85 | 0,9985 | - |
| TWEEN® 20 | 0,05 | 0,0005 | |
| Triton™ X-100 | 0,10 | 0,001 | |

Tabelle 6: Zusammensetzung für das Zellkultur-Medium *Caco-2/BBE 1*

| Chemikalie | Volumenkonzentration σ [%] | anteiliges Volumen V_x [L] | pH-Wert |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| DMEM | 77,00 | 0,770 | - |
| Pen/ Strep | 1,00 | 0,010 | |
| MEM n.e. AA | 1,00 | 0,010 | |
| Sodium Pyruvate | 1,00 | 0,010 | |
| FCS | 20,00 | 0,200 | |

Tabelle 7: Zusammensetzung für das Zellkultur-Medium *ANA-1*

| Chemikalie | Volumenkonzentration σ [%] | anteiliges Volumen V_x [L] | pH-Wert |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|---------|
| DMEM | 87,00 | 0,870 | - |
| Pen/ Strep | 1,00 | 0,010 | |
| HEPES | 1,00 | 0,010 | |
| Sodium Pyruvate | 1,00 | 0,010 | |
| FCS | 10,00 | 0,100 | |

3. Materialien und Methoden

3.1.3. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden als Cryostocks bei - 80°C gelagert und vor deren Verwendung als über Nacht-Kulturen (ü. N.-Kultur) bei 37°C angezogen. Dazu wurden jeweils 2 mL steriles LB-Medium unter einer Sterilwerkbank mit den entsprechenden Konzentrationen der Antikörper versetzt, mit einer gelben Pipettenspitze eine geringe Menge an der Oberfläche des Cryostocks abgetragen und die anhaftenden Bakterien in das vorgelegte Medium überführt.

Tabelle 8: Bakterienstämme und deren Eigenschaften

| Spezies + Serovar | Stamm | Genotyp | Resistenzen | Herkunft |
|-------------------|---------------|--------------|--------------------------|----------------------|
| S. Infantis | 119944 | Wildtyp | Streptomycin | Ohad Gal-Mor, Israel |
| | 335-3 | Wildtyp | Streptomycin | Ohad Gal-Mor, Israel |
| | 335-3 AR | Wildtyp | Natriumazid | Ohad Gal-Mor, Israel |
| | 335-3 AR/pESI | Wildtyp/pESI | Natriumazid, Tetracyclin | Ohad Gal-Mor, Israel |
| S. Typhimurium | SL1344 | Wildtyp | Streptomycin | Brett Finlay, Kanada |

3.1.4. Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

| Kit | Hersteller |
|---|-----------------------------|
| BD OptEIA™ Mouse IFN- γ ELISA Set | BD Biosciences, Heidelberg |
| BD OptEIA™ Mouse MCP-1 ELISA Set | BD Biosciences, Heidelberg |
| BD OptEIA™ Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set | BD Biosciences, Heidelberg |
| High Pure RNA Tissue Kit | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kit | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit | Roche Diagnostics, Mannheim |

3.1.5. Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden entsprechend den Bestimmungen bei 4°C oder aber bei -20°C aufbewahrt. Besonders bei den fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde darauf geachtet, dass diese nur in kurzen Zeitabschnitten direktem Licht ausgesetzt waren, um eine konstante Qualität der Färbungen gewährleisten zu können.

Tabelle 10: Primäre Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung

| Antigen | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|----------------|-----------|------------|------------------------------|
| β-Catenin | Kaninchen | 1:100 | Cell Signalling Technology |
| E-Cadherin | Maus | 1:100 | Abcam® |
| S. Infantis | Kaninchen | 1:100 | BD Biosciences |
| S. Typhimurium | Maus | 1:200 | Meridian Life Science®, Inc. |
| ZO-1 | Kaninchen | 1:100 | Zytomed Systems |

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung

| Antigen | Spezies | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|---------------|---------|-----------------|------------|--------------------|
| Kaninchen IgG | Ziege | Alexa Fluor®488 | 1:200 | Invitrogen |
| Kaninchen IgG | Ziege | Alexa Fluor®546 | 1:200 | Invitrogen |
| Maus IgG | Ziege | Alexa Fluor®488 | 1:200 | Life Technologies™ |
| Maus IgG | Ziege | Alexa Fluor®546 | 1:200 | Life Technologies™ |
| Maus IgG | Ziege | Alexa Fluor®633 | 1:100 | Invitrogen |

3.1.6. Geräte und Hersteller

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Software

| Geräte | Software | Hersteller |
|---|---|--------------------------|
| Autoklav <i>Systemec DX-150</i> | - | Systemec |
| Autotechnicon I03, <i>Microm STP 120</i> | - | Thermo Fisher Scientific |
| Brutschrank <i>HERACELL 150i, CO₂ Incubator</i> | - | Thermo Fisher Scientific |
| Dampfgarer <i>Steam Cuisine, Serie S04</i> | - | Tefal |
| Konfokal-Mikroskop TCS SP5 | LAS AF | Leica |
| Kühlzentrifuge <i>Heraeus Megafuge 16R</i> | - | Thermo Fisher Scientific |
| Lichtmikroskop Olympus BX41 | NIS Elements D3.1 | Olympus |
| LightCycler®480 II | LightCycler 480, Software release 1.5.0 SP3 | Roche |
| Mikrotom RM2125 RT | - | Leica |
| NanoDrop 1000 | ND 1000 V3.6.0 | Thermo Fisher Scientific |
| Paraffin-Gießstation EG1140c | - | Leica |
| Paraffin-Streckbank OTS40 | - | Melite |
| Spectrophotometer | - | Eppendorf |
| Sterilwerkbank | - | Thermo Fisher Scientific |
| Sterilwerkbank, <i>LaminAir, HA2448GS</i> | - | Heraeus |
| Thermal Cycler C1000™ | - | Bio-Rad |
| Tischzentrifuge <i>MiniSpin®</i> | - | Eppendorf |
| TissueLyser II | - | Qiagen |
| Vortexer, <i>IKA® MS3 basic</i> | - | IKA |
| Wasserbad <i>SUB Aqua18 Plus</i> | - | Grant |
| Wasserbad Typ 1052 | - | GFL |
| Messgerät <i>Millicell® ERS-2 „Epithelial Volt-Ohm-Meter“</i> | - | Millipore |

3. Materialien und Methoden

3.2. Methoden

3.2.1. Bestimmung der Wachstumskurven verwendeter Bakterienstämme

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens der verwendeten Bakterienstämme wurden anfänglich die entsprechenden Wachstumskurven mittels OD₆₀₀-Messung und der Auszählung der Keimzahlen erfasst.

Hierzu wurde am Vortag des Versuchs eine ü. N.-Kultur des jeweiligen Stamms angefertigt (vgl. 3.1.3. *Bakterienstämme*, Tabelle 8 und 13) und diese bei konstanten 37°C auf einem Brutschüttler (ca. 150 rpm) inkubiert.

Tabelle 13: Verwendete Antibiotika-Konzentrationen für die jeweiligen Bakterienstämme

| Spezies + Serovar | Stamm | Resistenzen (Konzentration [mg/mL]) |
|-------------------|---------------|-------------------------------------|
| S. Infantis | 119944 | Streptomycin (100) |
| | 335-3 | Streptomycin (100) |
| | 335-3 AR | Natriumazid (20) |
| | 335-3 AR/pESI | Tetracyclin (20) |
| S. Typhimurium | SL1344 | Streptomycin (100) |

Am folgenden Tag wurde die dicht gewachsene ü. N.-Kultur jeweils in einer 1:30-Verdünnung in zehn neue Glasröhrchen mit LB-Medium überführt. Jedes Glasröhrchen repräsentierte einen separaten Zeitpunkt – so konnte die Entwicklung der Kultur bei konstanten Wachstumsbedingungen gewährleistet und eine stündliche Probennahme zwischen 0 h und 8 h, sowie nach 24 h ermöglicht werden.

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden die einzelnen Kulturen zum Zeitpunkt der Probennahme 1:10 mit sterilem LB-Medium verdünnt und davon jeweils 500 µL in eine Halbmikro-Küvette aus Acryl (Firma: Sarstedt) überführt. Die Messung wurde als Doppelbestimmung in einem Spektrophotometer bei 600 nm gegen einen Blank aus LB-Medium vorgenommen.

Anschließend wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Kultur von 10⁻³ bis 10⁻⁸ in sterilem PBS-Puffer (1x) hergestellt und diese als Dreifachbestimmung mit einem jeweiligen Volumen von 10 µL auf einer Platte mit LB-Agar und dem für die Kultur

genutzten Antibiotikum ausplattiert. Nachdem die Platten ü. N. bei 37°C inkubiert wurden, erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien zur Ermittlung der Keimzahl.

3.2.2. Bestimmung der *in vitro*-Infektionsdosis von Bakterienkulturen über die optische Dichte

Da zur Durchführung der *in vitro*-Versuche eine sofortige Bestimmung der Bakterienzahl notwendig war und somit die Variante mittels Ausplattieren auf Agar-Platten entfiel, wurde eine mathematische Ermittlung durchgeführt. Aus der Bestimmung der Wachstumskurven (vgl. 3.2.1. *Bestimmung der Wachstumskurven verwendeter Bakterienstämme*) resultierten zwei verschiedene Graphen, bei welchen zum einen die gemessene OD₆₀₀ und zum anderen die ausgezählten Kolonien je mL gegen die Zeit dargestellt wurden. Durch diese Graphen wurden jeweils Regressionskurven gelegt, welche ein mathematisches Verhältnis zwischen der OD₆₀₀ bzw. der Koloniezahl je mL und der Zeit beschreiben.

Mit Hilfe der Regressionskurven konnte durch die Bestimmung der OD₆₀₀ einer 3 h-Bakterienkultur auf den tatsächlichen Zeitpunkt innerhalb der Wachstumskurve geschlossen und dadurch die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (engl.: „colony forming unit“ - cfu) je mL (auch „cfu/mL“) bestimmt werden.

3.2.3. *In vivo*-Infektionen im Mausmodell

3.2.3.1. Maushaltung

Zur Durchführung der *in vivo*-Versuche wurden weibliche C57BL/6-Mäuse von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Infektion zwischen 8 und 10 Wochen alt und wurden zu jeweils fünf Tieren unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen (engl.: „individually ventilated cage“ - IVCs) gehalten.

Die Haltung der Mäuse und die anschließenden Versuche erfolgten in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel unter S2-Sicherheitsbedingungen und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes. Dieses Tierversuchsvorhaben wurde

vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V312-7224.123-3 (85-6/12) genehmigt.

3.2.3.2. Infektion der Mäuse und Organentnahme

Um eine repräsentative Besiedlung von *Salmonella* im Darm der C57BL/B6-Mäuse zu ermöglichen, erfolgte 24 h vor der Infektion die Applikation eines Antibiotikums. Durch die orale Gabe von 20 mg Streptomycin in 100 µL sterilem H₂O (Firma: B. Braun) wurde die natürliche Darm-Mikrobiota auf ein Minimum reduziert und die Besiedlung durch die Salmonellen unterstützt.

Am folgenden Tag wurde die ü. N.-Kultur des zu untersuchenden Bakterienstammes auf eine Keimzahl von $3 \cdot 10^6$ /mL mittels HEPES-Puffer verdünnt und die Mäuse anschließend mit jeweils 100 µL dieser Verdünnung über eine Schlundsonde infiziert. Somit entsprach die Infektionsdosis pro Tier einer Keimzahl von $3 \cdot 10^5$. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Tiere mit in den Versuch eingeschlossen und diesen je 100 µL HEPES-Puffer oral zugeführt. Zur Bestimmung der tatsächlichen Keimzahl des Inokulums wurde eine serielle Verdünnungsreihe der jeweiligen ü. N.-Kultur von 10^{-3} bis 10^{-8} in sterilem PBS-Puffer (1x) hergestellt und auf Platten mit LB-Agar und dem Antibiotikum ausplattiert (vgl. Tabelle 13).

Je nach Versuchsanordnung erfolgte die Tötung der Mäuse bereits 24 h oder aber 96 h nach der Infektion mittels zervikaler Dislokation. Nachdem die Bauchdecke mit 70 %-igem Ethanol gereinigt und mit Hilfe eines Skalpells geöffnet wurde, erfolgte die aseptische Entnahme und Präparation des Caecums, Colons und Ileums, sowie die des mesenterischen Lymphknotens (mLK), der Leber und der Milz. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Gesamt-Organengewichte des Caecums, Colons und der Milz.

Zur Ermittlung der Keimlast innerhalb der einzelnen Organe wurden Teilabschnitte des Caecums, Colons, Ileums, der Leber und des mLK, sowie die Hälfte der Milz in sterilem PBS-Puffer (1x) überführt und wie in Abschnitt 3.2.3.3. *Bestimmung der Keimzahlen je Organ* beschrieben unmittelbar weiter behandelt. Da insbesondere die

Besiedlung des Caecums und Colons von Bedeutung waren, wurden die Gewichte dieser Teilabschnitte gesondert dokumentiert (später als „Gewichte Homogenisat“ bezeichnet).

Für die weitere Analyse wurden jeweils ein ca. 1 cm langes Stück des Caecums, Colons und Ileums, sowie die Hälfte der Milz und Teilstücke der Leber und des mLK separat für mindestens 24 h in 4 %-igem Formalin bei RT fixiert und für histologische Untersuchungen vorbereitet (vgl. 3.2.3.4 *Histologie*).

Außerdem wurden weitere Organproben von Caecum, Colon, Ileum und der Milz in 350 μ L RNAlater® überführt und sofort bei -20°C gelagert, um spätere quantitative Analysen durchführen zu können (vgl. 3.2.5.1 *RNA-Isolierung*).

3.2.3.3. Bestimmung der Keimlast je Organ

Die Teilabschnitte des Caecums, Colons, Ileums, der Leber und des mLK, sowie die Hälfte der Milz wurden in sterile 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße mit jeweils 1 mL PBS-Puffer (1x) und einer Metallkugel überführt. Anschließend erfolgte bei 30 Hz die Homogenisierung der Organe für 8 min mit Hilfe des TissueLyser II (Firma: Qiagen). Aus den resultierenden Homogenisaten¹ wurden je nach Organ unterschiedliche serielle Verdünnungsreihen zwischen 10^{-1} bis 10^{-6} in PBS-Puffer (1x) hergestellt und davon jeweils 10 μ L als Dreifachbestimmung auf Platten mit LB-Agar und dem Antibiotikum ausplattiert (vgl. Tabelle 13). Da *Salmonella* sowohl die systemischen Organe als auch das Ileum weniger stark besiedeln, erfolgte bei diesen Proben zusätzlich das Ausplattieren von jeweils 100 μ L des unverdünnten Homogenisats auf eine separate Platte mit LB-Agar.

Nachdem die Platten für 24 h bei 37°C inkubiert wurden, erfolgten das Auszählen der sichtbaren Kolonien und die Berechnung der Keimlast für das gesamte Organ unter Berücksichtigung der entsprechenden Organgewichte und Verdünnungen.

¹ Das Homogenisat des Caecums wurde nach dem Erstellen der Verdünnungsreihe bei 7800 rpm für 2 min zentrifugiert und für weitere Analysen (vgl. 3.2.5.4. *Proteinbestimmung mittels ELISA*) bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3.4. Histologie

3.2.3.4.1. Fixierung, Paraffineinbettung und Schnittpräparation

Nachdem die Organproben für 24 h in 4 %-igem Formalin fixiert wurden, erfolgten die Entwässerung und die Infiltration mit Paraffin mit Hilfe eines Autotechnikons „Microm STP 120“ (Firma: Thermo Fisher Scientific). Anschließend erfolgte die Einbettung der einzelnen Organe in flüssiges Paraffin mit Hilfe einer Paraffin-Gießstation (Firma: Leica). Die Proben wurden jeweils mittig in einem Block lokalisiert und die einzelnen Darmabschnitte aufrecht stehend im Querschnitt angeordnet. Nachdem die Blöcke vollständig ausgehärtet waren und noch einmal für mindestens 1 h bei 4°C gelagert wurden, konnte von diesen mittels Rotationsmikrotoms „RM2125 RT“ (Firma: Leica) 5 µM dicke Schnitte hergestellt werden. Die Schnitte wurden in verschiedenen Wasserbädern geglättet und gestreckt und sofort auf Objektträger aufgezogen. Nachdem die präparierten Schnitte für mindestens 4 h bei 37°C getrocknet wurden, konnten diese für folgende Färbungen oder weiterführende Analysen verwendet werden.

3.2.3.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur mikroskopischen Beurteilung der Pathologie der unterschiedlichen Gewebe, wurden die präparierten Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt, wozu die Paraffinschnitte zuerst zusätzlich entparaffiniert und rehydriert wurden. Die verwendeten Lösungen wurden jeweils in Glasküvetten vorgelegt und die Leerschnitte wie nachfolgend beschrieben inkubiert:

- Hämatoxylin nach Gill: 20 min
- H₂O (destilliert): 3 min
- fließendes Leitungswasser: 10 min
- 1 % Eosin (angesäuert): 3 min
- H₂O (destilliert): 2 min

Durch den Färbevorgang wurden zuerst die Zellkerne mittels Hämatoxylin blau angefärbt und das Zellplasma durch das Eosin rötlich visualisiert. Abschließend

wurden die gefärbten Schnitte erneut dehydriert, mit dem Eindeckmittel „Entellan®“ eingedeckt und über Nacht bei RT getrocknet.

3.2.3.4.3. Pathologische Beurteilung

Die präparierten und gefärbten Schnitte wurden unter dem Durchlichtmikroskop „BX41“ (Firma: Olympus) gesichtet und unter Zuhilfenahme der Software „NIS Elements D3.1“ beurteilt. Dabei wurde der Entzündungsgrad des Caecum-Querschnitts nach einer Scoring-Tabelle festgestellt und bewertet, wodurch der Vergleich unterschiedlicher Infektionen erleichtert wurde (vgl. Tabelle 14). Je nach Entzündungsmerkmal und -ausprägung konnten anteilige Scores zwischen 0 und 3 vergeben werden, wobei ein Gesamtscore von 0 für keine Entzündung und der maximale Gesamtscore von 23 für eine sehr starke pathologische Gewebsveränderung stand.

Tabelle 14: Scoring-Tabelle zur Beurteilung des Entzündungsgrads bei *in vivo*-Versuchen

| | Entzündungsmerkmal | Ausprägung (Score) |
|----------------------------|------------------------------------|---|
| Lumen | Epithelzellen | Keine (0); ab 10 Zellen (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3) |
| | Neutrophile | Keine (0); ab einer Zelle (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3) |
| Oberflächen-epithel | Desquamation | Keine (0); Vereinzelte Flächen < 30 % (1); große Flächen > 30 % (2) |
| | Ulzeration | Keine (0); Vorhanden (1) |
| Mukosa | Kryptenabzesse | Keine (0); Vereinzelt (1); mehr als 5 (2); mehr als 20 (3) |
| | Entzündliche Infiltrate | Keine (0); Vereinzelt < 15 % (1); moderat (2); große Flächen > 50 % (3) |
| | Lymphaggregate (LA) | ein kleines LA (0); 2-4 kleine LAs (1); > 5 kleine LAs oder ein großes LA (2) |
| Submukosa | Lymphaggregate (LA) | ein kleines LA (0); 2-4 kleine LAs (1); > 5 kleine LAs oder ein großes LA (2) |
| | Polymorphnukleäre Leukozyten (PMN) | Keine (0); wenige PMNs (1); viele PMNs (2) |
| | Ödeme | mild < 10 % (0); moderat (1); große Flächen > 80 % (2) |

3.2.3.4.4. Immunhistologische Fluoreszenzfärbung

Zur Visualisierung und der Lokalisation unterschiedlicher zellulärer Darmstrukturen des Caecums wurde die indirekte Variante der immunhistologischen Fluoreszenzfärbung verwendet, wobei verschieden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper verwendet wurden, welche spezifisch an das entsprechende Antigen binden und dieses somit sichtbar machen.

Nachdem die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert wurden, erfolgte die Inkubation der Schnitte in einem Dampfgerät „Steam Cuisine, Serie S04“ (Firma: Tefal). Dazu wurden die Schnitte in eine mit Citrat-Puffer (10 mM Natriumcitrat; 0,05 % TWEEN® 20 in *A. dest*; pH 6,0) gefüllte Küvette gestellt und diese anschließend für 20 - 40 min gekocht. Sobald die Schnitte wieder auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt waren, wurden diese in Shandon-Kammern (Firma: Thermo Fisher Scientific) eingespannt und dreimal mit je 200 µL PBST-Puffer (0,05 % TWEEN® 20 in PBS (1x)) gewaschen. Anschließend wurden alle Schnitte für 20 min in je 200 µL Blockierungs-Puffer (2 % Ziegen-Serum in Standard-Färbepuffer, vgl. Tabelle 5) inkubiert. Während des Inkubationsschritts wurden die primären Antikörper entsprechend dem in Tabelle 10 dargestellten Schema in Blockierungs-Puffer verdünnt und anschließend je 100 µL dieser Verdünnung auf die Schnitte pipettiert.

Nachdem die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, erfolgte ein zweiter Waschschriff mit PBST-Puffer. Danach wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 11) und DAPI (1:100) in Färbepuffer verdünnt, davon jeweils 100 µL auf die Schnitte gegeben und diese bei RT für 1 h im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte ein dritter Waschschriff mit PBST-Puffer, das Eindecken der Schnitte mit dem Eindeckmittel „Fluorescence Mounting Medium“ (Firma: Dako, Dänemark) und die Lagerung bei -20°C.

3.2.4. *In vitro*-Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen

Zur Charakterisierung der intestinalen Barrierefunktion und der durch Makrophagen induzierten Immunantwort wurden zusätzlich zu den *in vivo*-Versuchen

zwei *in vitro*-Versuche mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Alle Versuche wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen im Forschungszentrum Borstel durchgeführt.

3.2.4.1. Versuche mit Epithelzellen (Caco-2/BBe 1)

Die verwendete Zelllinie der Caco-2/BBe 1 Epithelzellen wurde von der Arbeitsgruppe „Angeborene Immunität“ unter Leitung von Prof. Dr. Holger Heine zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium auf DMEM-Basis (vgl. Tabelle 6) und unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO₂.

3.2.4.1.1. Differenzierung und Polarisierung (Caco-2/BBe 1)

Nachdem die Zellen zu mindestens 80 % konfluent gewachsen waren, wurden die für die Versuche benötigten Transwell®-Zellkulturplatten der Firma Corning vorbereitet. In jedes Well wurde ein Insert mit einer permeablen Polyester-Membran ($\varnothing_{\text{Poren}}$: 3 μm) eingehängt und die Membranen mit dem Caco-2/BBe 1-Medium über Nacht bei 37°C equilibriert.

Da in diesem Versuch zwei unterschiedliche Transwell®-Platten ($\varnothing_{\text{Insert}}$: 12 mm bzw. 6,5 mm) zum Einsatz kamen, wurden auch verschiedene Volumina der Nährmedien zur Equilibrierung und während der Versuchsdurchführung benötigt: In das untere Kompartiment wurden jeweils 1 mL bzw. 600 μL des Caco-2/BBe 1-Mediums vorgelegt und in das obere Kompartiment wurden 500 μL bzw. 100 μL des Mediums pipettiert.

Nach der Equilibrierung wurden die Nährmedien vollständig aus den Wells entfernt und jeweils 500 μL bzw. 100 μL neues Medium mit einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen bzw. $2 \cdot 10^5$ Zellen vorsichtig in die oberen Kompartimente pipettiert. Nachdem auch die entsprechenden Volumina des Mediums in das untere Kompartiment gegeben wurden, erfolgte die weitere Kultivierung der ausgesäten Zellen bei 37°C und 5 % CO₂. Während dieser zweiten Kultivierungsphase, welche zur vollständigen Differenzierung und Polarisierung des Zell-Monolayers benötigt wurde und sich über einen minimalen Zeitraum von 18 bis 21 Tagen erstreckt, wurde das Medium

der ausgesäten Zellen an jedem zweiten Tag vollständig gewechselt. Weiterhin wurde die Entwicklung der Zellen durch die regelmäßige Messung des transepithelialen Widerstands TER in Abständen von drei oder vier Tagen verfolgt. Die TER-Messung erfolgte als Dreipunkt-Messung mit Hilfe des Volt-Ohm Meters „Millicell® ERS-2“ (Firma: Millipore) und einer Ag-/AgCl-Chopstick-Elektrode. Dabei ließ sich nach rund 4 Tagen ein Anstieg des TER beobachten, welcher über den Zeitraum von 18 bis 21 Tagen weiterhin stieg und abschließend in ein Plateau übergeht, welches als Indiz für die Ausbildung eines intakten Zell-Monolayers diente.

3.2.4.1.2. Versuchsdurchführung (Caco-2/BBe 1)

Nach der vollständigen Ausdifferenzierung und Polarisierung der Caco-2/BBe 1 Epithelzellen und der damit einhergehenden Ausbildung eines Zell-Monolayers erfolgte ein Medienwechsel zu Antibiotika-freiem Caco-2-Medium. Parallel dazu wurden vor Versuchsdurchführung ü. N.-Kulturen der verwendeten Bakterienstämme angesetzt, welche am folgenden Tag 1:30 in LB-Medium verdünnt und nochmals 3 h kultiviert wurden.

Zur Bestimmung der Bakterienzahl in der jeweiligen 3 h-Kultur wurde wie in 3.2.2. *Mathematische Bestimmung der in vitro-Infektionsdosis von Bakterienkulturen* verfahren. Die Bakterienkulturen wurden vor der Infektion mit den entsprechenden Volumina des Antibiotika-freien Caco-2-Mediums verdünnt, sodass eine MOI von 20 erreicht wurde.

Zur Überprüfung der Persistenz des Zell-Monolayers wurde die TER-Messung vor Versuchsbeginn nochmals wiederholt und anschließend die Infektion – außer bei den nicht infizierten Kontrollzellen – mit jeweils 500 µL bzw. 100 µL der Bakterienverdünnung, welche auf das obere Kompartiment pipettiert wurde, durchgeführt. Anschließend wurden die Zellkultur-Platten wieder bei 37°C inkubiert und über einem Zeitraum von 1,5 h in jeweils 30-minütigem Abstand Proben aus dem unteren Kompartiment der Transwell®-Platten unter sterilen Bedingungen entnommen. Von diesen Proben wurden serielle Verdünnungsreihen von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ in PBS-Puffer (1x) angefertigt, diese als Dreifachbestimmung zu je 10 µL auf Platten mit LB-Agar und

dem entsprechenden Antibiotikum (vgl. Tabelle 13) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert. Da die Keimzahl nach den ersten 30 min meist sehr gering ausfiel, wurden zu diesem Zeitpunkt zusätzlich unverdünnte Proben zu je 100 µL auf LB-Agar-Platten ausplattiert.

3.2.4.2. Versuche mit Makrophagen (ANA-1)

Die verwendete Zelllinie der ANA-1 Makrophagen wurde von der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Grenzflächenbiologie“ unter Leitung von PD Dr. Norbert Reiling zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium auf DMEM-Basis (vgl. Tabelle 7) und unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO₂.

3.2.4.2.1. Versuchsdurchführung (ANA-1)

Nachdem die Zellen zu mindestens 80 % konfluent gewachsen waren und diese überwiegend adhärente Eigenschaften aufwiesen, wurde ein Medienwechsel zu Antibiotika-freiem ANA-1-Nährmedium durchgeführt und die Makrophagen in einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Zellen je Well in einer 24 Well-Zellkulturplatte „Costar® 3527“ (Firma: Corning) ausgesät. Nach kurzem Schwenken der Platte wurden die ausgesäten Zellen nochmals über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurden vor Versuchsdurchführung ü. N.-Kulturen der verwendeten Bakterienstämme angesetzt, welche am folgenden Tag 1:30 in LB-Medium verdünnt und nochmals 3 h kultiviert wurden.

Zur Bestimmung der Bakterienzahl in der jeweiligen 3 h-Kultur wurde wie in 3.2.2. *Mathematische Bestimmung der in vitro-Infektionsdosis von Bakterienkulturen* verfahren. Die Bakterien, welche sich zum Zeitpunkt der Infektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden in Antibiotika-freiem ANA-1-Medium so verdünnt dass eine MOI (engl.: „Multiplicity of Infection“) von 10 erreicht wurde. Neben nicht infizierten Zellen, welche als Kontrolle des Versuchs mitgeführt wurden und nur reines Medium erhielten, wurden jeweils 500 µL der entsprechenden Bakterienverdünnung als Dreifachbestimmung auf die vorgelegten Zellen in der 24 Well-Platte pipettiert, die Platte bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend wieder im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3. Materialien und Methoden

Nach einer Infektionsdauer von 30 min wurde bei einem Teil der Wells ein Medienwechsel durchgeführt, um alle adhärenen und die in Suspension befindlichen Bakterien abzutöten. Dies wurde durch die Zugabe von Gentamycin in einer Konzentration von 100 µg/mL zum ANA-1-Medium umgesetzt, worin die infizierten Zellen nochmals weitere 30 min, sowie 5,5 h und 23,5 h bei 37°C inkubiert wurden.

Zur Charakterisierung der Bakterien-Makrophagen-Interaktion, insbesondere dem Vermögen der Bakterien sich an die Zellen anzuheften bzw. in diese einzudringen, wurden die infizierten Zellen nach den Infektionsintervallen von 30 min, 1 h, 6 h und 24 h lysiert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer (1x) gewaschen und anschließend jeweils 100 µL Lyse-Puffer (vgl. Tabelle 4) je Well dazu pipettiert. Durch die gleichmäßige Zick-Zack-Bewegung mit einer gelben Pipettenspitze über die Böden der Wells wurden die Zellen sowohl mechanisch als auch chemisch lysiert und aus dem Lysat eine serielle Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} in sterilem PBS-Puffer (1x) hergestellt. Die Verdünnungen wurden jeweils als Dreifachbestimmung zu je 10 µL auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (vgl. Tabelle 13) ausplattiert und ü. N. bei 37°C inkubiert.

3.2.4.3. Fixierung der Zellen *in vitro*

Zur Visualisierung bestimmter Zellstrukturen und der Beurteilung der Zell-Pathogen-Interaktion wurden die Zellen nach der Durchführung der Versuche für die Analytik mittels Immunfluoreszenzfärbung fixiert.

Dazu wurden die Wells der einfachen Zellkultur-Platten der ANA-1-Versuche vor der Aussaat der Makrophagen mit runden Deckgläsern (Ø 12 mm, Firma: Roth) bestückt und die Zellen wie in 3.2.4.1.1. *Versuchsdurchführung (ANA-1)* ausgesät. Nach Beendigung der Versuche wurden die Wells der Zellkultur- bzw. Transwell®-Platten jeweils zweimal mit PBS-Puffer (1x) gewaschen und anschließend für mindestens 15 min in 4 % Formalin bei RT inkubiert.

Um die Zellen während der Lagerung bis zur abschließenden Färbung nicht zu beschädigen, wurden jeweils 500 µL PBS-Puffer (1x) in die Wells der fixierten Zellen pipettiert und diese für maximal 2 Wochen bei 4°C gelagert.

3.2.5. Molekularbiologische Analytik

3.2.5.1. RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA aus dem caecalen Gesamtgewebe der in den *in vivo*-Versuchen eingeschlossenen Mäuse wurde das „High Pure RNA Tissue Kit“ (Firma: Roche Diagnostics) verwendet. Die in RNAlater® aufbewahrten Teilabschnitte der Caeca (vgl. 3.2.3.2. *Infektion der Mäuse und Organentnahme*) wurden aufgetaut und in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit „Lysis-/Binding-Buffer“ und einer sterilen Metallkugel überführt. Der nach der Homogenisierung im TissueLyser II (30 Hz, 2 min) und der anschließenden Zentrifugation (9000 rpm, 2 min) entstandene Überstand wurde im Folgenden nach Herstellerangaben weiter behandelt. Im letzten Schritt wurde die RNA durch Zugabe von 50 µL „Elution-Buffer“ eluiert und die Konzentration mittels Messung am Spektrophotometer „NanoDrop 1000“ (Firma Thermo Fisher Scientific) bei 260 nm festgestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Isolate bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5.2. Reverse Transkription

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben wurden das „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ (Firma: Roche Diagnostics) und der Thermocycler „C1000™“ (Firma: Bio-Rad) verwendet.

Die RNA-Isolate wurden im „Template-Primer Mix“ zu je 1 µg vorgelegt und die weitere Transkription entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt, wobei der Elongationsschritt für 30 min bei 45°C erfolgte. Die resultierende cDNA wurde abschließend 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.5.3. quantitative real-time PCR (q-PCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression bestimmter Zytokine wurden das „Light Cycler® 480 SYBR Green I Master Kit“ (Firma: Roche) und der „LightCycler®480 II“ (Firma: Roche) verwendet. Auf Basis des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green I* konnte die Amplifikation der cDNA in Echtzeit verfolgt und

3. Materialien und Methoden

ausgewertet werden. Nachdem die bei -20°C gelagerten Primer (*forward* und *reverse*) aufgetaut und die Primer-Mixe durch eine 1:1-Mischung der entsprechenden Paare (vgl. Tabelle 15) hergestellt wurden, erfolgte das Herstellen des PCR-Mix aus jeweils $3,8\ \mu\text{L}$ DEPC- H_2O , $5\ \mu\text{L}$ Mastermix und $0,2\ \mu\text{L}$ Primer-Mix je Probe. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellerangaben.

Insgesamt wurden 39 Temperatur-Zyklen durchlaufen, wobei ein Zyklus aus den 3

- Phasen:
- 95°C (10 s)
 - 94°C (15 s)
 - 60°C (30 s)

bestand. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte wurde anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 15: Primer-Paarungen und deren Sequenzen für die quantitative real-time PCR

| Gen | Primer-Paarung | |
|---------------|--------------------------|---------------------------|
| | <i>forward</i> | <i>reverse</i> |
| GAPDH | ATTGTCAGCAATGCATCCTG | ATGGACTGTGGTCATGAGCC |
| TNF- α | CCACCACGCTCTTCTGTCTAC | AGGGTCTGGGCCATAGAACT |
| IFN- γ | TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA | TGGCTCTGCAGGATTTTCATG |
| IL-6 | GAGGATACCACTCCCAACAGACC | AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA |
| MCP-1 | CCTGCTGTTACAGTTGCC | ATTGGGATCATCTTGCTGGT |
| RELM- β | TGCAGGAGATCGTCTTAGGC | TTCCCACTGATAGTCCCAGG |

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (engl.: „Cycle Threshold“). Dazu wurden die folgenden drei Formeln eingesetzt:

- **(1)** $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen})$
- **(2)** $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \text{Kalibrator}$
- **(3)** $x\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Im ersten Schritt wurde der Ct-Wert des Zielgens auf den des Referenzgens (oder auch Haushalts-Gen, engl.: „housekeeping gene“) GAPDH normalisiert **(1)**. Anschließend folgte die zweite Normalisierung auf den Kalibrator, wobei sich dieser aus dem Mittelwert der ΔCt -Werte von nicht infizierten Mäusen ergab **(2)**. Aus dem

resultierenden $\Delta\Delta C_t$ -Wert wurde abschließend die x-fache Expression des Zielgens bestimmt (3).

3.2.5.4. Proteinbestimmung mittels ELISA

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine in den Überständen der Caeca-Homogenisate (vgl. 3.2.3.3. *Bestimmung der Keimzahlen je Organ*) erfolgte mittels ELISA (engl.: „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“). Hierzu wurden die Kits „BD OptEIA™ Mouse - ELISA Set“ (Firma: BD Biosciences) für die Zytokine TNF- α (Mono/Mono), IFN- γ und MCP-1 verwendet und die Protokolle entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die verschiedenen Proben wurden je nach Bedarf unverdünnt oder 1:5 bzw. 1:10 in „Assay Diluent“ verdünnt eingesetzt. Nachdem die Farbreaktion mit 1 M H₂SO₄ gestoppt wurde, erfolgte das Auslesen der Platten bei 450 nm und 570 nm am Fluoreszenzspektrometer „Infinite® 200PRO“ (Firma: Tecan).

3.2.5.5. Immunfluoreszenzfärbung *in vitro* (Caco-2/BBe 1)

Um die Interaktion zwischen den Epithelzellen (Caco-2/BBe 1) und den unterschiedlichen *Salmonella*-Stämmen charakterisieren zu können, wurden neben den Zellkernen, den Aktin-Filamenten und den Salmonellen selbst auch die Tight Junctions mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung visualisiert.

Vorbereitend wurden die Polyester-Membranen, auf welchen die infizierten Epithelzellen fixiert wurden (vgl. 3.2.4.3. *Fixierung der Zellen in vitro*), mit einem Skalpell aus den Inserts der Transwell®-Platten ausgeschnitten und vorsichtig in eine feuchte Kammer überführt. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden anschließend jeweils 200 μ L des Standard-Färbepuffers (vgl. Tabelle 5) auf die Membranen pipettiert und diese für 10 min bei RT inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Lösung vorsichtig von den Membranen abgezogen, jeweils 100 μ L Blockierungspuffer (2 % Ziegen-Serum in Standard-Färbepuffer) auf die Membranen pipettiert und diese für 1 h bei RT inkubiert. Nachdem der primäre Antikörper (AK) im entsprechenden Verhältnis mit Blockierungspuffer verdünnt wurde (vgl. Tabelle 10), wurden die Membranen mit jeweils 100 μ L der AK-Verdünnung ü. N. bei 4°C

inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal mit je 200 µL TBST-Puffer gewaschen (vgl. Tabelle 3), die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (vgl. Tabelle 11), sowie DAPI (1:100) und Alexa Fluor® 546 Phalloidin (1:50) in TBST-Puffer verdünnt und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Membranen mittels dem Eindeckmittel „Fluorescence Mounting Medium“ (Firma: Dako, Dänemark) auf Objektträgern eingedeckt und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert.

3.2.5.6. Inside-Outside-Staining von *Salmonella* (ANA-1)

Zur Lokalisierung der Salmonellen, welche sowohl adhärent an den Außenseiten der Makrophagen als auch intrazellulär vorliegen können, wurde eine Inside-Outside-Staining-Methode mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angewendet. Der Vorteil dieser Methode liegt in der möglichen Differenzierung zwischen extra- und intrazellulären Salmonellen. Dazu wurden die Deckgläser mit den darauf fixierten Makrophagen (vgl. 3.2.4.3. *Fixierung der Zellen in vitro*) in eine feuchte Kammer überführt und zweimal mit je 200 µL PBS-Puffer (1x) gewaschen. Die Zellen wurden in jeweils 200 µL 10%-igem Ziegen-Serum (in PBS-Puffer (1x)) für 30 min bei RT inkubiert und die Primärantikörper jeweils 1:1000 in 10 %-igem Ziegen-Serum verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 200 µL auf die Zellen pipettiert und diese ü. N. bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen, die Sekundärantikörper (1:500 in 10 %-igem Ziegen-Serum verdünnt) aufgetragen und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen wieder gewaschen und durch den Einsatz von 200 µL 10 %-igem Ziegen-Serum (in Standard-Färbepuffer, vgl. Tabelle 5) für 30 min bei RT permeabilisiert. Um die intrazellulären Salmonellen anzufärben wurden die primären AK wiederholt 1:1000 verdünnt (in 10 %-igem Ziegen Serum in Standard-Färbepuffer), davon jeweils 200 µL auf die Deckgläser aufgetragen und die Zellen für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die sekundären fluoreszenzmarkierten AK entsprechend Tabelle 11 in 10 %-igem Ziegen-Serum (in Standard-Färbepuffer) verdünnt und die Zellen nochmals für 30 min mit dieser Verdünnung bei RT

inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellen mit dem Eindeckmittel „Fluorescence Mounting Medium“ (Firma: Dako, Dänemark) auf Objektträgern eingedeckt und bis zur Auswertung bei -20°C gelagert.

3.2.6. Statistische Analyse

Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels Student's t-Test, wogegen drei und mehr Gruppen mittels One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest mit einem Konfidenzintervall von 95 % analysiert wurden. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Dagegen wurden nicht signifikante Unterschiede $p > 0,05$ mit „nicht signifikant“ (ns) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Wachstumskurven der verwendeten *Salmonella*-Stämme

Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens und der Vitalität der verwendeten Bakterienstämme, wurden zu Beginn der Versuche zwei Wachstumskurven anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und der Kolonie-bildenden Einheiten (engl.: „colony forming unit“ - cfu) je mL (cfu/mL) der Kulturen erfasst. Dazu wurden die Kulturen wie in 3.2.1. *Bestimmung der Wachstumskurven verwendeter Bakterienstämme* angezogen und eine stündliche Probennahme innerhalb der ersten acht Stunden, sowie nach 24 h durchgeführt. Die Ermittlung der Wachstumskurven wurde zweimal durchgeführt. Die Anzucht jedes *Salmonella*-Stammes erfolgte in reinem LB-Medium und in LB-Medium mit Zusatz der spezifischen Antibiotika. Dies zeigte, ob die verwendeten Konzentrationen der Antibiotika einen Einfluss auf die Wachstumsrate der Bakterien nahmen.

Die in Abbildung 4 dargestellten Graphen mit halblogarithmischer Skalierung zeigten bei allen Stämmen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm. Zum Zeitpunkt 0 h wurden die ü. N.-Kulturen 1:30 in neues LB-Medium überimpft und zeigten für alle Stämme einen vergleichbaren OD_{600} -Wert, welcher auf eine ähnliche Bakteriendichte der einzelnen Kulturen hinwies. Während der exponentiellen Wachstumsphase, welche in allen Kulturen zwischen 5 - 7 h andauerte, zeigten die beiden *S. Infantis* (*S. I.*)-Stämme 335-3 und 119944 voneinander abweichende optische Dichten. Das neu aufkommende *S. I.*-Isolat 119944 wies unter den gegebenen Bedingungen innerhalb der ersten drei Stunden eine mit *S. Typhimurium* vergleichbar hohe OD_{600} auf. Im Gegensatz dazu schien das frühere *S. I.*-Isolat 335-3 insgesamt langsamer zu wachsen und somit erst später in die stationäre Phase einzutreten. Nach 24 h befanden sich alle *Salmonella*-Kulturen in der stationären Phase. Hier wiesen alle Kulturen ähnliche OD_{600} -Werte auf, wobei der *S. T.*-Stamm SL1344 den niedrigsten Wert erreichte und vermuten lässt, dass beide *S. Infantis*-Serovare zu dichteren Zellkulturen heranwachsen.

4. Ergebnisse

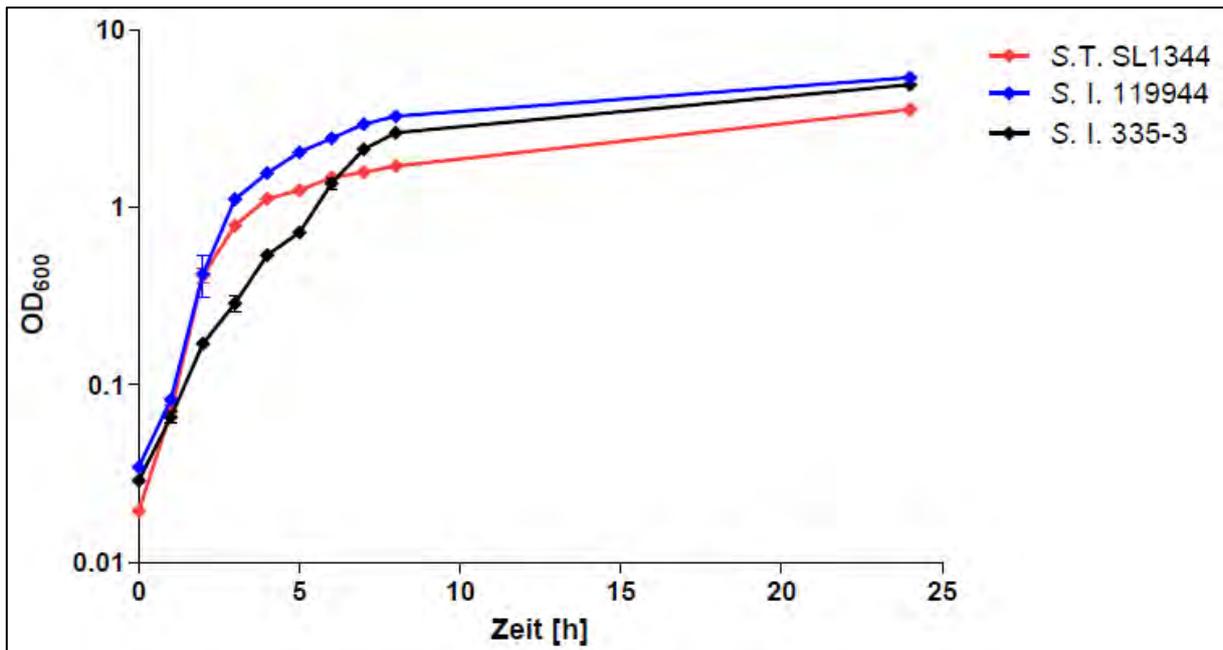


Abbildung 4: OD₆₀₀-basierte Wachstumskurven der ursprünglichen *Salmonella*-Isolate

Die zeitlichen Verläufe der OD₆₀₀ der unterschiedlichen *Salmonella*-Stämme S. I. 119944 und S. I. 335-3 zeigten während des exponentiellen Wachstums zwischen 0 - 7 h unterschiedliche optische Dichten, jedoch konnte bei allen drei ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen ein vergleichbarer OD₆₀₀-Wert nach 24 h Kultivierungsdauer festgestellt werden. Abweichungen vom Mittelwert sind durch Fehlerbalken dargestellt. (Daten aus n = 2; Kultivierungsbedingungen: LB-Medium inkl. Streptomycin, 37°C, ca. 150 rpm)

Ein ähnlicher Wachstumsverlauf wurde durch das Ausplattieren der verschiedenen Kulturen zu den entsprechenden Zeitpunkten der Probennahme ermittelt (Abbildung 5). Die cfu-Daten spiegelten die Ergebnisse der OD₆₀₀-basierten Wachstumskurve wider: die Werte aller Kulturen lagen bei Versuchsbeginn (t = 0 h) zwischen $1 - 2 \cdot 10^7$ cfu/mL und stiegen nach parallel verlaufenden exponentiellen Wachstumsphasen in der stationären Phase bis auf Werte zwischen $2 - 4 \cdot 10^9$ cfu/mL. Im Unterschied zu der Zunahme der OD₆₀₀, zeigten die beiden S. I.-Stämme 335-3 und 119944 eine nahezu identische Zunahme der cfu innerhalb der exponentiellen Phase und wiesen durchgehend höhere Werte im Vergleich zu *S. Typhimurium* auf.

Weitere Versuche, welche auf der Kultivierung der Bakterien in Antibiotika-freiem LB-Medium basierten, führten zu vergleichbaren Ergebnissen. So wurde gezeigt, dass die Zugabe von Antibiotika keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *Salmonella* ausübt (Abbildungen I und II, Anhang).

4. Ergebnisse

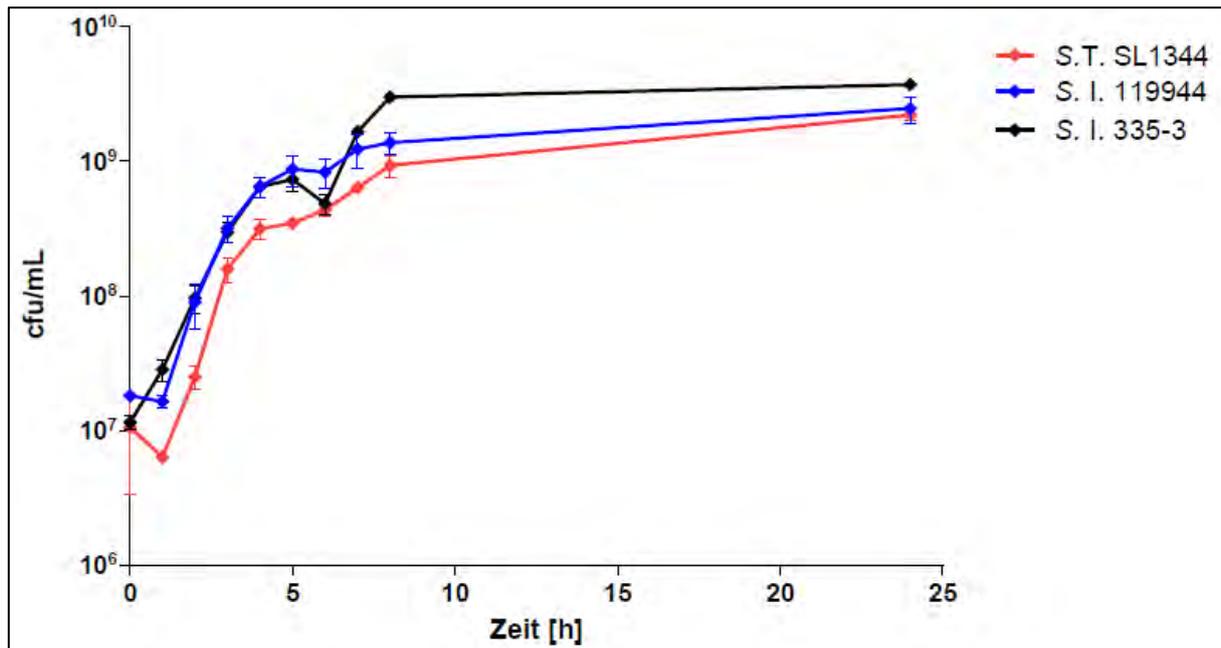


Abbildung 5: cfu-basierte Wachstumskurven der ursprünglichen *Salmonella*-Isolate

Zeitliche Verläufe der cfu/mL der unterschiedlichen *Salmonella*-Kulturen, welche starke Parallelen zu OD₆₀₀-basierten Wachstumskurven feststellen ließen. Die S. I.-Stämme 119944 und 335-3 zeigten während des exponentiellen Wachstums zwischen 0 - 7 h nahezu identische Verläufe. Nach 24 h Kultivierungsdauer waren die Keimzahlen aller Kulturen dicht beieinander und lagen zwischen 2 - 4 * 10⁹ cfu/mL. Abweichungen vom Mittelwert sind durch Fehlerbalken dargestellt. (Daten aus n = 2; Kultivierungsbedingungen: LB-Medium inkl. Streptomycin, 37°C, ca. 150 rpm)

Insgesamt wurde sowohl durch die OD₆₀₀- als auch die cfu-basierte Wachstumskurve gezeigt, dass alle *Salmonella*-Stämme ähnlichen Wachstumskurven folgten und dass beide Verfahren in gut reproduzierbaren Werten resultierten. Die OD₆₀₀-Werte wurden bei *in vitro*-Experimenten zur Abschätzung des Inokulums verwendet. Die tatsächlichen cfu-Daten des Inokulums wurden sowohl für *in vivo*- als auch *in vitro*-Experimente durch Ausplattieren überprüft.

4.2. *In vivo*-Infektionen im Mausmodell

Um die Salmonellen-induzierte Colitis besser charakterisieren und die Interaktion der unterschiedlichen *Salmonella*-Stämme mit dem Gesamtorganismus der Maus beschreiben zu können, erfolgten verschiedene *in vivo*-Versuche. Dabei wurden mehrere Parameter untersucht: Zum einen erfolgte die Beurteilung des Vermögens der *Salmonella*-Serovare in unterschiedliche Gewebe bzw. Organe zu invadieren und die Beurteilung der induzierten Colitis anhand histologischer Untersuchungen des

4. Ergebnisse

Caecums (Blinddarms). Zum anderen wurde mittels ELISA die Immunantwort der Versuchstiere auf Ebene verschiedener proinflammatorischer Zytokine analysiert.

Nachdem die C57BL/6-Mäuse 24 h vor der Infektion mit Streptomycin behandelt wurden, erfolgte die orale Gabe der verschiedenen *Salmonella*-Stämme mit einer entsprechenden Infektionsdosis von $3 \cdot 10^5$ cfu pro Tier. Es wurden jeweils fünf Tiere mit dem gleichen Serovar infiziert und nach der Behandlung in getrennten Käfigen gehalten.

Neben den ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen (*S. Typhimurium* SL1344, *S. Infantis* 335-3 und 119944), wurden in diesen Versuchen auch zwei *S. Infantis*-Mutanten 335-3 AR und 335-3 AR/pESI verwendet. Vorangegangene Studien, welche das vermehrte Auftreten des Serovars *S. Infantis* in Israel innerhalb der letzten Jahre untersucht haben, konnten zeigen, dass das neu auftkommende Isolat *S. I.* 119944 über ein Virulenzplasmid (engl.: „plasmid of emerging *S. Infantis*“ - pESI) verfügt, welches für die stärkere Pathogenität des neu aufkommenden Isolats verantwortlich sein könnte (Aviv *et al.*, 2013). Diesem Plasmid wird neben einer erhöhten Antibiotika-Resistenz, unter anderem eine ebenso verbesserte Fähigkeit zur Biofilmbildung, sowie Adhäsion und Invasion in die Wirtszellen zugeschrieben. Daher wurde das isolierte Plasmid für weiterführende Studien in eine Azid-resistente Mutante von *S. I.* 335-3 eingebracht, um den gleichen bakteriellen Hintergrund zu erhalten. Die resultierenden Stämme werden als *S. I.* 335-3 AR (ohne Virulenzplasmid) und *S. I.* 335-3 AR/pESI (mit Virulenzplasmid) bezeichnet und unterscheiden sich nur durch das Plasmid (Aviv *et al.*, 2013), wogegen das frühe Isolat *S. I.* 335-3 und das neu auftkommende Isolat *S. I.* 119944 auch Unterschiede auf chromosomaler Ebene aufweisen.

Zur Beurteilung der Entwicklung der akuten Salmonellen-induzierten Colitis nach unterschiedlich langen Infektionsphasen, wurden neben Studien mit jeweils 24 h Infektionsdauer weitere Versuche mit einer Dauer von 96 h durchgeführt. Versuche mit *S. I.* 335-3 AR und *S. I.* 335-3 AR/pESI wurden nur für den frühen Zeitpunkt von 24 h durchgeführt. Um einen Vergleich zu nicht infizierten Tieren zu erhalten, dienten zu beiden untersuchten Zeitpunkten jeweils fünf Mäuse als nicht infizierte

Kontrollgruppe. Sie bekamen nach der Streptomycin-Behandlung anstatt der Infektion nur 100 µL HEPES-Puffer.

4.2.1. Vergleich der intestinalen und systemischen Besiedlung nach unterschiedlich langen Infektionsphasen

Zur Bestimmung der Keimlast innerhalb des Darms und der anschließenden histologischen Beurteilung, wurde dieser nach den Infektionsphasen unter sterilen Bedingungen entnommen und wie in 3.2.3.3. *Bestimmung der Keimzahlen je Organ* beschrieben behandelt. Zusätzlich erfolgten die Entnahme und Keimlast-Bestimmung des mLK, der Milz und der Leber (systemische Organe).

Nach 24 h Infektionsdauer konnte mit Ausnahme der Kontrollgruppe (n. i.), bei allen infizierten Tieren eine Besiedlung des Darms durch *Salmonella* nachgewiesen werden. Es zeigte sich deutlich, dass die Keimzahlen aller ursprünglichen Serovare im Ileum mit einem Mittelwert von $3,7 * 10^5$ cfu nur sehr gering waren und im Caecum, sowie im Colon mit Mittelwerten zwischen $4,5 * 10^8$ bzw. $2,6 * 10^8$ cfu eine starke Keimlast mit ähnlichen Größenordnungen aufwiesen (Abbildung 6A). Zudem besiedelten die S. I.-Isolate 335-3 und 119944 alle Darmabschnitte stärker als S. Typhimurium, wobei die Unterschiede der Keimzahlen nur im Caecum signifikant waren und dort eine geringe Signifikanz zwischen den beiden S. Infantis-Serovaren und eine hohe Signifikanz zwischen S. Infantis und S. Typhimurium festzustellen war.

Der Vergleich zwischen den beiden S. I.-Mutanten 335-3 AR und 335-3 AR/pESI zeigte die stärkste Besiedlung im Caecum durch den Plasmid-tragenden Stamm S. I. 335-3 AR-pESI mit $5 * 10^8$ cfu und damit einen sehr stark signifikanten Unterschied zum Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR mit $5 * 10^6$ cfu. Das Ileum war im Mittel mit $1,1 * 10^6$ cfu besiedelt, während im Colon mittlere Werte von $2 * 10^6$ cfu (S. I. 335-3 AR) und $1 * 10^8$ cfu (S. I. 335-3 AR/pESI) nachgewiesen wurden (Abbildung 6B). Somit war S. I. 335-3 AR/pESI durchgehend zu einer höheren Besiedlung als S. I. 335-3 AR befähigt.

4. Ergebnisse

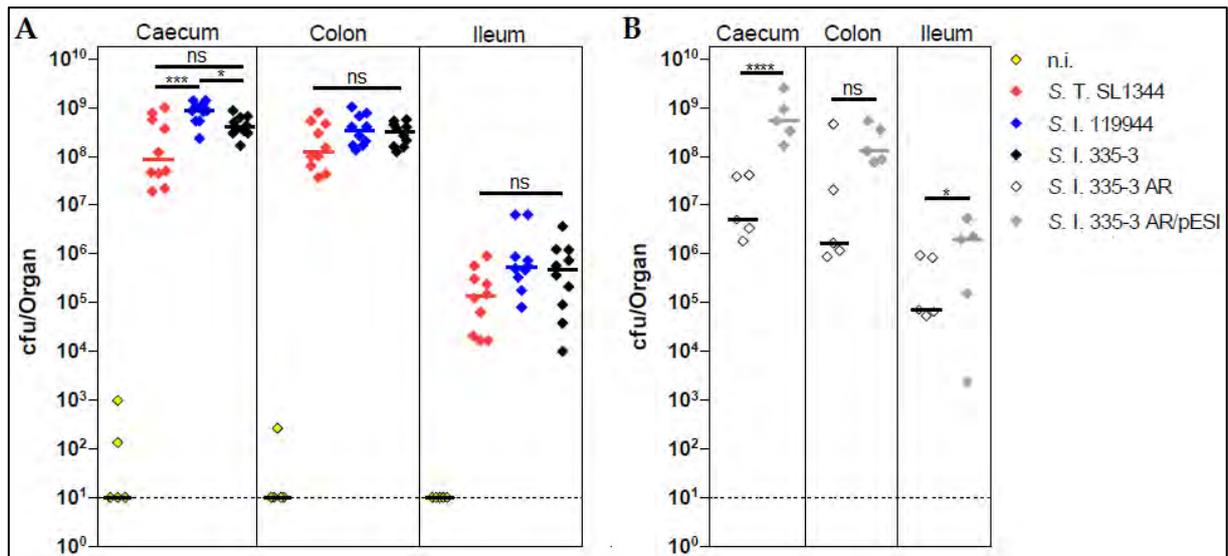


Abbildung 6: Intestinale Keimlast nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella*

Nach einer Infektion mit (A) den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten ist im Ileum eine geringe Besiedlung festzustellen, wogegen das Caecum und der Colon hohe Belastungen zeigen. (B) Versuche mit den S. I.-Mutanten 335-3 AR und 335-3 AR/pESI wiesen größere Unterschiede im gleichen Darmabschnitt auf und zeigen den Einfluss des eingefügten Plasmids pESI auf die Fähigkeit der intestinalen Besiedlung. Es ist jeweils der Median von 5 bis 10 Tieren pro Gruppe abgebildet und die Nachweisgrenze eingezeichnet (gestrichelte Linie).

(Signifikanztest: (A) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test)

Die Bestimmung der Keimlast der systemischen Organe zeigte, dass diese im Gegensatz zu den Darmabschnitten vergleichbar gering besiedelt wurden und unabhängig vom verwendeten Stamm oder dem untersuchten Organ, mit Ausnahme der Milz nach Infektionen mit S. I. 335-3 AR und S. I. 335-3 AR/pESI, keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren (Abbildung 7). Nach 24 h konnten alle ursprünglichen Stämme im mLK, der Milz und der Leber nachgewiesen werden. Dabei hatten die Salmonellen die mLK und die Leber am stärksten besiedelt und waren in der Milz nur vereinzelt über der Nachweisgrenze vorhanden. Außerdem schien das neu aufkommende Isolat S. I. 119944 verglichen mit dem frühen Serovar S. I. 335-3, schneller und in höherer Quantität in die systemischen Organe zu gelangen (Abbildung 7A).

Die Versuche mit den mutierten S. Infantis-Stämmen zeigten eine ebenfalls geringe Besiedlung der Milz und der Leber, wobei die Salmonellen im mLK nicht nachweisbar waren. Hier schien der Plasmid-tragende Stamm S. I. 335-3 AR/pESI im Vergleich zum Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR schneller in die Milz zu gelangen und in der Leber nur eine geringe Belastung zu verursachen.

4. Ergebnisse

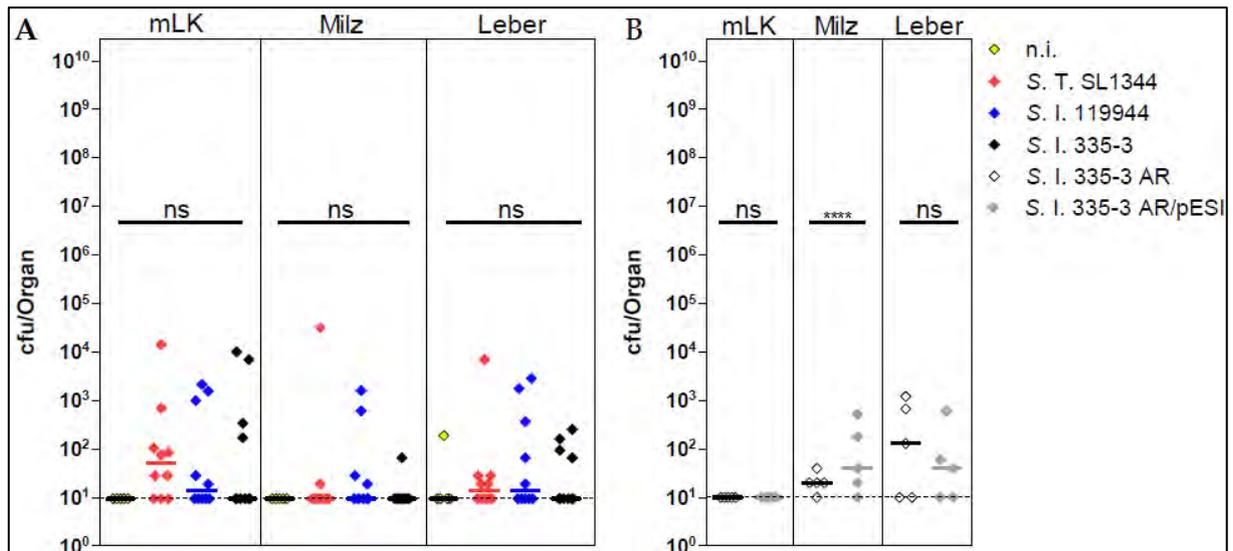


Abbildung 7: Systemische Keimlast nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella*

Infektionen mit (A) den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigen nur geringe Keimzahlen im Bereich der Nachweisgrenze. Sowohl S. T. SL1344 und als auch das neu auftretende S. I.-Isolat 119944, scheinen im Vergleich mit S. I. 335-3 schneller in den mLK und die Leber zu gelangen. (B) Versuche mit den mutierten *S. Infantis*-Stämmen zeigen unabhängig vom verwendeten Stamm geringe Belastungen in Milz und Leber, jedoch keine nachweisbare Keimlast im mLK. Es ist jeweils der Median von 5 bis 10 Tieren pro Gruppe abgebildet und die Nachweisgrenze eingezeichnet (gestrichelte Linie). (Signifikanztest: (A) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test)

Nach 96 h Infektionsdauer waren starke Veränderungen im Besiedlungsverhalten der ursprünglichen Stämme S. T. SL1344, sowie S. I. 335-3 und 119944 zu erkennen (Abbildung 8). Die Keimlast beider *S. Infantis*-Stämme wurde in allen Darmabschnitten, mit Ausnahme von S. I. 335-3 im Caecum, um jeweils zwei log-Stufen reduziert. Gleichzeitig wurde unabhängig vom Darmabschnitt beobachtet, dass der S. I.-Stamm 335-3 über einen längeren Zeitraum besser kolonisieren konnte und dort mit höheren Keimzahlen verglichen zu S. I. 119944 vorhanden war. Neben einer eher geringen Steigerung der Keimlast von S. T. SL1344 in Caecum und Colon um den Faktor 3 bzw. 10 und damit mittleren Werten um $3 \cdot 10^8$ cfu bzw. $1,6 \cdot 10^9$ cfu, wurde im Ileum nach 96 h Infektionsdauer eine um den Faktor $6 \cdot 10^2$ erhöhte Anzahl der Salmonellen gegenüber dem 24 h-Zeitpunkt nachgewiesen. Ein ähnlicher Trend war auch in den untersuchten systemischen Organen zu erkennen (Abbildung 9). *S. Typhimurium* kolonisierte in allen systemischen Organen mit vergleichbar hohen Keimzahlen. Mit einem Anstieg um den Faktor $10^2 - 10^5$ zeigte sich auch hier die starke systemische Belastung durch S. T. SL1344 und damit die hohe systemische Pathogenität dieses Stammes.

4. Ergebnisse

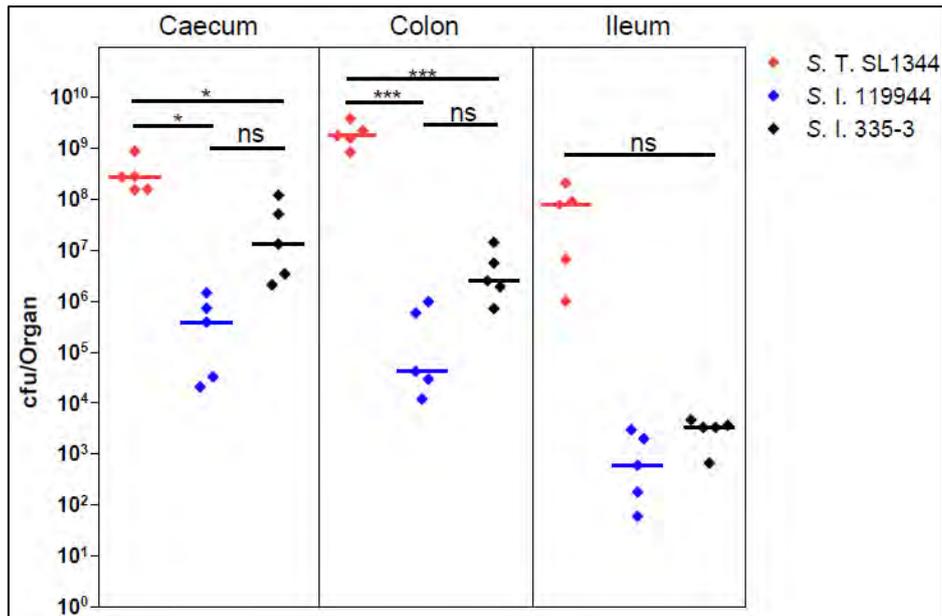


Abbildung 8: Intestinale Keimlast nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella*
 96 h-Versuche mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigen im Vergleich zu 24 h-Versuchen eine Reduktion der Keimlast um mindestens 2 log-Stufen in allen Darmabschnitten nach Infektionen mit den S. I.-Isolaten 119944 und 335-3. Im Gegensatz dazu verursacht S. T. SL1344 unabhängig vom intestinalen Teilabschnitt quantitative höhere Belastungen. Es ist jeweils der Median von 5 Tieren pro Gruppe abgebildet und die Nachweisgrenze eingezeichnet (gestrichelte Linie).
 (Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest)

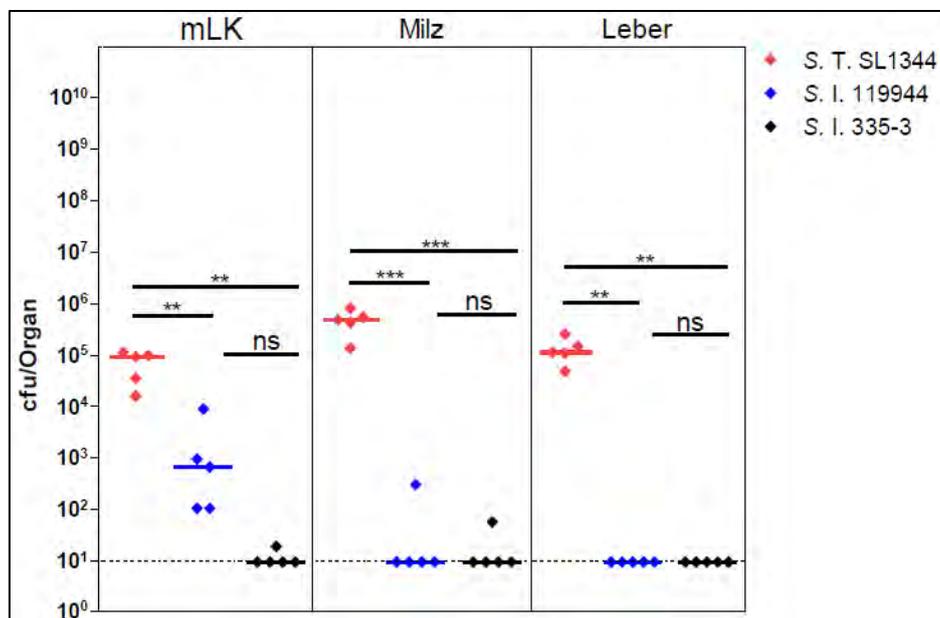


Abbildung 9: Systemische Keimlast nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella*
 96 h-Versuche mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigen im Vergleich zu 24 h keine nachweisbare Keimlast in den systemischen Organen, mit Ausnahme des mLK, nach Infektionen mit S. I. 119944 und S. I. 335-3. Dagegen sind nach Infektionen mit S. T. SL1344 hohe Belastungen aller untersuchten Organe nachweisbar. Es ist jeweils der Median von 5 Tieren pro Gruppe abgebildet und die Nachweisgrenze eingezeichnet (gestrichelte Linie).
 (Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest)

Dagegen konnten in der Milz und der Leber im Mittel keine *S. Infantis* nachgewiesen werden und nur innerhalb des mLK lagen die Keimzahlen bei *S. I.* 119944 mit einem Mittelwert von ca. $7 \cdot 10^2$ cfu oberhalb der Nachweisgrenze. Obwohl die Unterschiede zwischen den beiden *S. Infantis*-Stämmen unabhängig vom untersuchten Organ nicht signifikant waren, zeigte sich dennoch dass das neu aufkommende *S. I.*-Isolat 119944 nachhaltig im mLK kolonisierte und dort zum Überleben fähig war.

Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass nach 24 h-Infektionen sowohl der frühe *S. I.*-Stamm 335-3 als auch der neu aufkommende *S. I.*-Stamm 119944 eine hohe Keimlast in allen Darmabschnitten verursachten, wobei Caecum und Colon am stärksten besiedelt waren. Die systemischen Organe waren nur gering besiedelt. Nach 96 h war die Besiedlung der Darmabschnitte durch das frühe Isolat *S. I.* 335-3 im Vergleich zum neu aufkommenden *S. I.* 119944 stärker, wogegen *S. I.* 119944 die mLK stärker kolonisierte.

Versuche mit *S. I.* 335-3 AR und *S. I.* 335-3 AR/pESI zeigten zum 24 h-Zeitpunkt die höchste Keimlast im Caecum, wobei der Plasmid-tragende Stamm *S. I.* 335-3 AR/pESI durchgehend höhere intestinale Besiedlungen aufwies.

4.2.2. Bestimmung der Gewichte isolierter Caeca

Anschließend erfolgte die Bestimmung des Gesamtgewichts der isolierten Caeca, wobei das Caecum eines gesundes Tieres zwischen 500 - 600 mg wog und eine Reduktion des Gewichts mit der Schwere der intestinalen Entzündung einher geht (Barthel *et al.*, 2003; Abbildung 10). Nach 24 h Infektionsdauer wiesen die Caeca der mit *S. T.* SL1344 infizierten Tiere mit im Mittel 254 ± 26 mg die geringsten Gewichte auf, was für eine starke Entzündung des Darmabschnitts sprach und hohe signifikante Unterschiede zu den *S. Infantis*-Stämmen feststellen ließen (Abbildung 10A). Dagegen lagen die Gewichte der Caeca von mit *S. Infantis* infizierten Mäusen im Bereich nicht infizierter Tiere und zeigten für *S. I.* 119944 (ca. 499 ± 19 mg) nur eine leichte Reduktion des durchschnittlichen Gewichtes, wobei die Unterschiede zwischen beiden *S. Infantis*-Stämmen nicht signifikant waren.

4. Ergebnisse

Bei der Infektion mit den *S. Infantis*-Mutanten *S. I. 335-3 AR* und *S. I. 335-3 AR* war der Unterschied der Caecum-Gewichte nicht signifikant (Abbildung 10B).

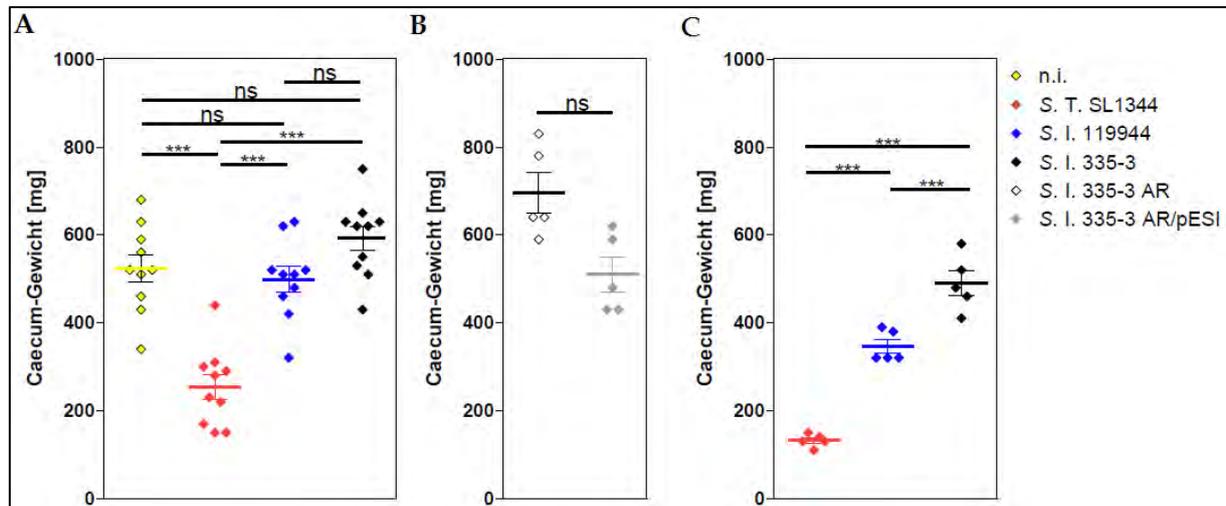


Abbildung 10: Reduktion des Caecum-Gewichtes als Folge einer Salmonellen-induzierten Colitis

Gewichte isolierter Caeca nach Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella* nach (A + B) 24 h und (C) 96 h Infektionsdauer. Dabei weisen hohe Gewichte auf eine geringe Belastung und einen damit gesunden Darmabschnitt hin, wogegen ein erhöhter Entzündungsgrad zur Reduktion des Caecum-Gewichtes führt. Es sind jeweils die Mittelwerte von 5 bis 10 Tieren pro Gruppe und Abweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

(statistische Signifikanz: (A + C) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test)

Mit fortschreitender Infektionsdauer von 96 h wurde gezeigt, dass der Schweregrad der Entzündung durch alle ursprünglichen Serovare zunahm und die Gewichte der Caeca dementsprechend stärker reduziert waren. Mit hohen signifikanten Unterschieden war der Trend der untersuchten *Salmonella*-Stämme zwar unverändert, dennoch war das neu aufkommende *S. I.*-Isolat 119944 (346 ± 20 mg) nach einer längeren Infektionsdauer in der Lage eine massivere Entzündung des Caecums hervorzurufen und grenzte sich hier mit hoher Signifikanz vom frühen *S. I.*-Isolat 335-3 (490 ± 30 mg) ab (Abbildung 10C).

In diesem Abschnitt wurde zusammenfassend gezeigt, dass die Caeca von mit *S. I. 335-3* und *S. I. 119944* infizierten Tieren nach 24 h-Infektionen keine signifikanten Gewichtsreduktionen im Vergleich zu nicht infizierten Tieren aufwiesen. Nach 96 h-Infektionen wurde dagegen für beide *S. I.*-Isolate 335-3 und 119944 eine Abnahme des Caecum-Gewichtes gezeigt, welche für das neu aufkommende Isolat *S. I. 119944* am stärksten war.

Die Caeca von mit S. I. 335-3 AR und S. I. 335-3 AR/pESI infizierten Mäusen wiesen zum 24 h-Zeitpunkt Gewichte im Bereich von nicht-infizierten Mäusen auf.

4.2.3. Bestimmung des Entzündungsgrades der isolierten Caeca

Die Beurteilung der durch die Salmonellen verursachten intestinalen Entzündung, erfolgte durch Quantifizierung der histopathologischen Veränderungen nach einem etablierten Bewertungssystem (vgl. Tabelle 14, Seite 24). Dazu wurden die Caeca der Tiere isoliert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurde an 5 µm dicken Paraffinschnitten eine HE-Färbung durchgeführt (vgl. 3.2.3.4.2. *Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)*). Bereits nach einer 24-stündigen Infektion ließen sich deutliche pathologische Veränderungen auf Grund einer beginnenden Entzündung im caecalen Gewebe erkennen (Abbildung 11B + C). Im Vergleich zu einem nicht infizierten Tier und eines damit gesunden caecalen Gewebes (Abbildung 11A) zeigten sich vor allem für S. T. SL1344 und das neu aufkommende S. I.-Isolat 119944 die Ausbildung von submukosalen Ödemen und die Infiltration von polymorphnukleären Leukozyten (PMNs) in Mukosa und Submukosa. Dadurch waren sowohl Mukosa als auch Submukosa stark verdickt und die Krypten-Struktur beschädigt. Außerdem war die umgebende Muskelschicht zusätzlich verdickt und Abschilferungen des Oberflächenepithels reichten stellenweise bis zur Zerstörung der Epithelschicht. Vor allem mit S. T. SL1344 infizierte Mäuse ließen darüber hinaus eine Vielzahl von apoptotischen Zellen im Lumen und die Bildung von Lymphaggregaten erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten mit S. I. 335-3 infizierte Mäuse keine bzw. nur geringe pathologische Veränderungen im Caecum, welche auf eine Colitis hindeuten ließen.

Die Infektion mit dem Plasmid-tragenden S. I. 335-3 AR/pESI zeigte, dass dieser nach 24 h ebenfalls eine stärkere intestinale Entzündung *in vivo* verursachte. Hier wurden neben submukosalen Ödemen und großflächigen Abschilferungen des Oberflächenepithels, auch eine Verdickung der Mukosa festgestellt. Dagegen ließen mit S. I. 335-3 AR infizierte Mäuse keine bzw. nur geringe pathologische Veränderungen

4. Ergebnisse

erkennen (Abbildung 11B + C). Versuche mit 96 h Infektionszeit, welche mit den ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen durchgeführt wurden, zeigten für S. T. SL1344 eine massive Zunahme der intestinalen Entzündung und die voranschreitende Zerstörung des caecalen Gewebes. Außerdem konnte festgestellt werden, dass durch S. I. 119944 verursachte Entzündungen nach einer längeren Infektionsdauer geringer wurden und das caecale Gewebe geringer geschädigt war. Die Caeca der mit S. I. 335-3 infizierten Tiere zeigten unabhängig von der Infektionsdauer nur schwach ausgeprägte Entzündungsmerkmale (Abbildung 11B).

Zur weiteren Beurteilung des Entzündungsgrades der isolierten Caeca, wurden die HE-gefärbten Schnitte nach der in 3.2.3.4.3. *Pathologische Beurteilung* beschriebenen Scoring-Tabelle bewertet. Dies ermöglichte eine Quantifizierung der intestinalen Entzündung und erleichterte damit die Vergleichbarkeit unter den verschiedenen *Salmonella*-Stämmen. Durch das Punktesystem der verwendeten Scoring-Tabelle konnte die Bewertung im Bereich von 0 bis 23 Punkten liegen, wobei 23 Punkte den Maximalwert und damit die stärkste Entzündung repräsentierten.

Nach einer Infektionsdauer von 24 h konnte mit durchschnittlich $12 \pm 0,9$ Punkten die stärkste Entzündung durch die Infektion mit S. T. SL1344 festgestellt werden, woran sich die S. I.-Stämme 119944 mit ca. $5 \pm 0,7$ Punkten und 335-3 mit ca. $2 \pm 0,7$ Punkten anschlossen (Abbildung 12A). Die Versuche mit den mutierten S. Infantis-Isolaten zeigten, dass der Plasmid-tragende Stamm S. I. 335-3 AR/pESI ($6,4 \pm 1,5$ Punkte) eine stärkere Entzündung im Vergleich mit dem Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR ($1,6 \pm 0,5$ Punkte) induzierte (Abbildung 12B).

Nach einer 96-stündigen Infektion wiesen alle ursprünglichen *Salmonella*-Isolate eine Zunahme des pathologischen Befundes auf (Abbildung 12C). Auch hier war S. T. SL1344 mit ca. $14 \pm 0,6$ Punkten im Mittel sehr dominant und verursachte die stärkste intestinale Entzündung im Vergleich zu den S. Infantis-Isolaten. Hier konnte nur ein geringer Anstieg des Entzündungsgrades festgestellt werden, welcher für S. I. 119944 um ca. zwei Punkte und für S. I. 335-3 um einen Punkt zunahm.

4. Ergebnisse

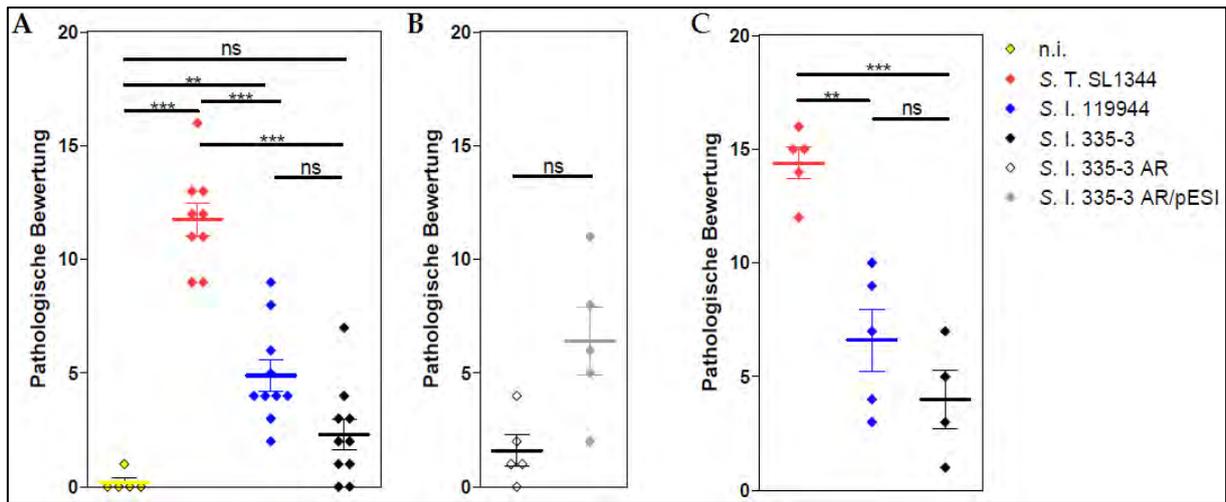


Abbildung 12: Pathologische Bewertung infizierter Caeca

HE-gefärbte Paraffinschnitte isolierter Caeca von infizierten C57BL/6-Mäusen wurden nach (A + B) 24 h und (C) 96 h Infektionsdauer pathologisch beurteilt. Dabei zeigte *S. T. SL1344* jeweils die stärkste Pathologie, gefolgt von *S. I. 119944* und *S. I. 335-3*. (B) Versuche mit den mutierten *S. Infantis*-Stämmen zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Plasmid-freien 335-3 AR und dem Plasmid-tragenden 335-3 AR/pESI. Es sind jeweils die Mittelwerte von 5 bis 10 Tieren pro Gruppe und Abweichungen als Fehlerbalken dargestellt.

(Signifikanztest: (A + C) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test)

Diese Ergebnisse zeigen, dass das neu aufkommende Isolat *S. I. 119944* zum frühen Zeitpunkt der Infektion (24 h) deutliche intestinale Entzündungsmerkmale wie submukosale Ödeme und infiltrierende PMNs hervorrief, welche nach 96 h leicht abklagen. Durch das frühe Isolat *S. I. 335-3* wurden dagegen nur wenige bzw. keine pathologischen Veränderungen nach 24 h und 96 h gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren nachgewiesen.

24 h-Versuche mit den mutierten *S. I.*-Stämmen zeigten, dass der Plasmid-tragende Stamm *S. I. 335-3 AR/pESI* pathologische Veränderungen im Caecum verursachte, wogegen für den Plasmid-freien Stamm *S. I. 335-3 AR* keine Pathologie festzustellen war.

4. Ergebnisse

4.2.4. Visualisierung caecaler Zellstrukturen mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur besseren Charakterisierung der Wirt-Pathogen-Interaktion wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte der Caeca zusätzlich immunhistologisch angefärbt. Da *Salmonella* sowohl aktiv als auch passiv in unterschiedliche Zelltypen wie beispielsweise Makrophagen, Epithelzellen und M-Zellen eindringen können und damit in der Lage sind die epitheliale Grenzschicht zu überwinden, wurden die verschiedenen *Salmonella*-Isolate mit spezifischen primären Antikörpern und grün-fluoreszierenden sekundären Antikörpern angefärbt (vgl. 3.2.3.4.4. *Immunhistologische Fluoreszenzfärbung*). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Da eine Salmonellen-induzierte Colitis zur lokalen Zerstörung des Epithelgewebes führt und dieses unter anderem durch Adhäsionsproteine (engl.: „Adherence Junction“ - AJ) stabilisiert wird, erfolgte ebenfalls die Visualisierung dieser Zellen durch die Proteine E-Cadherin (weiß) und β -Catenin (rot). Dabei bindet E-Cadherin als Transmembran-Protein an das intrazellulär lokalisierte β -Catenin, welches eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellt. Abhängig vom verwendeten *Salmonella*-

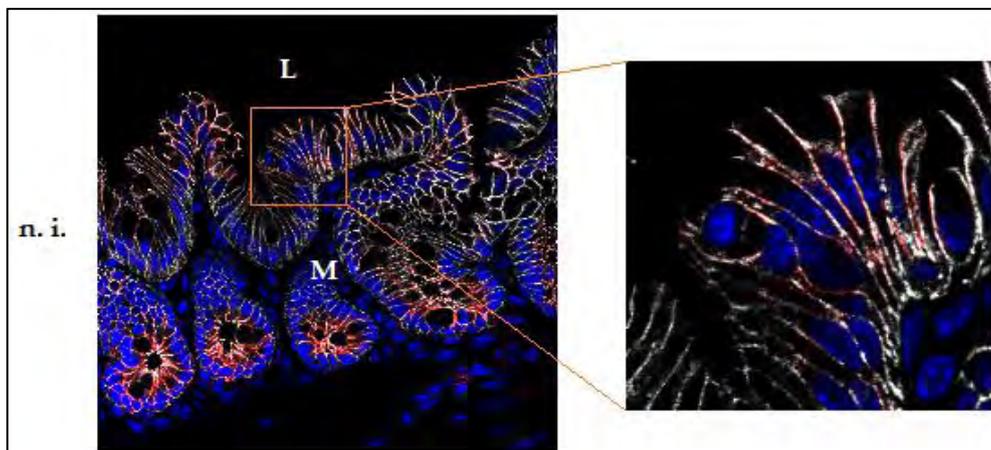


Abbildung 13: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung eines Caecum-Paraffinschnitts von nicht infizierten C57BL/6-Mäusen

Es sind jeweils Zellkerne (blau), E-Cadherin (weiß) bzw. β -Catenin (rot) gefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme aus einer Gruppe von 5 Tieren.

(originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 4, L: Lumen, M: Mukosa)

Isolat wurde entweder E-Cadherin oder β -Catenin angefärbt, da der primäre AK zur Visualisierung von *S. Typhimurium* den gleichen genomischen Ursprung hatte wie E-Cadherin (Maus) und der primäre AK für *S. Infantis* ebenfalls den gleichen

4. Ergebnisse

Ursprung wie β -Catenin (Kaninchen) aufwies, hätte eine immunhistologische Färbung beider Strukturproteine zu unspezifischen Bindungen geführt.

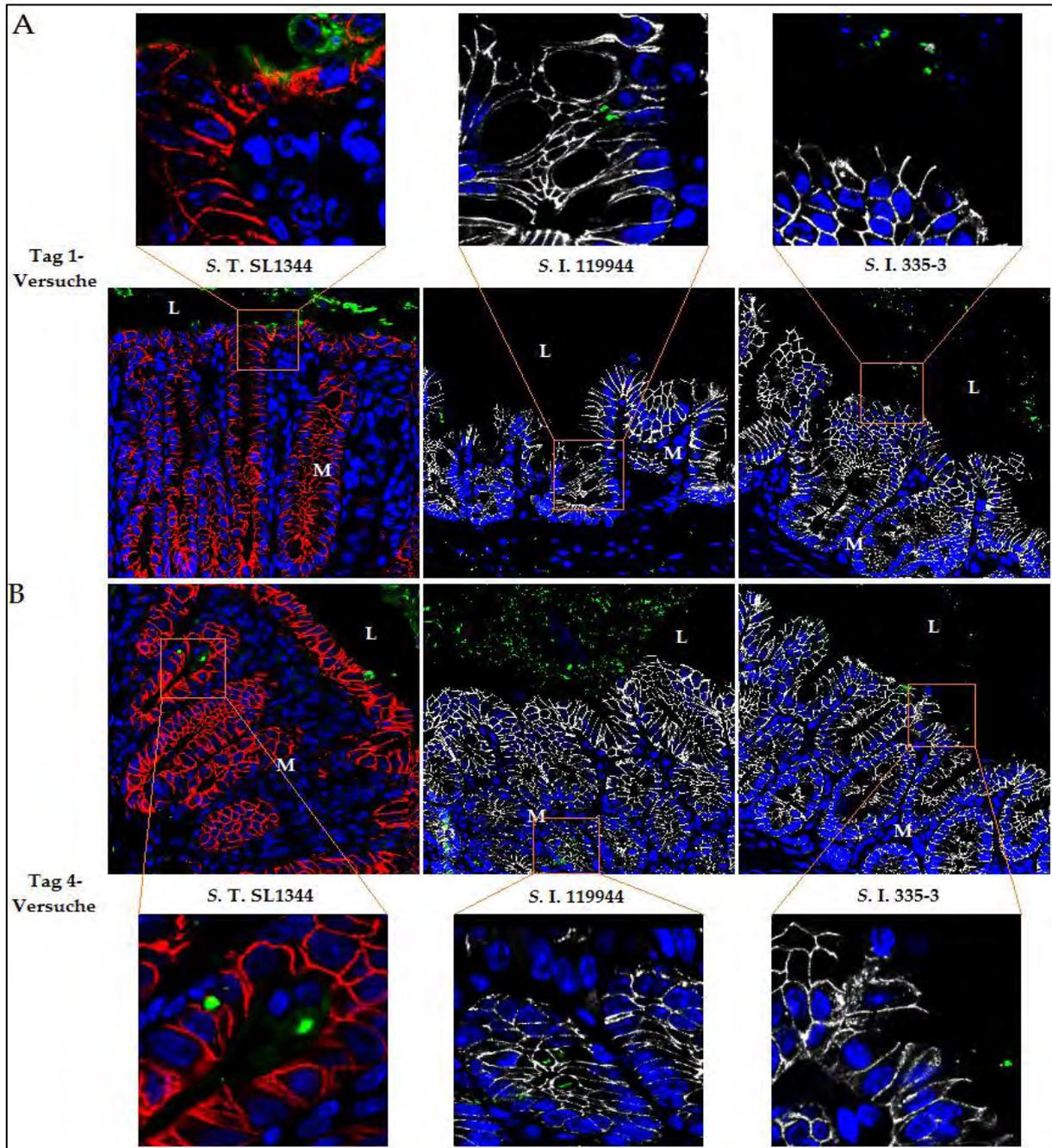


Abbildung 14: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Caecum-Paraffinschnitten nach Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten

Es wurden (A) 24 h- und (B) 96 h-Infektionen mit den *Salmonella*-Stämmen S. T. SL1344, S. I. 119944 und S. I. 335-3 durchgeführt und jeweils die Zellkerne (blau), Salmonellen (grün) und E-Cadherin (weiß) bzw. β -Catenin (rot) gefärbt. Es ist je eine repräsentative Aufnahme aus einer Gruppe von 5 bis 10 Tieren dargestellt.

(originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 4, L: Lumen, M: Mukosa)

4. Ergebnisse

Im Gegensatz dazu konnten bereits nach 24 h Infektionsdauer anhaftende *S. T. SL1344* an den Grenzflächen der verdickten Epithelschicht nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Dies konnte in geringerem Ausmaß ebenfalls für das neu aufkommende *S. Infantis*-Isolat 119944 festgestellt werden, wobei *S. I. 335-3* hauptsächlich im Lumen lokalisierte und keine Interaktion mit der epithelialen Grenzschicht gezeigt werden konnte.

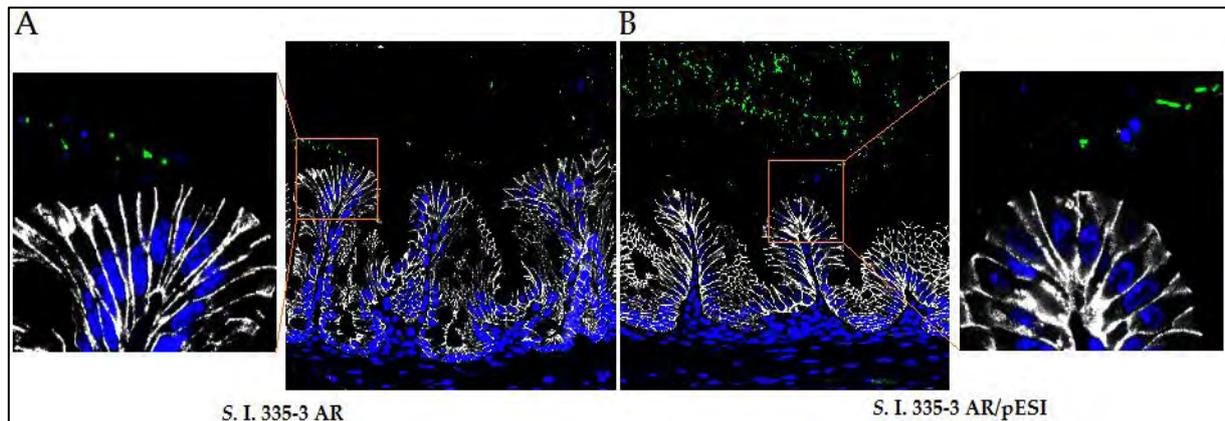


Abbildung 15: Immunhistologische Fluoreszenzfärbung von Caecum-Paraffinschnitten nach Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *S. Infantis*-Mutanten

Es wurden 24 h-Infektionen mit (A) *S. I. 335-3 AR* und (B) *S. I. 335-3 AR/pESI* durchgeführt und Zellkerne (blau), Salmonellen (grün) und E-Cadherin (weiß) angefärbt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus einer Gruppe von 5 Tieren.

(originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 4, L: Lumen, M: Mukosa)

Versuche mit den mutierten *S. I.*-Stämmen 335-3 AR und 335-3 AR/pESI zeigten nach 24 h Infektion keine adhären oder invasiven Salmonellen und eine mit nicht entzündeten Caeca vergleichbare Struktur (Abbildung 15A + B).

Nach 96-stündiger Infektionsdauer zeigten alle Caeca, die mit den ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen infiziert wurden eine deutliche Verdickung der Mukosa und für *S. T. SL1344* und *S. I. 119944* konnten invasive Salmonellen nachgewiesen werden (Abbildung 14B).

4.2.5. Untersuchung der proinflammatorischen Zytokin-Expression mittels qPCR

Die Invasion von *Salmonella* in die Wirtszellen und die dadurch induzierte Colitis im Mausmodell führe zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Immunantwort. Dabei wird die Expression verschiedener Zytokine hochreguliert, welche unterschiedliche Funktionen bei lokalen oder systemischen Entzündungen aufweisen.

Zur Bestimmung der Zytokinantwort erfolgte die Isolierung der RNA aus dem Gesamtgewebe des Caecums, die reverse Transkription der RNA in cDNA und eine anschließende Analyse der Genexpression mittels quantitativer real-time PCR. Im letzten Schritt erfolgte die Normalisierung der ermittelten Werte auf das Housekeeping-Gen GAPDH, wodurch die relative Expression zu diesem Gen festgestellt werden konnte.

Nach 24-stündiger Infektionsdauer wurde vor allem die verstärkte Expression von Interferon-gamma (IFN- γ) beobachtet (Abbildung 16). Dieses Zytokin wurde gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren nach einer Infektion mit *S. T.* SL1344 und dem neu aufkommenden *S. I.*-Isolat 119944 im Mittel über 105x bzw. 110x höher exprimiert. Auch der frühere *S. I.*-Stamm 335-3 zeigte mit einer im Mittel 26-fachen Expression eine deutliche Zunahme von IFN- γ gegenüber nicht infizierten Kontrollen. Für die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und MCP-1 (engl.: „Monocyte chemoattractant protein-1“) wurde ein ähnliches Expressionsmuster festgestellt, allerdings waren hier die Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen nicht signifikant: Infektionen mit *S. T.* SL1344 verursachten mit einer jeweils 18- bzw. 43-fachen Expression die stärkste Zunahme gegenüber nicht infizierten Tieren. Die Infektion mit *S. I.* 119944 wies mit Mittelwerten um einen 7- bzw. 21-fachen Anstieg des Expressionslevels jeweils ungefähr die Hälfte der durch *S. T.* SL1344 festgestellten Hochregulation auf. Dagegen waren die Expressionsraten durch eine Infektion mit *S. I.* 335-3 mit im Mittel 3- bzw. 5-facher Erhöhung im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren eher gering. Die Untersuchung für RELM- β zeigte eine konstante Zunahme der Expressionsrate um einen mittleren Faktor von 6 gegenüber nicht infizierten Tieren, welcher unabhängig vom verwendeten

4. Ergebnisse

Salmonella-Stamm war. Die Expression von TNF- α war für S. T. SL1344 und S. I. 335-3 nach 24 h vergleichbar gering hochreguliert (Faktor 4), wobei S. I. 119944

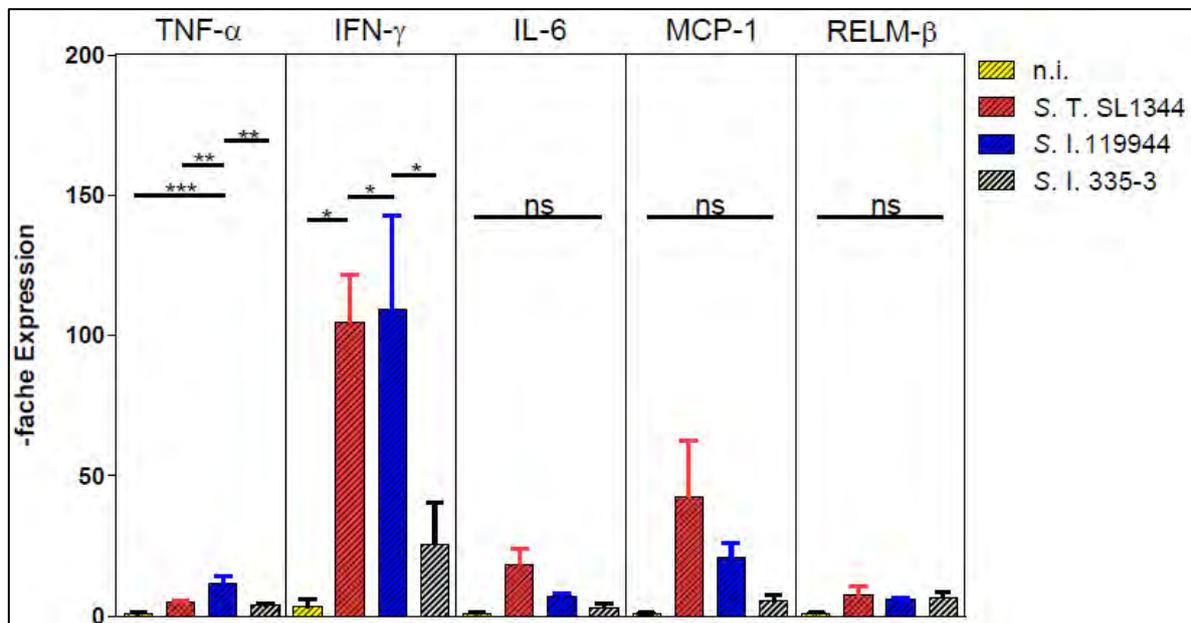


Abbildung 16: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten

Relative Genexpression einzelner proinflammatorischer Zytokine zu GAPDH nach 24 h-Infektionen mit S. T. SL1344, S. I. 119944 und S. I. 335-3. Die Bestimmung erfolgte auf Basis des caecalen Gesamtgewebes und der Analyse mittels qPCR. Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel von 5 bis 10 Tieren pro Gruppe und der Standardfehler als positiver Fehlerbalken. (Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, nicht abgebildete Vergleichswerte waren n. s.)

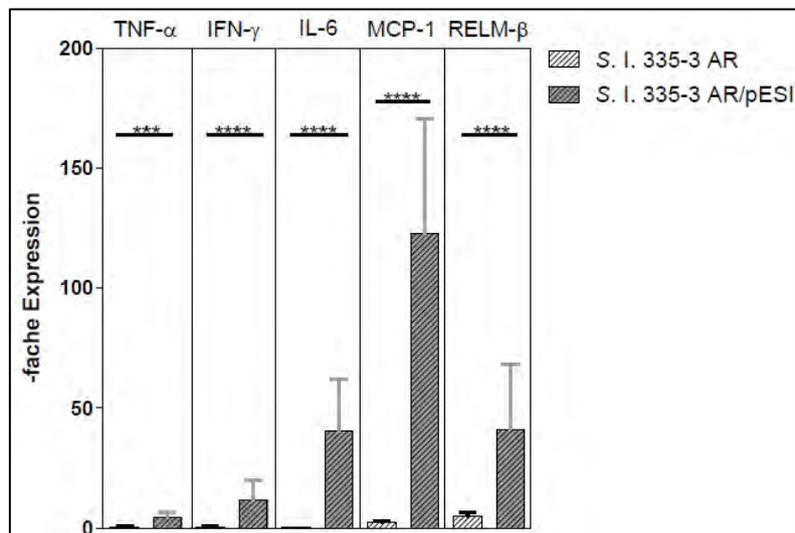


Abbildung 17: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *S. Infantis*-Mutanten

Relative Genexpression einzelner proinflammatorischer Zytokine zu GAPDH nach 24 h-Infektionen mit den mutierten S. I.-Stämmen 335-3 AR und 335-3 AR/pESI. Die Bestimmung erfolgte auf Basis des caecalen Gesamtgewebes und der Analyse mittels qPCR. Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel von 5 Tieren pro Gruppe und der Standardfehler als positiver Fehlerbalken. (Signifikanztest: Student's t-Test)

4. Ergebnisse

eine signifikant erhöhte Expression um den mittleren Faktor von 12 im Vergleich mit nicht infizierten Tieren feststellen ließ.

Weiterführende Untersuchungen mit S. I. 335-3 AR und S. I. 335-3 AR/pESI zeigten für alle Zytokine die deutlich erhöhte Genexpression nach einer 24-stündigen Infektion mit dem Plasmid-tragenden S. I. 335-3 AR/pESI gegenüber nicht infizierten Tieren, wobei diese nur für IL-6, MCP-1 und RELM- β zu signifikanten Unterschieden zwischen beiden Stämmen führte (Abbildung 17). Die Expressionslevel von TNF- α waren durch eine Infektion mit S. I. 335-3 AR gering herunter reguliert und zeigten für S. I. 335-3 AR/pESI eine schwache Hochregulation um den mittleren Faktor von 4 im Vergleich zu nicht infizierten Tieren. Dieses Muster konnte auch für die Genexpression von IFN- γ festgestellt werden, wobei die Infektion mit dem Plasmid-tragenden S. I.-Stamm 335-3 AR/pESI hier zu einer mittleren Hochregulation um den Faktor 12 gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren führte. Während nach einer Infektion mit dem Plasmid-freien S. I. 335-3 AR die Genexpression von IL-6, MCP-1 und RELM- γ nur gering hochreguliert wurde, konnte für die Plasmid-tragende S. I.-Mutante 335-3 AR/pESI eine massive Hochregulation im Vergleich zur nicht

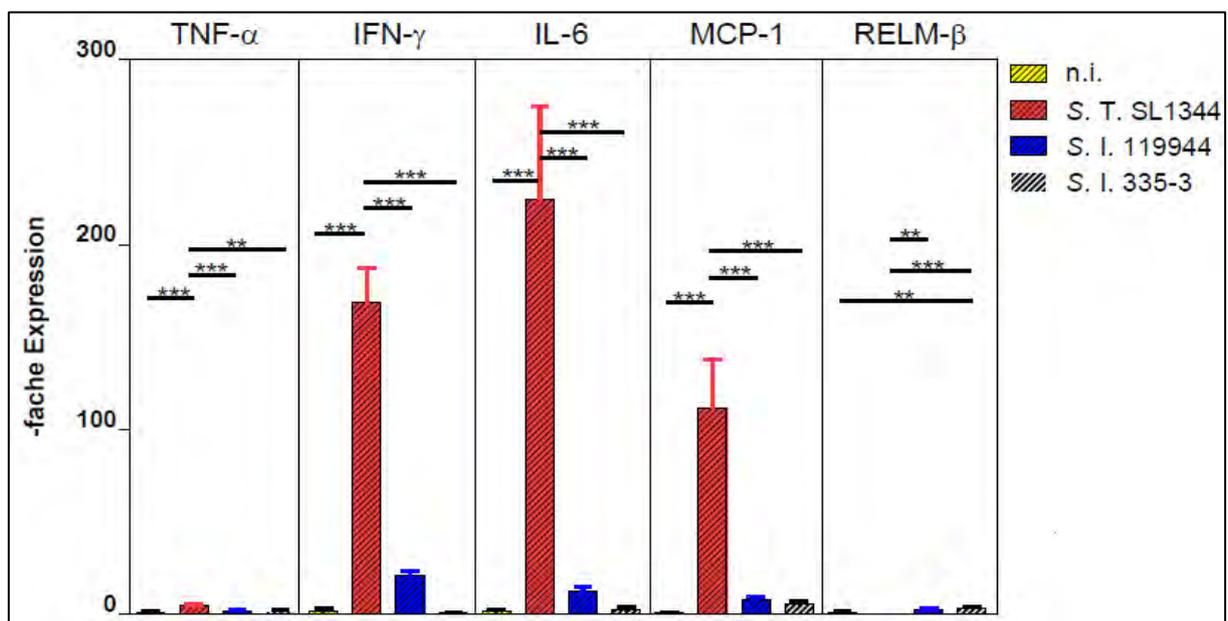


Abbildung 18: Induzierte Genexpression proinflammatorischer Zytokine nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten

Relative Genexpression einzelner proinflammatorischer Zytokine zu GAPDH nach 96 h-Infektion mit S. T. SL1344, S. I. 119944 und S. I. 335-3. Die Bestimmung erfolgte auf Basis des caecalen Gesamtgewebes und der Analyse mittels qPCR. Dargestellt sind jeweils das arithmetische Mittel von 5 Tieren pro Gruppe und der Standardfehler als positiver Fehlerbalken. (Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, nicht abgebildete Vergleichswerte waren n. s.)

infizierten Kontrollgruppe nach einer Infektionsphase von 24 h beobachtet werden (Abbildung 17).

Nach 96 h Infektionsdauer konnte durch die Infektion mit *S. T. SL1344* eine signifikant erhöhte Genexpression für IFN- γ , IL-6 und MCP-1 im Vergleich zu 24 h-Infektionen festgestellt werden (Abbildung 18). Dagegen konnten, mit Ausnahme der leicht erhöhten Genexpression für IL-6 durch das neu aufkommende Isolat *S. I. 119944*, für die ursprünglichen *S. Infantis*-Stämme abnehmende Expressionslevel aller untersuchten Zytokine gegenüber 24-stündigen Infektionsversuchen beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das neu aufkommende Isolat *S. I. 119944* eine stärkere Hochregulation aller analysierten proinflammatorischen Zytokine nach dem 24 h-Zeitpunkt im Vergleich zum frühen Isolat *S. I. 335-3* verursachte. Beim Vergleich zwischen den mutierten *S. Infantis*-Stämmen verursachte der Plasmidtragende Stamm *S. I. 335-3 AR/pESI* nach 24 h durchgehend stark signifikant erhöhte Expressionslevel gegenüber dem Plasmid-freien Stamm *S. I. 335-3 AR*, wobei die Genexpression von MCP-1 am stärksten hochreguliert war.

Nach 96 h wurden, mit Ausnahme der Expressionsrate von IL-6 durch *S. I. 119944*, geringere Genexpressionen aller Zytokine im Vergleich zum frühen Zeitpunkt (24 h) durch *S. Infantis*-Isolate festgestellt.

4.2.6. Bestimmung der Konzentration einzelner Zytokine mittels ELISA

Zur Bestimmung der produzierten Zytokine TNF- α , IFN- γ und MCP-1 auf Proteinebene, wurde der Überstand des homogenisierten caecalen Gesamtgewebes mittels ELISA analysiert. Hierzu wurde ein Teilabschnitt der jeweils isolierten Caeca in 1 mL sterilem PBS-Puffer überführt und homogenisiert.

Nach 24 h Infektionsdauer ließ der direkte Vergleich zwischen den ursprünglichen Isolaten die höchsten Konzentrationen von IFN- γ nach der Infektion mit *S. T. SL1344* (72 pg/mL) feststellen, gefolgt von *S. I. 335-3* (53 pg/mL) und *S. I. 119944* (18 pg/mL). Die Konzentrationen von TNF- α und des Chemokins MCP-1 lagen unabhängig vom

4. Ergebnisse

verwendeten *Salmonella*-Stamm durchgehend an der Nachweisgrenze und für MCP-1 auf dem Level von nicht infizierten Tieren (13 pg/mL) und damit an der Nachweisgrenze (Abbildung 19A).

Für die zwei mutierten *S. I.*-Stämme 335-3 AR und 335-3 AR/pESI zeigten die ermittelten Konzentrationen von IFN- γ mit Medianen von 205 pg/mL bzw. 68 pg/mL signifikante Unterschiede (Abbildung 19B). Das Chemokin MCP-1 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Konzentration von TNF- α war nach der Infektion mit

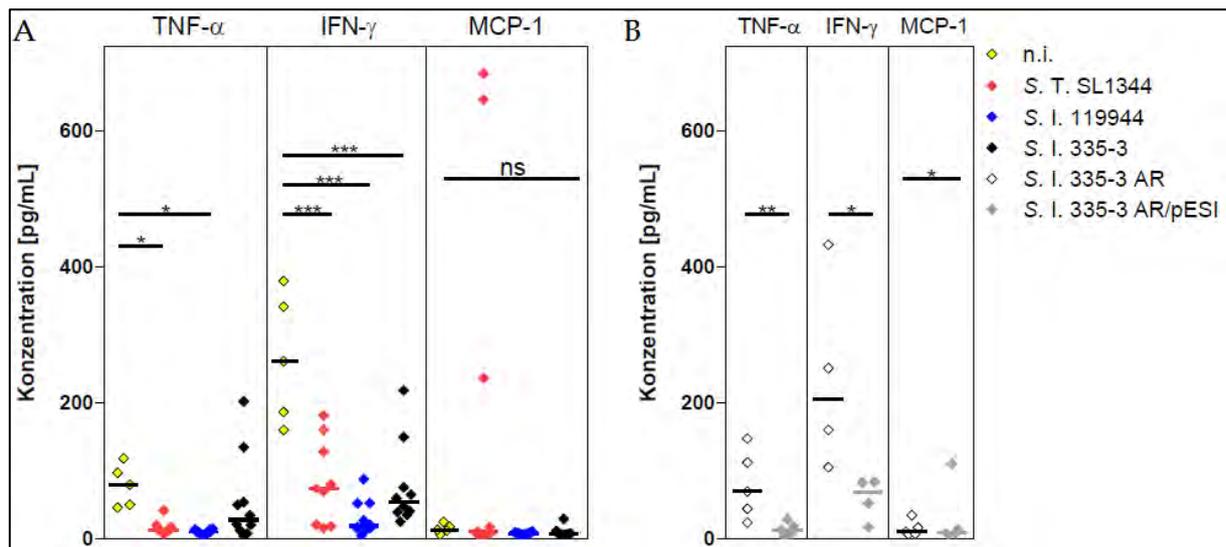


Abbildung 19: Zytokin-Konzentrationen nach 24 h-Infektionen mit *Salmonella*

Bestimmung der Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ und MCP-1 nach 24 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit (A) den ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen *S. T.* SL1344, *S. I.* 119944, *S. I.* 335-3 und (B) den mutierten Stämmen *S. I.* 335-3 AR und *S. I.* 335-3 AR/pESI. Es ist jeweils der Median von 4 bis 10 Tieren pro Gruppe abgebildet. (Signifikanztest: (A) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test; nicht abgebildete Vergleichswerte waren n. s.)

dem Plasmid-freien Stamm *S. I.* 335-3 AR mit 70 pg/mL gegenüber dem Plasmid-tragenden Stamm *S. I.* 335-3 AR/pESI mit 13 pg/mL um den Faktor 5,4 erhöht und zeigte hohe signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen.

Nach 96 h Infektionsdauer wurden für die Stämme *S. T.* SL1344 und *S. I.* 119944 Konzentrationen von 76 pg/mL bzw. 55 pg/mL TNF- α ermittelt (Abbildung 20). Diese Zunahme korrelierte mit dem zuvor ermittelten signifikanten Anstieg der Genexpression für TNF- α nach 24 h. Die Konzentrationen von IFN- γ waren nach Infektionen durch *S. I.* 119944 mit einem Median von 207 pg/mL am höchsten, gefolgt von *S. I.* 335-3 mit 101 pg/mL und *S. T.* SL1344 mit 55 pg/mL. Das Chemokin MCP-1 konnte für *S. I.* 335-3 nicht nachgewiesen werden und hatte für *S. T.* SL1344

4. Ergebnisse

mit mittleren 1023 pg/mL die ermittelte maximale Konzentration.

Allerdings müssen diese Ergebnisse der ELISA-basierten Analyse in weiteren Versuchen überprüft werden, da nicht infizierte Kontrolltiere aus unbekanntem Gründen überdurchschnittlich hohe Konzentrationen für TNF- α und IFN- γ aufwiesen (Abbildung 19A) und den zuvor erhobenen PCR-Daten widersprechen.

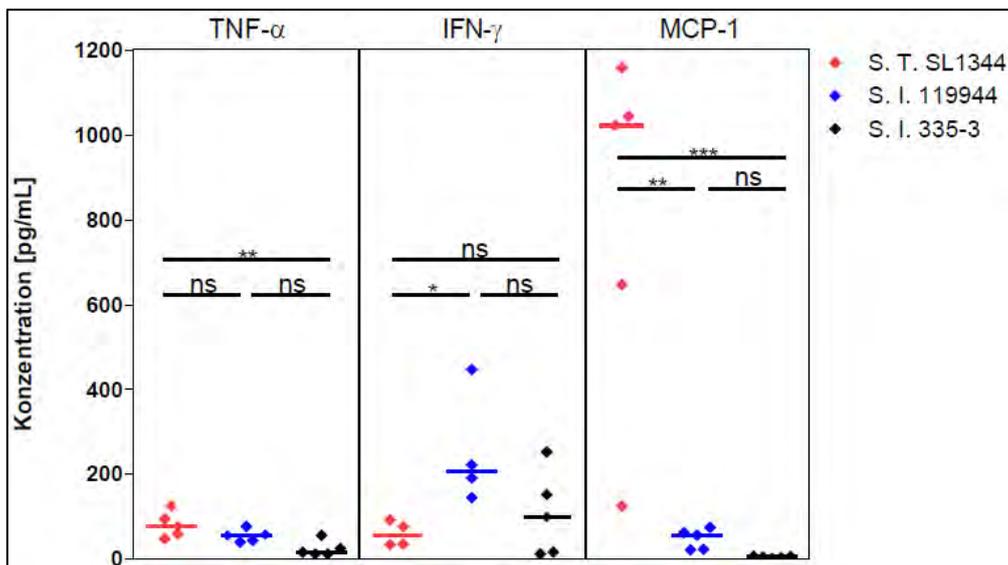


Abbildung 20: Zytokin-Konzentrationen nach 96 h-Infektionen mit ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten

Bestimmung der Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ und MCP-1 nach 96 h-Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit S. T. SL1344, S. I. 119944 und S. I. 335-3. Es ist jeweils der Median von 5 Tieren pro Gruppe abgebildet. (Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, nicht abgebildete Vergleichswerte waren n. s.)

4.3. *In vitro*-Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen

Um die Prozesse während der frühen und späten Phase der Infektion durch die unterschiedlichen *Salmonella*-Stämme näher charakterisieren zu können, wurden Experimente in zwei *in vitro*-Zellkultursystemen durchgeführt.

Da Epithelzellen die ersten Zelltypen darstellen, mit welchen *Salmonella* interagiert, wurden zuerst Infektionen dieser Zellen mit den einzelnen *Salmonella*-Stämmen untersucht. Die Versuche erfolgten mit humanen Epithelzellen, Caco-2/BBE 1, welche nach standardisierter Kultivierung auf permeablen Membranen dichte Monolayer ausbilden und als Modell für die intestinale Barriere dienen.

Nach dem Überwinden der Epithelzellschicht sind Makrophagen wichtige Zielzellen

für *Salmonella*. Um die Interaktion der *Salmonella*-Stämme mit den Makrophagen zu untersuchen, wurden Infektionen mit der murinen Makrophagen-Zelllinie ANA-1 durchgeführt.

4.3.1. Versuche mit Epithelzellen (Caco-2/BBe 1)

Nachdem die verwendeten Zellen Caco-2/BBe 1 zu mindestens 80 % konfluent gewachsen waren und ihre charakteristische Morphologie vollständig ausgeprägt war, wurden diese in Abhängigkeit von den verwendeten Inserts der Transwell®-Platten in einer vorgegebenen Dichte in die Wells ausgesät (vgl. 3.2.4.1.1. *Differenzierung und Polarisierung (Caco-2/BBe 1)*). Während der anschließenden Kultivierungsphase konnte die spontan eintretende Differenzierung und Polarisierung der Zellen durch die Messung des transepithelialen Widerstandes (engl.: „Transepithelial Resistance“ - TER) verfolgt werden. Zur besseren Auswertung der gemessenen Widerstandswerte, welche neben der ausgesäten Zellzahl auch von der zur Verfügung stehenden Grundfläche der permeablen Membran abhängig sind, wurden alle nachfolgenden TER-Werte normalisiert. Dabei erfolgte die Normalisierung nach folgender Gleichung:

$$f(x) = \frac{x - \text{Min}}{\text{Max} - \text{Min}}$$

Der Parameter „Min“ entspricht hier dem kleinsten gemessenen transepithelialen Widerstand innerhalb eines Versuchs und „Max“ dem entsprechend höchsten gemessenen TER-Wert innerhalb eines Versuchs. Weiterhin entspricht der Parameter „x“ für den zu normalisierenden TER-Wert dieses Versuchs.

Während eines Zeitraums von minimal 18 bis 21 Tagen bildet diese Zelllinie dichte Monolayer mit intakten Tight Junction-Strukturen aus. Die Entstehung dieser Barrierschicht wird durch einen stetig ansteigenden TER charakterisiert, welcher nach vollständiger Ausbildung des Monolayers in eine Plateau-Phase übergeht (Abbildung 21). Nach ungefähr 2 Wochen (13 Tagen) ist die Hälfte des maximal gemessenen TER erreicht, welcher in den folgenden Messungen geringe Messabweichungen aufweist und zum Ende der Differenzierungs- und Polari-

4. Ergebnisse

sierungsphase im Bereich zwischen 80 % und 100 % des maximalen Widerstandwertes liegt.

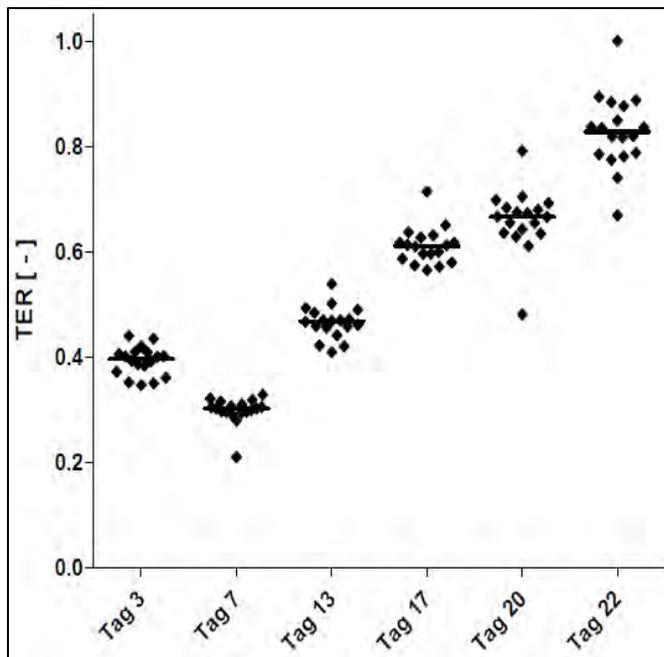


Abbildung 21: TER-Zunahme während der Ausbildung eines Monolayers mit intakten Tight Junctions

Die Differenzierungs- und Polarisierungsphase von Caco-2/BBe 1-Epithelzellen ist durch eine charakteristische Zunahme des TER gekennzeichnet, welche durch intakte Tight Junction-Strukturen verursacht wird. Nach einer geringen Abnahme innerhalb der ersten 7 Tage, kann eine stetige Zunahme des TER festgestellt werden. Nach vollständiger Ausbildung des Monolayers steigen die TER-Werte nicht mehr an und gehen in ein Plateau über (zwischen Tag 18 bis 21). Dargestellt sind die Mediane von normalisierten TER-Daten eines repräsentativen Versuchs mit einer 12 Well-Transwell®-Platte.

4.3.1.1. Messung des transepithelialen Widerstandes eines Caco-2/BBe 1-Monolayers nach bakterieller Infektion

Sobald die Epithelzellen vollständig zu einem dichten Monolayer mit intakten Tight Junctions ausdifferenziert und polarisiert waren, erfolgte die Infektion von apikaler Seite durch die unterschiedlichen *Salmonella*-Stämme. Hierzu wurden die Bakterien mit einer MOI von 20 auf die Zellen gegeben und die gesamte Platte kurz zentrifugiert, um die gleichzeitige Infektion aller Zellen zu gewährleisten. Während der weiteren Kultivierung erfolgte alle 30 min die Probennahme aus dem basalen Kompartiment. Durch das Ausplattieren dieser Proben wurde die quantitative Bestimmung der Pathogene ermöglicht, welche in der Lage waren den Monolayer zu passieren.

Nachdem die Infektionen der Caco-2/BBe 1 für jeweils 1,5 h durchgeführt wurden, erfolgte zur Charakterisierung der Permeabilität des Monolayers die Messung des TER. Die in Abbildung 22 dargestellten repräsentativen Graphen zeigen die Abnahme des TER auf Grund zerstörter Tight Junction-Strukturen nach einer

4. Ergebnisse

Infektion mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten über eine Dauer von 1,5 h.

Dabei war für *S. T.* SL1344 mit ca. 65 % die stärkste Abnahme des TER mit einer hohen Signifikanz zu den zwei *S. Infantis*-Isolaten und damit auch die massivste Schädigung des Monolayers zu beobachten. Die beiden *S. Infantis*-Stämme bewirkten ebenfalls eine Reduktion des transepithelialen Widerstandes, welche für *S. I.* 119944 mit ungefähren 31 % und für *S. I.* 335-3 mit ca. 24 % vergleichbar gering ausfiel und keinen signifikanten Unterschied ergab. Dennoch konnte durch Wiederholungs-Experimente gezeigt werden, dass dieser Trend zwischen den beiden *S. Infantis*-Isolaten bestehen blieb.

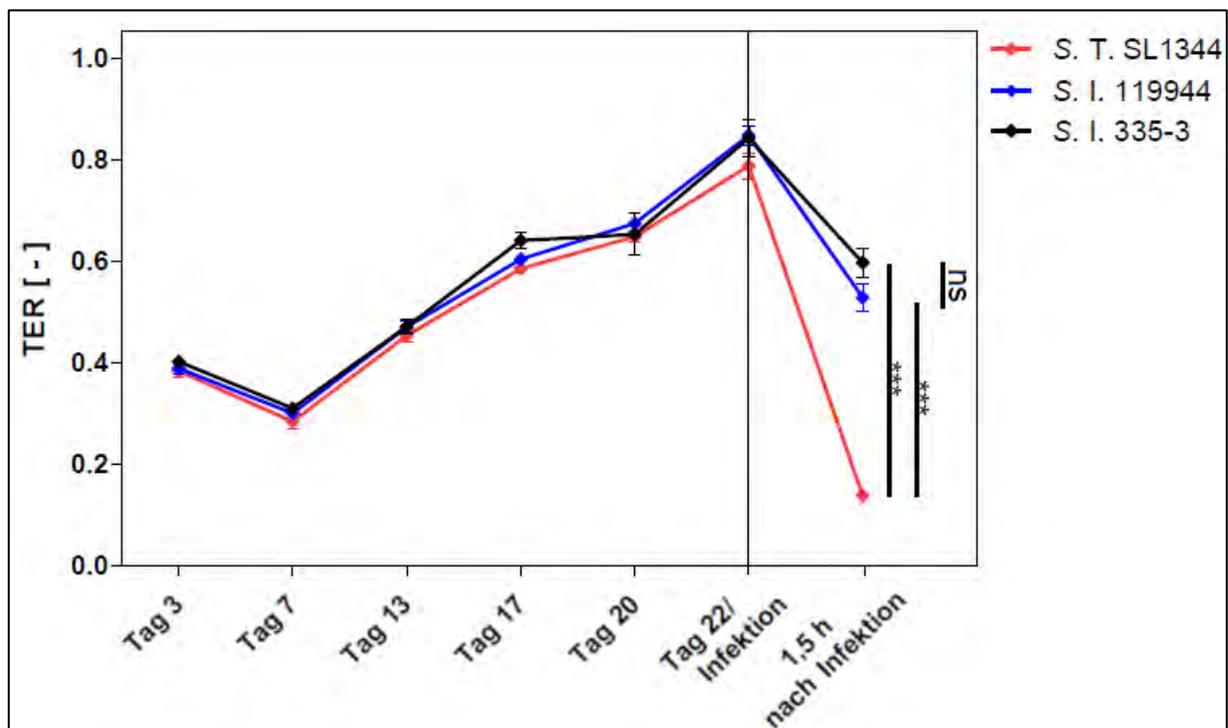


Abbildung 22: TER-Abnahme nach 1,5 h-Infektionen mit ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten

Versuche mit Monolayern der Zelllinie Caco-2/BBe 1 zeigen die Abnahme des TER nach 1,5 h-Infektionen mit *S. T.* SL1344, *S. I.* 119944 und *S. I.* 335-3. Dargestellt sind jeweils normalisierte TER-Daten eines repräsentativen Versuchs, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde und Abweichungen vom Mittelwert als Fehlerbalken gezeigt sind. (Versuchsbedingungen: Inserts mit \varnothing 12 mm und einem Porendurchmesser von 3 μ m, Aussaat von $5 \cdot 10^5$ Caco-2/BBe 1, MOI: 20, Signifikanztest: One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest)

Versuche mit den mutierten *S. Infantis*-Stämmen wurden bereits 16 Tage nach Aussaat der Caco-2/BBe 1-Zellen durchgeführt, da der Monolayer auf Grund der in diesen Versuchen verwendeten kleineren Membranen bereits nach dieser Zeit ausgebildet und kein weiterer Anstieg des TER festzustellen war (Abbildung 23).

4. Ergebnisse

Nach 1,5 h Infektionsdauer wurde für den Plasmid-freien S. I.-Stamm 335-3 AR eine Abnahme des TER um ca. 12 % gezeigt. Die Infektion mit dem Plasmid-tragenden S. I.-Stamm 335-3 AR/pESI wies eine geringere Reduktion des TER um ungefähr 10 % auf, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei mutierten S. Infantis-Stämmen nachgewiesen wurden.

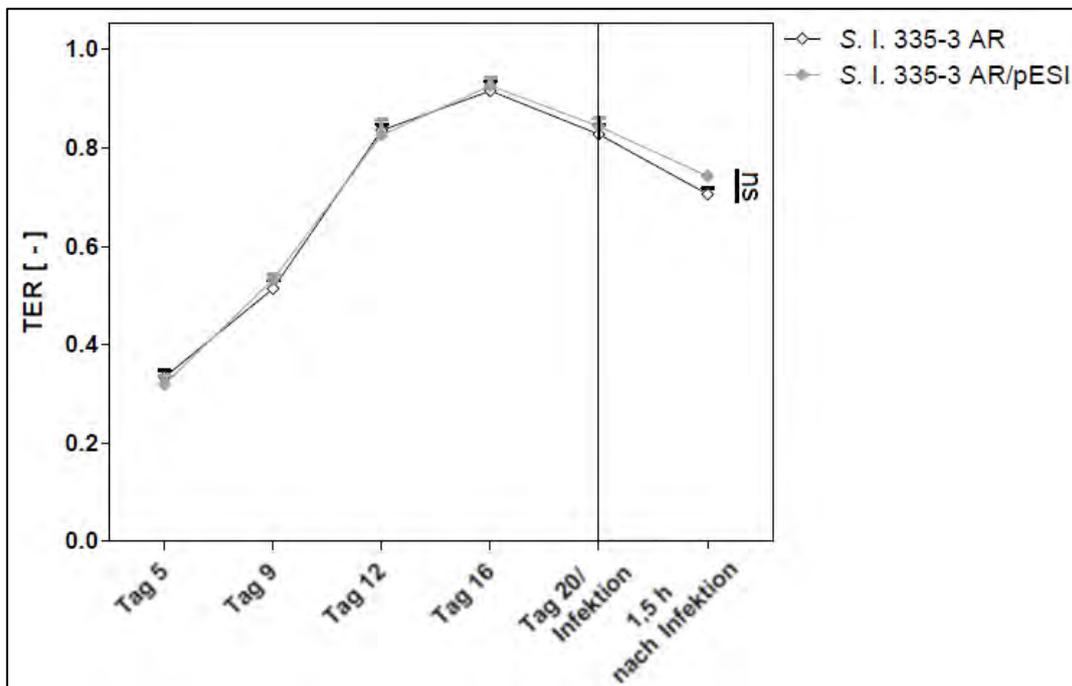


Abbildung 23: TER-Abnahme nach 1,5 h-Infektionen mit S. Infantis-Mutanten

Versuche mit Monolayern der Zelllinie Caco-2/BBE 1 zeigen die Abnahme des TER nach 1,5 h-Infektionen mit S. I. 335-3 AR und S. I. 335-3 AR/pESI. Dargestellt sind jeweils normalisierte TER-Daten eines repräsentativen Versuchs, wobei eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde und Abweichungen vom Mittelwert als Fehlerbalken gezeigt sind. (Versuchsbedingungen: Inserts mit \varnothing 6,5 mm und einem Porendurchmesser von 3 μ m, Aussaat von $2 \cdot 10^5$ Caco-2/BBE 1, MOI: 20, Signifikanztest: Student's t-Test)

Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass die Ausbildung eines intakten Monolayers der Zelllinie Caco-2/BBE 1 durch einen charakteristischen Anstieg des TER-Wertes begleitet war. Nach 1,5 h-Infektionen mit *Salmonella* wurde dieser TER deutlich reduziert: Infektionen mit den ursprünglichen Isolaten zeigten die stärkste Abnahme für S. T. SL1344, gefolgt von S. I. 119944 und S. I. 335-3.

Infektionen mit den mutierten S. Infantis-Stämmen zeigten geringe Reduktionen des TER, welche keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich ergaben.

4.3.1.2. Charakterisierung des Caco-2/BBE 1-Monolayers nach bakterieller Translokation mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die weitere Charakterisierung des Monolayers erfolgte über das Anfärben der Tight Junctions der Epithelzellen, da die Infektion mit *Salmonella* eine Zerstörung dieser Strukturen bewirkt (Sasakawa, 2009). Nach der Infektion durch *Salmonella*, wurden die Zellen mit Formalin auf den Membranen fixiert. Anschließend wurden die einzelnen Membranen in feuchte Kammern überführt und dort jeweils die Zellkerne mit DAPI (blau) und das Tight Junction-Protein Zonula occludens-1 (ZO-1) durch einen grün-fluoreszierenden Antikörper angefärbt. Um einen Vergleich zu intakten Monolayer-Strukturen zu erhalten, erfolgte zusätzlich die Färbung von nicht infizierten Caco-2/BBE 1-Zellen, welche vollständig zu Monolayern ausdifferenziert und polarisiert waren.

Die in Abbildung 24 gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen des Monolayers aus Caco-2/BBE 1 Epithelzellen geben einen Überblick über die Veränderungen der Tight Junctions durch eine Infektion mit verschiedenen *Salmonella*-Stämmen. Nicht infizierte Zellen wiesen eine klar definierte und ununterbrochene Anordnung des Tight Junction-Proteins ZO-1 auf, welches die gesamte Epithelzelle ringförmig umschließt (Abbildung 24A). Außerdem waren die Zellkerne deutlich ausgeprägt und regelmäßig angeordnet. Nach der Infektion mit S. T. SL1344 war diese geordnete Struktur größtenteils zerstört. Einzelne Zellen waren in ihrem Verbund noch teilweise von ZO-1 umgeben, wogegen jedoch viele unterbrochene Bereiche das Aufbrechen der Tight Junction und damit die Zerstörung des Monolayers aufzeigten. Außerdem konnte eine Verkleinerung des Zellvolumens durch die Infektion mit S. T. SL1344 beobachtet werden, was unter anderem durch kompaktere Zellkerne nachgewiesen werden konnte. Färbungen nach Infektionen mit S. I. 119944 und S. I. 335-3 zeigten untereinander vergleichbare Ergebnisse: Hier waren noch größere zusammenhängende Bereiche des ZO-1 zu erkennen und vereinzelt Stellen, an welchen die Tight Junctions bereits aufgebrochen wurden (Abbildung 24B). Dennoch konnte auch hier eine Verkleinerung des Zellvolumens festgestellt werden.

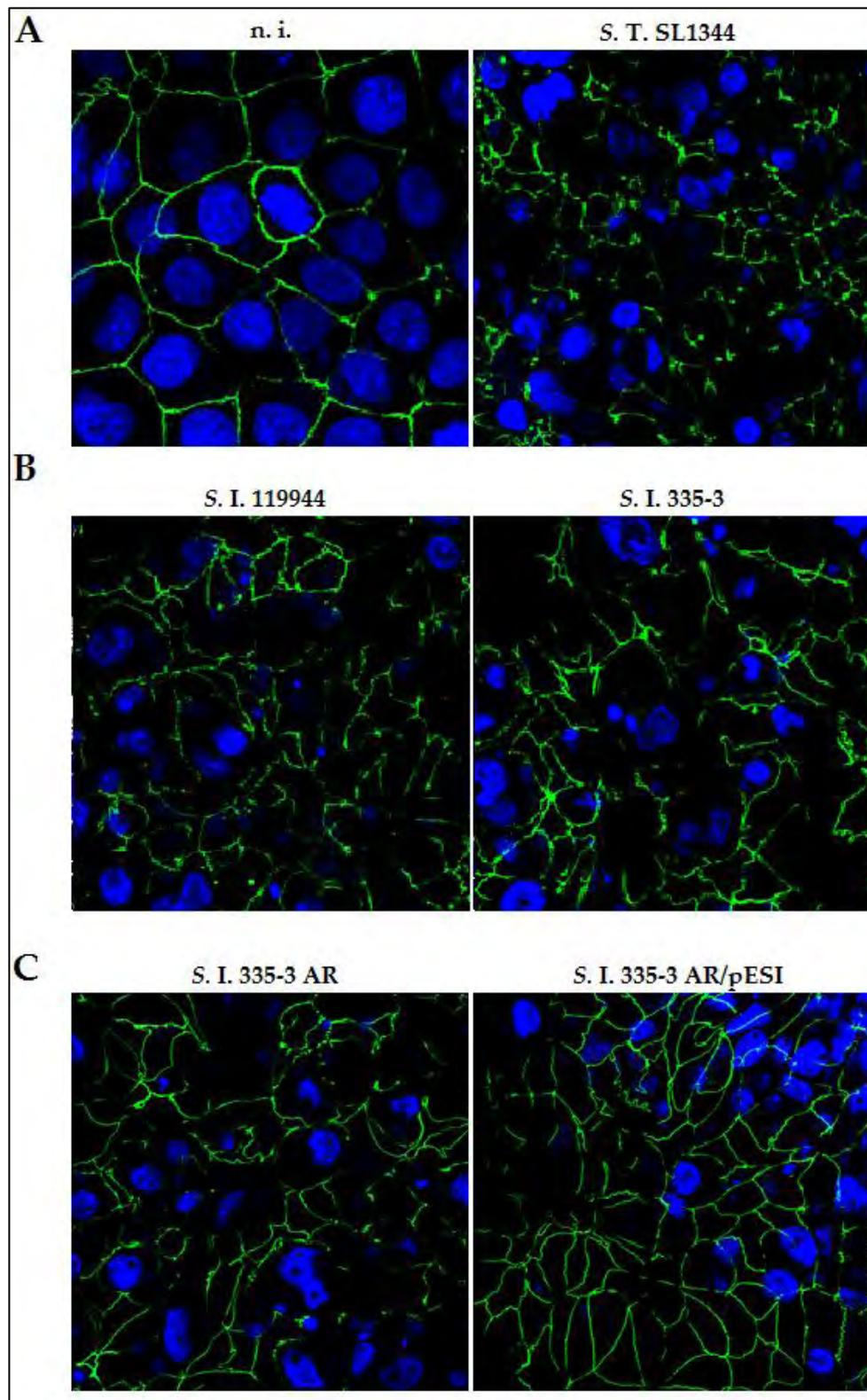


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbungen von ZO-1 nach 1,5 h-Infektionen mit *Salmonella*
 Neben (A) intakten Caco-2/BBe 1-Monolayern (n. i.) sind die Zerstörung der Tight Junction (TJ)-Strukturen nach einer Infektion mit *S. T. SL1344* als positive Kontrolle dargestellt. Infektion über 1,5 h mit (B) ursprünglichen *S. Infantis*-Isolaten *S. I. 119944* und *S. I. 335-3* und (C) mutierten Stämmen *S. I. 335-3 AR* und *S. I. 335-3 AR/pESI* zeigen die unterschiedlichen Veränderungen der TJ-Strukturen. Es ist jeweils eine repräsentative Aufnahme mit Färbungen von Zonula occludens-1 (grün) und den Zellkernen (blau) abgebildet. (originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 2)

4. Ergebnisse

Die Infektion mit den mutierten *S. I.*-Stämmen 335-3 AR und 335-3 AR/pESI ließ ebenfalls keine starke Schädigung des Monolayers erkennen (Abbildung 24C). Insbesondere die ZO-1 Strukturen nach einer Infektion mit *S. I.* 335-3 AR/pESI ähnelten denen von intakten Monolayern. Hier war die ringförmige Anordnung des Tight Junction-Proteins kaum unterbrochen. Dagegen konnten einige unterbrochene Stellen des ZO-1 durch *S. I.* 335-3 AR festgestellt werden.

4.3.1.3. Quantifizierung der bakteriellen Translokation

Neben der Charakterisierung des ausgebildeten Monolayers durch die Messung des TER, erfolgte die Bestimmung der bakteriellen Translokation durch die epitheliale Grenzschicht. Dazu wurden nach der Infektion durch die verschiedenen *Salmonella*-Stämme jeweils in einem Abstand von 30 min 100 µL Proben aus dem basalen Kompartiment der Transwell®-Platten entnommen und auf Platten mit LB-Agar und dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Dies ermöglichte die Bestimmung der translozierten Bakterien über einen Zeitraum von 1,5 h und zeigte den zeitlichen Verlauf der Translokation.

Versuche mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigten im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede der cfu-Daten (Abbildung 25A). Bereits nach 0,5 h wurde für *S. T.* SL1344 ein mittlerer Wert von $7 * 10^2$ cfu/mL festgestellt, welcher nach 1 h bei $4 * 10^3$ cfu/mL lag und nach 1,5 h den maximalen mittleren Wert von $1,7 * 10^5$ cfu/mL erreicht hatte. Für *S. I.* 119944 wurde 0,5 h nach der Infektion ein mittlerer Wert von $1,1 * 10^2$ cfu/mL gezeigt. Nach einem stärkeren Anstieg der Keimzahlen innerhalb der nächsten 30 min wurde keine weitere Zunahme der bakteriellen Last und maximal $4,3 * 10^3$ cfu/mL nach einer 1,5 h-Infektion mit *S. I.* 119944 festgestellt. Obwohl das frühere *S. I.*-Isolat 335-3 nach 0,5 h mit *S. T.* SL1344 vergleichbar hohe cfu-Daten aufwies, konnte auch hier nur eine geringe Zunahme der insgesamt translozierten Pathogene über die Versuchsdauer von 1,5 h festgestellt werden, welche in einem mittleren Wert von $1,6 * 10^5$ cfu/mL resultierte.

4. Ergebnisse

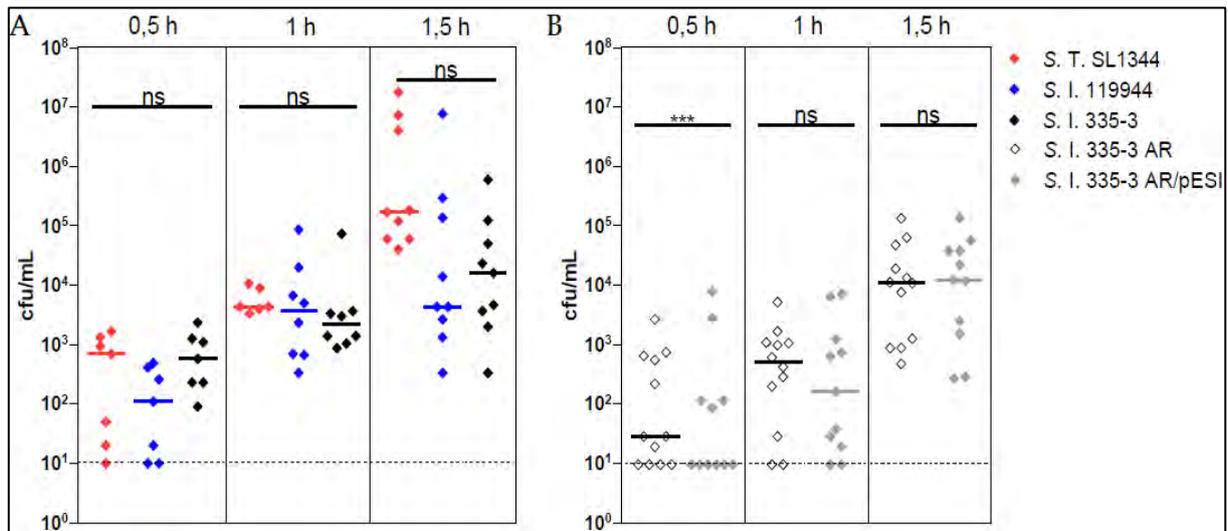


Abbildung 25: Bakterielle Translokation durch eine epitheliale Barrierschicht nach 1,5 h-Infektionen mit *Salmonella*

Die Bestimmung der cfu-Werte aus dem basalen Kompartiment eines Transwells[®] ermöglichen die Charakterisierung der bakteriellen Translokation nach apikaler Infektion eines intakten Caco-2/BBE 1-Monolayers. Es wurden Versuche mit (A) den ursprünglichen und (B) den mutierten *Salmonella*-Stämmen durchgeführt. Dargestellt ist jeweils der Median von 6 bis 13 Wells und die Nachweisgrenze (gestrichelte Linie).

Signifikanztest: (A) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey's Posttest, (B) Student's t-Test)

Versuche mit den mutierten *S. Infantis*-Stämmen ließen zum frühen Zeitpunkt von 0,5 h stark signifikante Unterschiede der ermittelten Keimzahlen erkennen (Abbildung 25B). Nach 0,5 h konnten im Mittel 30 cfu/mL des Plasmid-freien *S. I. 335-3 AR* nachgewiesen werden, wogegen der Plasmid-tragende Stamm *S. I. 335-3 AR/pESI* zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte und im Mittel unter der Nachweisgrenze lag. Nach 1 h Infektionsdauer wurden für beide Stämme Werte zwischen im Mittel $5,4 \cdot 10^2$ cfu/mL (*S. I. 335-3 AR*) und $1,7 \cdot 10^2$ cfu/mL (*S. I. 335-3 AR/pESI*) gezeigt, welche auch nach 1,5 h mit mittleren Werten um $1,2 \cdot 10^4$ cfu/mL keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Diese Daten zeigen, dass eine Infektion mit den ursprünglichen *Salmonella*-Stämmen nach 1,5 h keine signifikanten Unterschiede der bakteriellen Translokation aufwies. Die zwei *S. Infantis*-Stämme zeigten zum frühen 0,5 h-Zeitpunkt geringe Keimzahlen, welche über die Versuchsdauer um den ungefähren Faktor von 100 zunahm. Versuche mit den *S. Infantis*-Mutanten zeigten dagegen signifikante Unterschiede nach 0,5 h-Infektionen: Hier wurde festgestellt, dass die epitheliale

Grenzschicht schneller durch den Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR überwunden wurde. Mit zunehmender Infektionsdauer nahm die Zahl der translozierten Bakterien weiter zu, allerdings wurde zum späteren Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden mutierten *S. Infantis*-Stämmen nachgewiesen.

4.3.2. Versuche mit der Makrophagen-Zelllinie ANA-1

Nachdem die verwendeten murinen Makrophagen der Zelllinie ANA-1 zu mindestens 80 % konfluent gewachsen und überwiegend adhären waren, wurden diese in Multiwell-Platten ausgesät. Nach einer folgenden ü. N.-Kultivierung, wurde die Infektion mit den unterschiedlichen *Salmonella*-Stämmen durchgeführt.

4.3.2.1. Quantitative Bestimmung der intrazellulären und adhären Salmonellen

Die Analyse der Wirt-Pathogen-Interaktion erfolgte über eine Infektionsdauer von 24 h. Zur Quantifizierung der intrazellulären Salmonellen und deren Fähigkeit zur Replikation in Makrophagen wurde das Nährmedium nach 0,5 h Infektionszeit mit Gentamycin versetzt und die extrazellulären Salmonellen somit abgetötet.

Anschließend wurden die Makrophagen nach 0,5 h, 5,5 h und 23,5 h lysiert und das Lysat ausplattiert. Um die frühen Mechanismen der Infektion besser charakterisieren zu können, wurden die infizierten Makrophagen zusätzlich vor der Behandlung mit dem Antibiotikum lysiert und ausplattiert. Dies ermöglichte neben der Bestimmung der intrazellulären Salmonellen, eine zusätzliche Beurteilung der adhären Pathogene.

Die Infektionen mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigten zum frühen 0,5 h-Zeitpunkt die höchsten Keimzahlen (Abbildung 26A). Mit $1 \cdot 10^8$ cfu/mL wurden für S. T. SL1344 die meisten adhären und intrazellulären Salmonellen nachgewiesen. Dagegen ließen S. I. 119944 ($5,3 \cdot 10^7$ cfu/mL) und S. I. 335-3 mit $1,1 \cdot 10^7$ cfu/mL signifikant geringere Interaktionen mit den Makrophagen feststellen. Nach 1 h Infektionsdauer zeigten die beiden Isolate S. T. SL1344 und S. I. 119944 mit einem

4. Ergebnisse

mittleren Wert von $9,3 \cdot 10^6$ cfu/mL vergleichbare intrazelluläre Keimzahlen, wogegen für das frühe Isolat S. I. 335-3 nur $6,7 \cdot 10^5$ cfu/mL ermittelt wurden. Im weiteren Verlauf wurden steigende Keimzahlen für S. I. 119944 ermittelt, welche jedoch nach 24 h um den Faktor 10 reduziert vorlagen.

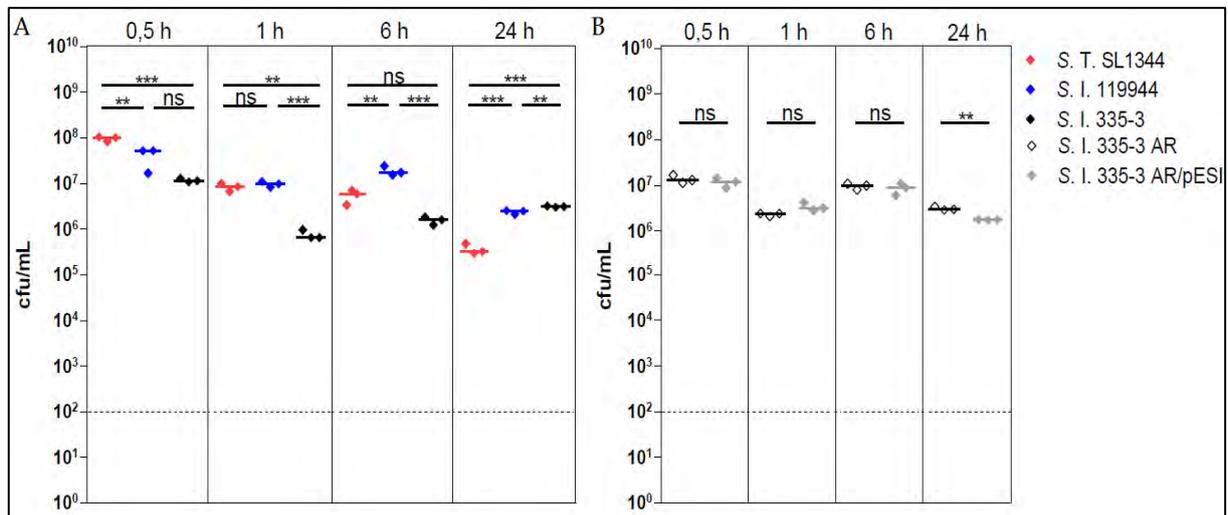


Abbildung 26: Salmonella infizieren Makrophagen und überleben intrazellulär

Die 24 h-Infektion der Zelllinie ANA-1 zeigt das Vermögen der Salmonellen sowohl durch aktive Mechanismen als auch passiv in Makrophagen einzudringen und sich intrazellulär zu vermehren. Es wurden Versuche mit (A) ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten und (B) zwei mutierten *S. Infantis*-Stämmen durchgeführt. Die höchsten Belastungen sind jeweils zum frühen 0,5 h-Zeitpunkt nachgewiesen worden, wogegen nach 24 h meist geringere invasive Keimzahlen ermittelt wurden. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen und die Mediane sowie die Nachweisgrenze eines repräsentativen Versuchs abgebildet (gestrichelte Linie).

(Signifikanztest: (A) One-Way ANOVA gefolgt von Tukey Posttest, (B) Student's t-Test)

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch für *S. T. SL1344* beobachtet: Während die intrazellulären Salmonellen nach 6 h vergleichbare Werte mit dem früheren Zeitpunkt (1 h) aufwiesen ($7,3 \cdot 10^6$ cfu/mL), wurde nach 24 h eine deutliche Abnahme der Bakterien auf Werte von $3 \cdot 10^5$ cfu/mL gezeigt. Dagegen wies das frühe Isolat *S. I. 335-3* über die Dauer des Versuchs geringfügig zunehmende Keimzahlen auf und ließ nach 24 h $3,3 \cdot 10^6$ cfu/mL feststellen.

Versuche mit den zwei mutierten *S. Infantis*-Stämmen zeigten 0,5 h nach der Infektion mit ca. $1,1 \cdot 10^7$ cfu/mL vergleichbar hohe adhärente und intrazelluläre Keimzahlen. Mit mittleren Werten von $2,5 \cdot 10^6$ cfu/mL war auch nach 1 h kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen festzustellen. Nach 6 h

4. Ergebnisse

Infektionsdauer war sowohl für den Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR, als auch für den Plasmid-tragenden Stamm S. I. 335-3 AR/pESI eine Replikation der intrazellulären Salmonellen festzustellen ($9 \cdot 10^6$ cfu/mL), welche wiederholt keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Stämmen aufzeigte. Dagegen wurde nach 24 h eine Reduktion der intrazellulären Bakterien nachgewiesen, welche im Vergleich mit S. I. 335-3 AR für S. I. 335-3 AR/pESI in signifikant geringeren Keimzahlen resultierte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl die ursprünglichen als auch die mutierten *Salmonella*-Stämme in Makrophagen invadierten und intrazellulär überlebten bzw. sich replizierten. Vergleiche zwischen dem neu aufkommenden Isolat S. I. 119944 und dem frühen Isolat S. I. 335-3 zeigten, dass S. I. 119944 0,5 - 6 h nach der Infektion höhere intrazelluläre Keimzahlen aufwies, welche nach 24 h allerdings abnahmen und S. I. 335-3 eine stetige Zunahme der intrazellulären Bakterien über die Versuchsdauer feststellen ließ. Die mutierten *S. Infantis*-Stämmen zeigten innerhalb der ersten 6 h keine signifikanten Unterschiede. Nach 24 h wurde eine signifikant stärkere Besiedlung durch den Plasmid-freien Stamm S. I. 335-3 AR gemessen. Dies lässt vermuten, dass die zwischen dem frühen Isolat S. I. 335-3 und dem neu aufkommenden Isolat S. I. 119944 beobachteten Unterschiede nicht durch auf dem Virulenzplasmid kodierte Faktoren, sondern durch Faktoren auf chromosomaler Ebene kodiert sind.

4.3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung von infizierten Makrophagen (Inside-Outside Staining)

Zur Visualisierung und Differenzierung von intrazellulären und adhärenen Salmonellen, wurden die infizierten Makrophagen zu jedem genannten Zeitpunkt fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden neben den Zellkernen (blau), die Aktin-Filamente durch Phalloidin (weiß) und die extrazellulären Salmonellen (grün) bzw. die intrazellulären Salmonellen (rot) gefärbt.

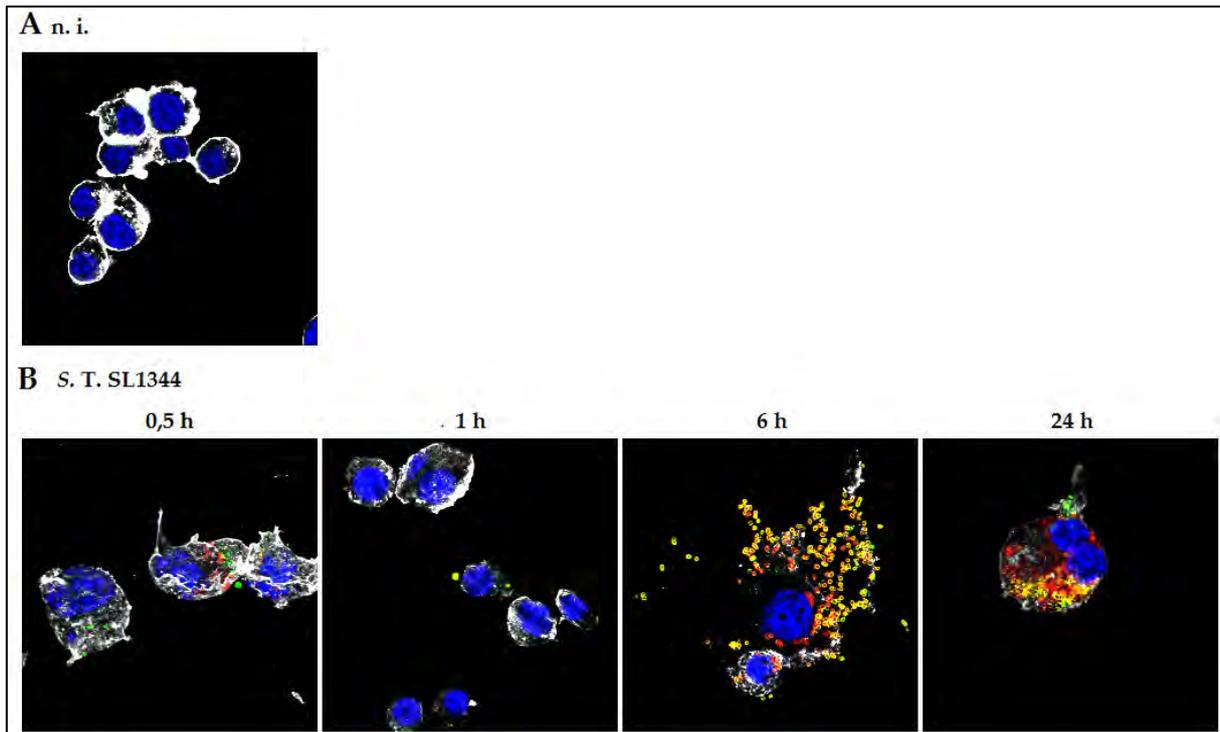


Abbildung 27: Inside-Outside Staining von mit S. T. SL1344 infizierten und nicht infizierten ANA-1 Makrophagen

Im Vergleich zu (A) nicht infizierten Makrophagen, kann durch das Anfärben extra- und intrazellulärer Salmonellen die Wirt-Pathogen-Interaktion nach einer (B) Infektion von ANA-1 Makrophagen mit S. T. SL1344 visualisiert werden. Die Salmonellen können sehr gut in die Zellen eindringen und sich dort intrazellulär vermehren, bis die Zellen durch Apoptose zerstört werden. Es ist jeweils eine repräsentative Aufnahme mit Färbungen von extrazellulären (grün) bzw. intrazellulären Salmonellen (rot), den Zellkernen (blau) und den Aktin-Filamenten (weiß) abgebildet. (originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 3)

Um einen Vergleich zu nicht infizierten ANA-1 Makrophagen zu erhalten wurden diese zusätzlich, wie in Abbildung 27A dargestellt, angefärbt. Außerdem erfolgte die Färbung von Infektionen mit S. T. SL1344 als positive Kontrolle, welche zusätzlich in Abbildung 27B dargestellt ist. Zum frühen Zeitpunkt von 0,5 h wurden einzelne extra- und intrazelluläre Salmonellen nachgewiesen, wogegen nach 1 h kaum noch Salmonellen visualisiert werden konnten, was allerdings durch Fehler während der Färbung bedingt sein kann. Nach 6 h waren zahlreiche Salmonellen zu erkennen, welche teilweise zur Zerstörung der Makrophagen führten und auch zum 24 h-Zeitpunkt in sehr hohen Zahlen zur intrazellulären Replikation befähigt waren.

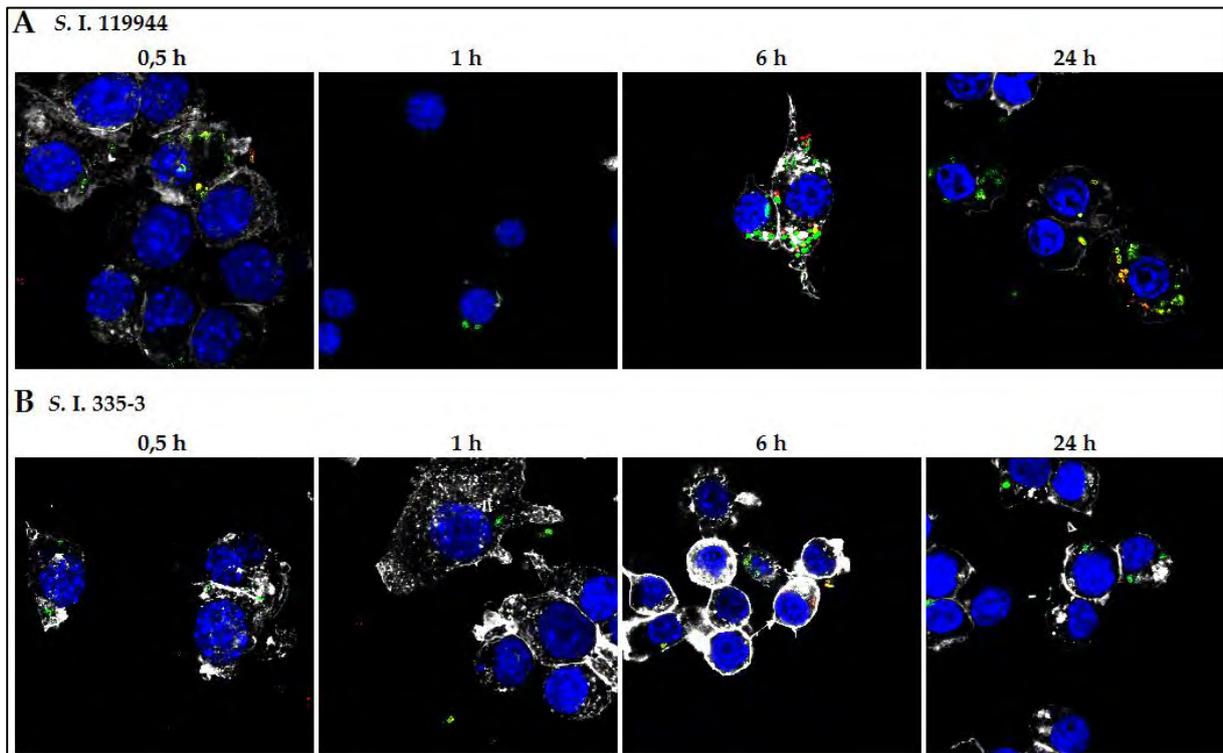


Abbildung 28: Inside-Outside Staining von ANA-1 Makrophagen nach Infektionen mit den ursprünglichen *S. Infantis*-Isolaten

Infektionen von ANA-1 Makrophagen mit (A) *S. I.* 119944 und (B) *S. I.* 335-3 zeigen geringe intrazelluläre Belastungen zu allen untersuchten Zeitpunkten. Dennoch wurden im direkten Vergleich größere Ansammlungen invasiver Salmonellen nach Infektionen mit dem neu aufkommenden Isolat *S. I.* 119944 festgestellt. Es ist jeweils eine repräsentative Aufnahme mit Färbungen von extrazellulären (grün) bzw. intrazellulären Salmonellen (rot), den Zellkernen (blau) und den Aktin-Filamenten (weiß) abgebildet. (originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 3)

Infektionen mit den zwei ursprünglichen *S. Infantis*-Isolaten 119944 und 335-3 zeigten im Vergleich zu *S. Typhimurium* nur sehr geringe Belastungen durch intrazelluläre Salmonellen (Abbildung 28). Dennoch wurden im direkten Vergleich beider *S. Infantis*-Stämme größere Ansammlungen intrazellulärer Bakterien für das neu aufkommende Isolat *S. I.* 119944 nach 0,5 h, 6 h und 24 h festgestellt (Abbildung 28B). Färbungen von Makrophagen nach Infektionen mit den zwei mutierten *S. Infantis*-Stämmen zeigten ebenfalls nur geringe intrazelluläre Salmonellen. Jedoch schien der Plasmid-tragende Stamm *S. I.* 335-3 AR/pESI in höherer Keimzahl und vorwiegend adhärent an den Makrophagen zu haften (Abbildung 29B).

4. Ergebnisse

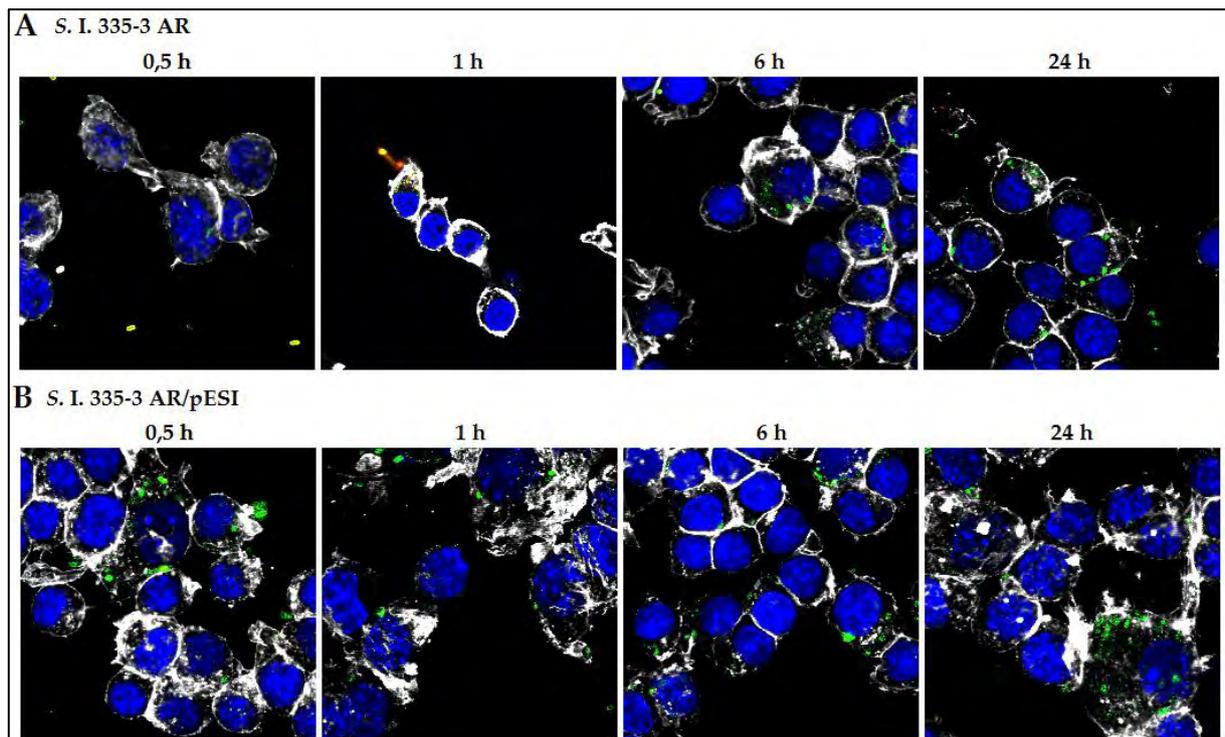


Abbildung 29: Inside-Outside Staining von ANA-1 Makrophagen nach Infektionen mit den mutierten *S. infantis*-Isolaten

Infektionen von ANA-1 Makrophagen mit (A) *S. I. 335-3 AR* und (B) *S. I. 335-3 AR/pESI* zeigen geringe intrazelluläre Belastungen zu allen untersuchten Zeitpunkten, wobei *S. I. 335-3 AR/pESI* nach 0,5 h vermehrt adhärenz zu sein scheint. Es ist jeweils eine repräsentative Aufnahme mit Färbungen von extrazellulären (grün) bzw. intrazellulären Salmonellen (rot), den Zellkernen (blau) und den Aktin-Filamenten (weiß) abgebildet. (originaler Vergrößerungsfaktor: 630, Zoom-Faktor: 3)

5. Diskussion

Die Virulenz eines Pathogens beschreibt dessen Fähigkeit, nach der Infektion des jeweiligen Wirtsorganismus eine Krankheit auszulösen. Dabei wird die Virulenz durch zahlreiche Virulenzfaktoren bedingt, welche je nach Ausprägung unterschiedliche Krankheitsmerkmale und -verläufe verursachen können.

Epidemiologische Untersuchungen zur Entwicklung der lokalen NTS-Infektionen in Israel haben gezeigt, dass ein erneuter Anstieg der gemeldeten Fallzahlen mit dem gesteigerten Aufkommen des Serovars *S. Infantis* gegenüber der Gesamtzahl aller *Salmonella*-Isolate verbunden war (Gal-Mor *et al.*, 2010). Durch weiterführende Studien wurde belegt, dass das dominante Auftreten dieses Serovars in der lokalen Verbreitung eines einzelnen Klons begründet war, welcher über ein bis dahin unbekanntes Virulenzplasmid (engl.: „plasmid of emerging *S. Infantis*“ - pESI) verfügt (Aviv *et al.*, 2013). Um zu untersuchen, ob die auf dem Plasmid kodierten Faktoren zur stärkeren Pathogenität des neu aufkommenden Isolats beitragen, wurde pESI in eine Azid-resistente Mutante eines frühen Isolats (*S. I.* 335-3 AR) eingebracht und in dieser Arbeit neben vergleichenden Untersuchungen mit einem frühen Isolat *S. I.* 335-3 (1970 isoliert) und einem neu aufkommenden Isolat *S. I.* 119944 (2008 isoliert), zusätzliche Versuche mit dem Plasmid-tragenden Stamm *S. I.* 335-3 AR/pESI und dem Plasmid-freien Stamm *S. I.* 335-3 AR durchgeführt.

5.1. Eigenschaften des Virulenzplasmids pESI

Das Virulenzplasmid pESI hat eine ungefähre Größe von ca. 280 kb, ist durch Konjugation übertragbar und wurde in dieser Form vorher noch nicht beschrieben (Gal-Mor *et al.*, 2010; Aviv *et al.*, 2013). Neben zusätzlichen Antibiotika-Resistenzen gegen z. B. Tetracyclin, kodiert pESI für das Siderophor Yersiniabactin und für Gene, welche eine höhere Toleranz gegenüber oxidativen Stressfaktoren wie z. B. H₂O₂ bewirken. Der Erwerb von *tet*-Genen durch die Konjugation von mobilen Plasmiden, Transposons oder Integrons (Mendez *et al.*, 1980), wurde ebenfalls für andere *Salmonella enterica* Serovare beschrieben (Pezzella *et al.*, 2004). Yersiniabactin stellt ein

Eisentransportsystem dar, welches als Virulenzfaktor von *Yersinia* in Mäusen die Replikation des Pathogens unterstützt (Aviv *et al.*, 2013; Haag *et al.*, 1993). Außerdem kodiert pESI für zwei unterschiedliche Pili, welche neben der Biofilmbildung, die Adhäsion von Pathogenen und die Infektion der Wirtszelle unterstützen (Thanassi *et al.*, 2012). Die verstärkte Pathogenität von *S. Infantis* durch den Erwerb von pESI wurde bereits in ersten Versuchen *in vitro* gezeigt, in welchen eine verbesserte Biofilmbildung, sowie die effektivere Invasion in Wirtszellen im Vergleich mit einem Plasmid-freien *S. Infantis*-Stamm festgestellt wurde (Aviv *et al.*, 2013).

Allgemein tragen Plasmide extrachromosomale Informationen und bieten den Wirtsorganismen (Bakterien) häufig Selektionsvorteile, indem sie für unterschiedliche Virulenzfaktoren kodieren (Carattoli, 2011). *Salmonella* verfügt über heterogene Virulenzplasmide, welche jedoch alle für *spv*-Gene kodieren und damit die intrazelluläre Replikation des Pathogens ermöglichen (Rotger und Casadesús, 1999).

5.2. *In vivo*-Virulenz von *S. Infantis* im Mausmodell

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde das etablierte Colitis-Modell mit Streptomycin-vorbehandelten Mäusen verwendet. Durch die Gabe des Antibiotikums 24 h vor der Infektion mit *Salmonella* wurde die intestinale Mikrobiota abgeschwächt und eine bessere Kolonisierung des Pathogens im Darm mit einer einhergehenden Entzündung des Caecums nachgewiesen (Barthel *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen die verstärkte Pathogenität *in vivo* des neu auftretenden Isolats S. I. 119944 gegenüber dem frühen Isolat S. I. 335-3 und die Verstärkung der Virulenz durch den Erwerb des Virulenzplasmids pESI.

5.2.1. pESI verstärkt die intestinale Besiedlung und systemische Belastung

Infektionen von C57BL/6-Mäusen mit *Salmonella* führten für die untersuchten Infektionszeiträume (24 h und 96 h) zur Besiedlung intestinaler Gewebe wie Caecum, Colon und Ileum. In der Literatur angegebene Keimzahlen für *S. Typhimurium*, welcher als positiver Colitis-induzierender Kontrollorganismus diente, entsprechen

den in diesen Versuchen ermittelten Werten (Barthel *et al.*, 2003). Dies spricht für die Anwendung des zu Grunde liegenden Tiermodells und ermöglichte die weitere Analyse der Virulenz von *Salmonella in vivo*.

Die murine Mikrobiota, welche unter anderem durch das lokale Nährstoffangebot und das Immunsystem des Wirts beeinflusst wird, zeigt bei gesunden Tieren Abwehrmechanismen gegenüber invadierenden Pathogenen, welche auch als „Kolonisierungs-Resistenz“ bezeichnet wird (Stecher *et al.*, 2007). Die einmalige Gabe von Streptomycin bewirkt die kurzzeitige Reduktion der Mikrobiota und stört den natürlichen Schutzmechanismus. Dies ermöglicht die Kolonisierung von *S. Typhimurium* im Darm der Mäuse und verursacht vorwiegend in Caecum und Colon eine Keimlast um 10^9 cfu (Barthel *et al.*, 2003), wie sie auch in der vorliegenden Arbeit nach 24 h-Infektionen für alle verwendeten ursprünglichen *Salmonella*-Isolate gezeigt wurde. Die Besiedlung des Darms durch *Salmonella* induziert intestinale Entzündungsreaktionen, welche das Wachstum der wirtsspezifischen Mikrobiota einschränken und somit das fortschreitende Wachstum des Pathogens fördern (Stecher *et al.*, 2007). Versuche mit einer Infektionsdauer von 96 h zeigten die durchgehend dominante Kolonisierung durch *S. T. SL1344*, wogegen die Keimlast der *S. Infantis*-Stämme *S. I. 119944* und *S. I. 335-3* in allen intestinalen Bereichen reduziert war. Auf Grund der beschriebenen Konkurrenz zwischen *Salmonella* und der wirtseigenen Mikrobiota deutet die Abnahme der *S. Infantis*-Keime auf eine Rückbesiedlung durch die wirtseigene Mikrobiota und die Unterdrückung des Pathogens hin. Andererseits ist es den invadierten Salmonellen möglich, durch T3SS1 aktiv in Epithelzellen einzudringen, die epitheliale Barriere durch das Aufbrechen der Tight Junctions zu überwinden und somit in anderen Organen zu kolonisieren (Raffatellu *et al.*, 2005; Sasakawa, 2009). Die erhobenen Daten ließen geringe Besiedlungen des mLK, der Milz und der Leber 24 h nach der Infektion durch alle ursprünglichen *Salmonella*-Isolate feststellen und zeigten auch hier die dominante Stellung von *S. T. SL1344*, welches die höchsten Keimzahlen im mLK und der Leber im Vergleich mit *S. I. 119944* und *S. I. 335-3* aufzeigte. Diese Ergebnisse zeigen die geringere Pathogenität der *S. Infantis*-Isolate im Vergleich zu *S. Typhimurium*, welches nach chronischen Infektionen eine

konstant hohe Keimlast in intestinalen Geweben und systemischen Organen wie der Milz aufweist (Grassl *et al.*, 2008). Dennoch wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass das neu aufkommende Isolat S. I. 119944 im Vergleich zum frühen Isolat S. I. 335-3 zum frühen Zeitpunkt der Infektion stärker im Caecum kolonisiert und eine höhere Keimlast in den systemischen Organen aufweist. Dies deutet darauf hin, dass das neu aufkommende Isolat über verbesserte Fähigkeiten zur Überwindung der epithelialen Barriere und anschließenden Replikation in den systemischen Organen (vorzugsweise im mLK) verfügt.

Anschließende Experimente zur Untersuchung des Einflusses von pESI zeigten nach 24 h die verstärkte Besiedlung des Darms durch den Plasmid-tragenden Stamm S. I. 335-3 AR/pESI und die signifikant höhere Belastung der Milz. Dies spricht für ein verbessertes Besiedlungsverhalten des neu aufkommenden *S. Infantis*-Isolats S. I. 119944 durch den Erwerb des Virulenzplasmids pESI.

5.2.2. pESI verstärkt den Schweregrad der intestinalen Entzündung

Nachdem die Kolonisierung der *Salmonella*-Stämme in allen untersuchten Darmabschnitten nachgewiesen wurde, erfolgte die Beurteilung der induzierten intestinalen Entzündung.

Eine Infektion mit *S. Typhimurium* verursacht starke Entzündungen im murinen Caecum, welche unter anderem durch ausgeprägte submukosale Ödeme, Verlängerungen und Zerstörungen der Krypten-Strukturen, einer reduzierten Anzahl von Goblet-Zellen, Abschilferungen des Oberflächenepithels und einer massiven Infiltration von PMN in die Submukosa charakterisiert sind (Barthel *et al.*, 2003; Suar *et al.*, 2006). Außerdem zeigten infizierte Tiere eine gestörte Stuhlbildung, welche sich zumeist durch sehr wässrigen Stuhl oder die vollständige Entleerung des Colons äußerte. Durch das massive Zusammenschrumpfen des Caecums in Folge einer Salmonellen-Infektion, konnte die induzierte Entzündung zusätzlich durch das Gewicht des entzündeten Caecums beurteilt werden (Barthel *et al.*, 2003; Grassl *et al.*, 2008).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionen mit den ursprünglichen *Salmonella*-Isolaten zeigten die stärksten histopathologischen Veränderungen nach 24 h und 96 h nach einer Infektion mit S. T. SL1344. Parallel zu den Ergebnissen des intestinalen Besiedlungsverhaltens wurden zum frühen Infektionszeitpunkt entzündliche Veränderungen des caecalen Gewebes nach Infektionen mit dem neu aufkommenden Isolat S. I. 119944 im Vergleich zu frühen Isolat S. I. 335-3 festgestellt, welche jedoch nach einer längeren Infektionsdauer bereits abgeklungen waren und für eine milder verlaufende intestinale Entzündung gegenüber Infektionen mit *S. Typhimurium* sprechen.

Vergleichende Untersuchungen zwischen S. I. 335-3 AR und S. I. 335-3 AR/pESI zeigten, dass 24 h-Infektionen durch den Plasmid-tragenden Stamm histopathologische Veränderungen im Caecum hervorriefen, während der Plasmid-freie Stamm nur geringe bzw. keine entzündlichen Merkmale aufwies. Die durch pESI kodierten Pili können als mögliche Ursache für eine verbesserte Adhäsion und Invasion in die Epithelzellen, die schneller eintretende Entzündungsreaktion durch das neu aufkommende *S. Infantis*-Isolat S. I. 119944 begründen (Aviv *et al.*, 2013).

5.2.3. pESI verursacht die massive Hochregulation proinflammatorischer Zytokine

Die Infektion von Epithelzellen mit *Salmonella* führt zu einer schnell ansteigenden Produktion von chemotaktischen Zytokinen, welche vor allem zu Rekrutierungen von PMNs und Makrophagen führen. Der Kontakt zwischen Makrophagen und *Salmonella* induziert unter anderem die Hochregulation der Zytokine TNF- α , IL-6 und MCP-1 (Eckmann und Kagnoff, 2001). Auch die Expression von IFN- γ durch T-Helferzellen ist essentiell für die Bekämpfung von *Salmonella*, da es die Synthese von bakteriziden Substanzen zur Bekämpfung des Pathogens triggert und die Fähigkeiten der Makrophagen zur intrazellulären Zerstörung von *S. Typhimurium* verstärkt (Thiennimitr *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass vor allem zum frühen Infektionszeitpunkt eine starke Hochregulation des Zytokins IFN- γ für S. T. SL1344 und S. I. 119944 nachweisbar war. Dies wurde durch bereits bestehende Literatur bestätigt, in welcher die massive Hochregulation von IFN- γ nach

Infektionen mit *S. Typhimurium in vivo* beschrieben wurde (Godinez *et al.*, 2008).

Außerdem wurde gezeigt, dass nach Infektionen mit dem neu aufkommenden Isolat S. I. 119944 vor allem die Genexpression von IL-6 und MCP-1 hochreguliert wurde, wogegen diese für das frühe Isolat S. I. 335-3 deutlich geringer ausfiel.

Auch hier konnte der Einfluss durch pESI gezeigt werden, indem Infektionen mit dem Plasmid-tragend Stamm S. I. 335-3 AR/pESI unter anderem zu massiven Hochregulationen von IL-6 und dem Chemokin MCP-1 führten, während der Plasmid-freie Stamm S. I. 335-3 AR kaum nachweisbar erhöhte Expressionslevel verursachte.

5.3. *In vitro*-Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen

5.3.1. pESI nimmt keinen Einfluss auf die bakterielle Translokation durch die epitheliale Barrierschicht

Versuche mit Epithelzellen der humanen Zelllinie Caco-2/BBE 1 zeigten nach *Salmonella*-Infektionen eines dichten Monolayers mit intakten Tight Junction-Strukturen, eine Abnahme des charakteristischen TER-Wertes. Der TER kennzeichnet die Permeabilität des Monolayers und wird durch Ausprägung intakter oder zerstörter Tight Junctions direkt beeinflusst, indem diese die parazelluläre Barriere bilden (Sambuy *et al.*, 2005). So zeigt die Abnahme des TER die Zerstörung der Tight Junctions als Folge einer Infektion, welche insbesondere durch *S. Typhimurium* sehr deutlich gezeigt wurde. Die aktive Invasion von *Salmonella* durch T3SS1 bewirkt eine Umstrukturierung des Zytoskeletts der Wirtszelle und das Aufbrechen der Tight Junctions, was wiederum zu einer gesteigerten parazellulären Translokation des Pathogens beiträgt (Raffatellu *et al.*, 2005). Auch andere Pathogene wie beispielsweise *E. coli* vermögen Tight Junctions durch die Aktivierung einer GTPase zu zerstören und dringen somit in die Epithelschicht ein (Sasakawa, 2009). Versuche mit dem neu aufkommenden Isolat S. I. 119944 und dem frühen Isolat S. I. 335-3 zeigten ebenfalls die lokale Zerstörung von Tight Junction Strukturen, wobei Infektionen mit S. I. 119944 die höhere Permeabilität des Monolayers auf Grund geringfügig stärkerer Reduktionen der TER-Werte aufzeigten. Allerdings konnte kein Einfluss des Plasmids gezeigt werden, was eventuell vermuten lässt, dass *S. Infantis*-Stämme

längere Infektionsphasen benötigen um eine charakteristische Abnahme des TER zu bewirken.

5.3.2. pESI hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation in Makrophagen

Neben passiven Mechanismen, welche die Aufnahme von *Salmonella* mittels Phagozytose in Makrophagen bewirken, können Salmonellen auch aktiv in Makrophagen invadieren und sind zur intrazellulären Replikation befähigt.

Die durch das T3SS1 erleichterte Invasion in die Wirtszelle, fördert gleichzeitig die Bildung von SCVs (engl.: „*Salmonella*-containing vacuoles“). Zum intrazellulären Überleben und der Replikation der Salmonellen trägt das T3SS2 bei. Die Induktion von Effektorproteinen durch T3SS2 sichert die Integrität der SCVs und unterbindet den Kontakt mit Schutzmechanismen der Wirtszelle (Hautefort *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten *Salmonella*-Stämme in Makrophagen invadierten und intrazellulär überlebten bzw. sich replizierten. Die bestehende Literatur zeigte auf der einen Seite, dass Infektionen von Makrophagen mit *S. Typhimurium* innerhalb der ersten 4 h zu höheren intrazellulären Keimzahlen durch passive Aufnahme und aktive Invasion im Vergleich zu *S. Infantis* führten. Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass *S. Infantis* nach 24 h-Infektionen deutlich höhere intrazelluläre Replikationsraten im Vergleich zu *S. Typhimurium* aufwies (Volf *et al.*, 2010). Außerdem wurde beschrieben, dass sich *S. Typhimurium* sehr gut an die intrazellulären Bedingungen von Monozyten adaptieren kann (Donné *et al.*, 2005).

Beide Aussagen können durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt werden. Infektionen mit *S. T. SL1344* zeigten zum frühen Zeitpunkt die höchsten adhärennten und intrazellulären Keimzahlen, gefolgt vom neu aufkommenden Isolat *S. I. 119944* und dem frühen Isolat *S. I. 335-3*. Während durch *S. T. SL1344* mit stetig abnehmenden intrazellulären Keimzahlen keine Replikation in Makrophagen nachgewiesen werden konnte, zeigte *S. I. 119944* nach einer geringen Zunahme der intrazellulären Keime ebenfalls eine Reduktion der intrazellulären Belastung nach 24 h,

wogegen *S. I. 335-3* zu einer sehr geringfügigen intrazellulären Replikation befähigt war.

Die Auswertung dieser Ergebnisse muss allerdings mit Hinblick auf die durch *Salmonella* induzierte Pyroptose vorgenommen werden. Die aktive Invasion in eine Wirtszelle (Makrophage) wird durch die Translokation von Effektorproteinen durch T3SS1 unterstützt, welche durch das Einbringen von PrgJ und Flagellin begleitet wird. Diese beiden Strukturproteine werden durch NLRC4 erkannt und führen über die Bildung eines Inflammasoms zur Aktivierung von Caspase-1, welches als Bestandteil der Apoptose-Signalkaskade zu einem proinflammatorischen Zelltod der Makrophagen führt (de Jong *et al.*, 2012; Thiennimitr *et al.*, 2012). Mit Hinblick auf diesen Mechanismus, kann die stetige Reduktion der intrazellulär nachweisbaren Keime nach Infektionen mit *S. T. SL1344 in vitro* erklärt werden. Aufgrund der induzierten Pyroptose sterben die Makrophagen ab und setzen die Salmonellen wieder ins umgebende Medium frei. Danach können die freigesetzten Salmonellen erneut Makrophagen infizieren oder verbleiben aber im Medium. Verbleiben die Salmonellen im Zellkulturmedium, werden sie für die weitere Analyse der intrazellulären Keime nicht berücksichtigt und sind somit nicht mehr nachweisbar. Für diese Begründung spricht außerdem, dass für Makrophagen nach einer 24 h-Infektion mit *S. T. SL1344 in vitro* kein Farbumschlag (rot zu gelb) des Zellkulturmediums festgestellt werden konnte und dies ein weiteres Indiz für das massive Absterben der Zellen ist.

Zusätzliche Versuche zur Beurteilung des Einflusses des Plasmids zeigten, mit Ausnahme des späten 24 h-Zeitpunktes, keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Plasmid-freien und dem Plasmid-tragenden *S. Infantis*-Isolat. Dies lässt vermuten, dass die zwischen dem frühen Isolat *S. I. 335-3* und dem neu aufkommenden Isolat *S. I. 119944* beobachteten Unterschiede nicht durch auf dem Virulenzplasmid kodierte Faktoren, sondern durch Faktoren auf chromosomaler Ebene kodiert sind.

6. Zusammenfassung

Epidemiologische Studien zu Untersuchungen der Entwicklungen von nicht typhoiden *Salmonella*-Infektionen in Israel zwischen 1995 und 2009 haben gezeigt, dass nach einer Phase mit stetig abnehmenden Fallzahlen ab 2006 ein erneuter Anstieg der Inzidenz zu beobachten war. Diese Zunahme der NTS-Infektionen wurde durch den parallelen Anstieg des Serovars *S. Infantis* begleitet, dessen Virulenz in dieser Arbeit untersucht wurde. Vorangegangene Studien zeigten, dass das erneute Aufkommen dieses Serovars durch die lokale Verbreitung eines einzelnen Klons begründet war, welcher über ein bis dahin unbekanntes Virulenzplasmid verfügt – pESI.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Versuche zur Virulenz eines frühen *S. Infantis*-Isolats S. I. 335-3 und eines neu aufkommenden *S. Infantis*-Isolats S. I. 119944 durchgeführt und der Einfluss des erworbenen Virulenzplasmids im gleichen bakteriellen Hintergrund untersucht.

Zur Charakterisierung der Interaktion von *Salmonella* mit dem Gesamtorganismus von Mäusen erfolgten zum einen *in vivo*-Versuche unter Anwendung des Colitis-Modells mit Streptomycin-vorbehandelten Mäusen. Außerdem wurden *in vitro*-Infektionen von Epithelzellen und Makrophagen durchgeführt, um die Prozesse der frühen und späten Phase der Infektion besser beschreiben zu können.

Die Ergebnisse zeigten, dass *in vivo* der Einfluss des Virulenzplasmids pESI durch ein verbessertes intestinales und systemisches Besiedlungsverhalten, sowie durch histopathologische Veränderungen auf Grund einer induzierten Colitis und einer gesteigerten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nachweisbar war. *In vitro*-Versuche zeigten dagegen keine verstärkte Pathogenität durch den Einfluss des Virulenzplasmids, was jedoch durch die limitierte Versuchsdauer begründet sein kann.

7. Literatur

- Alvarez-Hernandez X., Nichols G. M., Glass J.** (1991) „Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers“, *Biochimica et Biophysica Acta* 1070, 205-208
- Aviv G., Tsyba K., Steck N., Salmon-Divon M., Cornelius A., Rahav G., Grassl G. A., Gal-Mor O.** (2013) „A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain“, *Environmental Microbiology*
- Barthel M., Hapfelmeier S., Quintanilla-Martínez L., Kremer M., Rohde M., Hogardt M., Pfeffer K., Rüssmann H., Hardt W.-D.** (2003) „Pretreatment of mice with Streptomycin provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model that allows analysis of both pathogen and host“, *Infection and Immunity*, Vol. 71, No. 5, 2839-2858
- Blasi E., Mathieson B. J., Varesio L., Cleveland J. L., Borchert P. A., Rapp U. R.** (1985) „Selective immortalization of murine macrophages from fresh bone marrow by a *raf/myc* recombinant murine retrovirus“, *Nature* 318, 667-670
- Blasi E., Radzioch D., Durum S. K., Varesio L.** (1987) „A murine macrophage cell line, immortalized by *v-raf* and *v-myc* oncogenes, exhibits normal macrophage functions“, *European Journal of Immunology*, Vol. 17, 1491-1498
- Bolton A. J., Osborne M. P., Stephen J.** (2000) „Comparative study of the invasiveness of *Salmonella* serotypes Typhimurium, Choleraesuis and Dublin for Caco-2 cells, HEP-2 cells and rabbit ileal epithelia“, *Journal of medical microbiology*, Vol. 49, 503-511
- Carattoli A.** (2011) „Plasmids in gram-negatives: Molecular typing of resistance plasmids“, *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 301, 654-658
- Carter P. B., Collins F. M.** (1974) „The route of enteric infection in normal mice“, *The Journal of experimental medicine*, Vol. 139, 1189-1203
- Coburn B., Grassl G. A., Finlay B. B.** (2007) „*Salmonella*, host and disease: a brief review“, *Immunology and Cell Biology*, Vol. 85, 112-118

- Cox G. W., Mathieson B. J., Gandino L., Blasi E., Radzioch D., Varesio L.** (1989) „Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/ v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver“, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 81, No. 19, 1492-1496
- Donné E., Pasmans F., Boyen F., Van Immerseel F., Adriaensen C., Hernalsteens J.-P., Ducatelle R., Haesebrouck F.** (2005) „Survival of *Salmonella* serovar Typhimurium inside porcine monocytes is associated with complement binding and suppression of the production of reactive oxygen species“, *Veterinary Microbiology*, Vol. 107, Issues 3-4, 205-214
- de Jong H. K., Parry C. M., van der Poll T., Wiersinga W. J.** (2012) „Host-Pathogen interaction in invasive Salmonellosis“, *PLOS Pathogens*, Vol. 8, Issue 10
- Eckmann L., Kagnoff M. F.** (2001) „Cytokines in host defense against *Salmonella*“, *Microbes and Infection*, Vol. 3, 1191-1200
- Fierer J., Eckmann L., Fang F., Pfeifer C., Finlay B. B., Guiney D.** (1993) „Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells“, *Infection and Immunity*, Vol. 61, No. 12, 5231-5236
- Fogh J., Fogh J. M., Orfeo T.** (1977) „One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice“, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 59, No. 1, 221-226
- Gal-Mor O., Valinsky L., Weinberger M., Guy S., Jaffe J., Schorr Y. I., Raisfeld A., Agmon V., Nissan I.** (2010) „Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Infantis, Israel“, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 16, No. 11, 1754-1757
- Gan L.-S. L., Thakker D. R.** (1997) „Applications of the Caco-2 model in the design and development of orally active drugs: Elucidation of biochemical and physical barriers posed by the intestinal epithelium“, *Advanced drug delivery reviews* 23, 77-98
- Godinez I., Haneda T., Raffatellu M., George M. D., Paixao T. A., Rolán H. G., Santos R. L., Dandekar S., Tsolis R. M., Bäumler A. J.** (2008) „T-cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium in the intestinal mucosa“, *Infection and Immunity*, Vol. 76, No. 5, 2008-2017

- Grassl G. A., Valdez Y., Bergstrom K. S. B., Vallance B. A., Finlay B. B. (2008)** „Chronic enteric *Salmonella* infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis“, *Gastroenterology*, Vol. 134, 768-780
- Haag H. Hantke K., Drechsel H., Stojiljkovic I., Jung G., Zähler H. (1993)** „Purification of Yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*“, *Journal of General Microbiology*, Vol. 139, 2159-2165
- Hautefort I., Thompson A., Eriksson-Ygberg S., Parker M. L., Lucchini S., Danino V., Bongaerts R. J. M., Ahmad N., Rhen M., Hinton J. C. D. (2008)** „During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems“, *Cellular Microbiology*, Vol. 10, 958-984
- Hernández-Reyes C., Schikora A. (2013)** „*Salmonella*, a cross-kingdom pathogen infecting humans and plants“, *Federation of European Microbiological Societies - Microbiological Letters* 343, 1-7
- Hohmann A. W., Schmidt G., Rowley D. (1978)** „Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice“, *Infection and Immunity*, Vol. 22, No. 3, 763-770
- Imre A., Bukovinszki A., Lovell M. A., Li H., Zhou X., Barrow P. A. (2013)** „Gene expression analysis of *Salmonella enterica* SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis“, *Veterinary Microbiology*, Vol. 167, 675-679
- Kawakami T., Ando T. (2013)** „*Salmonella*'s masterful skill in mast cell suppression“, *Immunity* 39, 996-998
- Majowicz S. E., Musto J., Scallan E., Angulo F. J., Kirk M., O'Brien S. J., Jones T. F., Fazil A., Hoekstra R. M. (2010)** „The global burden of nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis“, *Clinical Infectious Diseases* 50, 882-889
- Matter K., Brauchbar M., Bucher K., Hauri H.-P. (1990)** „Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2)“, *Cell*, Vol. 60, 429-437
- Mendez B., Tachibana C., Levy S. B. (1980)** „Heterogeneity of Tetracyclin resistance determinants“, *Plasmid*, Vol. 3, Issue 2, 99-108

- Peterson M. D., Mooseker M. S.** (1992) „Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2_{BBe} clones of the human intestinal cell line, Caco-2“, *Journal of Cell Science* 102, 581-600
- Pezzella C., Ricci A., DiGiannatale E., Luzzi I., Carattoli A.** (2004) „Tetracyclin and Streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy“, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 3, 903-908
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.-D., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A.** (1983) „Enterocyte-like differentiation and polarization of the Human Carcinoma Cell Line Caco-2 in culture“, *Biology of the Cell*, Vol. 47, 323-330
- Quaroni A., Hochman J.** (1996) „Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies“, *Advanced drug delivery reviews* 22, 3-52
- Raffatellu M., Wilson R. P., Chessa D., Andrews-Polymeris H., Tran Q. T., Lawhon S., Khare S., Adams L. G., Bäumlner A. J.** (2005) „SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Invasion of Epithelial Cells, *Infection and Immunity*, Vol. 73, No. 1, 146-154
- Rotger R., Casadesús J.** (1999) „The virulence plasmids of *Salmonella*“, *International Microbiology*, Vol. 2, 177-184
- Rousset M.** (1986) „The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation“, *Biochimie* 68, 1035-1040
- Rychlik I., Gregorova D., Hradecka H.** (2006) „Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*“, *Veterinary Microbiology*, Vol. 112, 1-10
- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M. L., Stamatii A., Zucco F.** (2005) „The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics“, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 21, 1-26
- Santos R. L., Raffatellu M., Bevins C. L., Adams L. G., Tükel C., Tsolis R. M., Bäumlner A. J.** (2009) „Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style“, *Trends in Microbiology*, Vol. 17, No. 11, 498-506

- Sasakawa C.** (2009) „Molecular mechanisms of bacterial infection via the gut“, *Current topics in microbiology and immunology*, Vol. 337, 93-127
- Stecher B., Robbiani R., Walker A.W., Westendorf A. M., Bartel M., Kremer M., Chaffron S., Macpherson A. J., Buer J., Parkhill J., Dougan G., von Mering C., Hardt W.-D.** (2007) „*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota“, *PLOS Biology*, Vol. 5, Issue 10, 2177-2189
- Sterzenbach T., Crawford R. W., Winter S. E., Bäumlner A. J.** (2013) „*Salmonella* virulence mechanisms and their genetic basis“, *Salmonella in Domestic Animals*, 2nd Edition (eds P. A. Barrow and U. Methner), 80-103
- Suar M., Jantsch J., Hapfelmeier S., Kremer M., Stallmach T., Barrow P. A., Hardt W.-D.** (2006) „Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the Streptomycin-pretreated mouse model“, *Infection and Immunity*, Vol. 74, No. 1, 632-644
- Thanassi D. G., Bliska J. B., Christie P. J.** (2012) „Surface organelles assembled by secretion systems of gram-negative bacteria: diversity in structure and function“, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 36, Issue 6, 1046-1082
- Thiennimitr P., Winter S. E., Bäumlner A. J.** (2012) „*Salmonella*, the host and its microbiota“, *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 15, 108-114
- Volf J., Havlickova H., Hradecka H., Ondrackova P., Matiasovic J., Faldyna M., Rychlik I.** (2010) „Epidemiology and interaction of *Salmonella enterica* serovar Derby, Infantis and Typhimurium with porcine alveolar macrophages“, *Veterinary Microbiology*, Vol. 146, 105-110
- Völk H.** (2011) „Etablierung eines Infektionsmodells in Säugerzellen zur Charakterisierung des Pathogenitätsfaktors SpvB von *Salmonella enterica*“, Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Ulm
- Wallis T. S., Galyov E. E.** (2000) „Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis“, *Molecular Microbiology*, Vol. 36, No. 5, 997-1005

8. Anhang

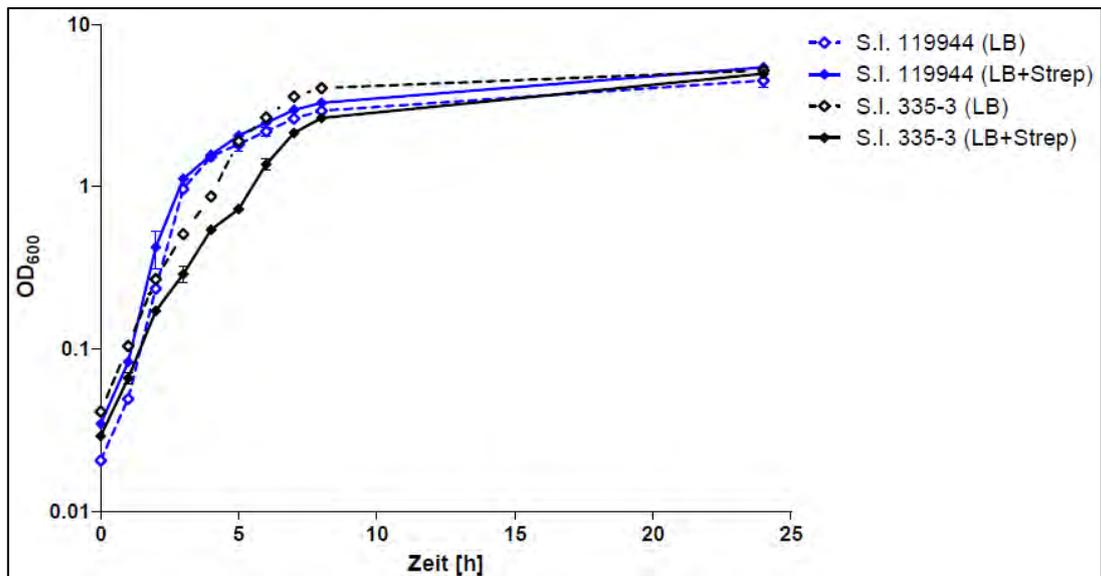


Abbildung I: Vergleich der OD₆₀₀-basierten Wachstumskurven der ursprünglichen *S. Infantis*-Isolate in LB und LB inkl. Streptomycin

Die zeitlichen Verläufe der OD₆₀₀ der zwei *S. Infantis*-Isolate S. I. 119944 und S. I. 335-3 zeigten während des exponentiellen Wachstums zwischen 0 - 7 h geringfügig unterschiedliche optische Dichten, jedoch konnte nach 24 h Kultivierungsdauer ein vergleichbarer OD₆₀₀-Wert unabhängig vom Wachstum in LB-Medium oder LB-Medium mit Streptomycin festgestellt werden. Abweichungen vom Mittelwert sind durch Fehlerbalken dargestellt. (Daten aus n = 2; weitere Kultivierungsbedingungen: 37°C, ca. 150 rpm)

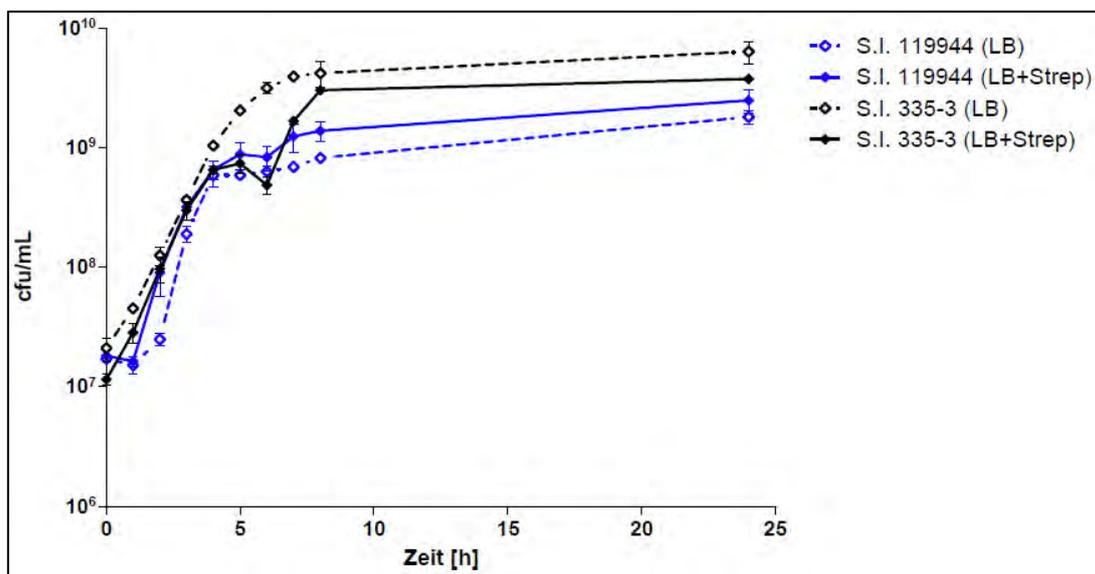


Abbildung II: Vergleich der cfu-basierten Wachstumskurven der ursprünglichen *S. Infantis*-Isolate in LB und LB inkl. Streptomycin

Zeitliche Verläufe der cfu/mL der zwei *S. Infantis*-Kulturen, welche starke Parallelen zu OD₆₀₀-basierten Wachstumskurven feststellen ließen. Nach 24 h Kultivierungsdauer waren die Keimzahlen beider Kulturen dicht beieinander und zeigten keinen signifikanten Einfluss des verwendeten Antibiotikums. Abweichungen vom Mittelwert sind durch Fehlerbalken dargestellt. (Daten aus n = 2; weitere Kultivierungsbedingungen: 37°C, ca. 150 rpm)

9. Danksagung

Mit den folgenden Zeilen möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken und damit ausdrücken, dass weder ein Studium noch das Schreiben einer Abschlussarbeit ohne die Unterstützung vieler lieber Mitmenschen denkbar sind.

An erster Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei meinem Betreuer **Prof. Dr. Guntram Grassl** für die Bereitstellung dieses spannenden Themas bedanken. Die Arbeit hat mir gezeigt, dass kleine Tiere durchaus Großes vollbringen können und eine positive Sicht auf die Dinge die da kommen mögen, so manche Krise vergessen lässt. Deine gute Laune war ansteckend und die Gespräche mit dir gaben mir immer ein gutes Gefühl und stärkten das Vertrauen in mich selbst. Danke dass deine Tür immer offen stand, du für kleinere und größere Probleme fast immer eine Lösung wusstest und du mich unterstützt hast wo du nur konntest.

Bei Herrn **Prof. Dr. Jörg Andrä** möchte ich mich für die unkomplizierte Betreuung und das Übernehmen der Erstkorrektur dieser Arbeit bedanken. Danke für Ihre unerschütterliche Geduld, die schönen Vorlesungen und die fortwährende Unterstützung während meines Masterstudiums.

Mein weiterer Dank gilt **Dr. Natalie Steck**, welche mich vom ersten Tag an mit offenen Armen im Forschungszentrum Borstel empfangen hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Du hast mir durch zahlreiche Anregungen zu fachlichen Problemen immer wieder auf die richtige Bahn verholfen und mich auch durch persönliche Gespräche den manchmal stressigen Laboralltag vergessen lassen. Danke dass du immer für mich da warst und auch noch bist, ich bei dir so viel reden konnte wie ich wollte und wir über so vieles zusammen lachen konnten!

PD Dr. Norbert Reiling und **Prof. Dr. Holger Heine** möchte ich für die Bereitstellung der verwendeten Zelllinien danken.

9. Danksagung

Mein weiterer Dank gilt der gesamten **Arbeitsgruppe Entzündungsmodelle - Janin Braun, Jan Schubert** und **Dorothee Schultz**. Danke für die tolle Zusammenarbeit und die kleinen und großen Gesten im Laboralltag.

Meiner Familie danke ich ganz besonders für die seelische und moralische Unterstützung während meines gesamten Studiums und den kritischen Phasen während dem Verfassen diverser Protokolle, Berichte und Abschlussarbeiten. **Mutti** und **Papa**, danke dass ihr immer an mich geglaubt und mir alle Türen offen gehalten habt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen wundervollen **Freunden** bedanken. Ihr seid in jeder Lebenslage erreichbar und für mich unverzichtbar. Danke dass ihr jeden Quatsch mitmacht und ihr mir zeigt, dass wahre Freundschaften die schwärzesten Stunden überstehen!