

Aus dem Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Nachweis intrazellulärer Salmonellen in phagozytierenden Zellen
nach oraler Infektion von Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Regina Schröder
aus Bad Segeberg

Leipzig, 2002

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Alber

Gutachter:

Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie, Leipzig

Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie, Leipzig

Prof. Dr. Hans-Joachim Selbitz, Impfstoffwerk-Dessau-Tornau

Tag der Verteidigung: 18.12.2002

Nachweis intrazellulärer Salmonellen in phagozytierenden Zellen nach oraler Infektion von Mäusen

Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	4
2.1 Salmonellen	4
2.1.1 Mikrobiologische Einordnung der Salmonellen	4
2.1.2 Pathogenese der Salmonelleninfektion	4
2.1.3 Virulenzfaktoren der Salmonellen	5
2.1.4 Akute und latente Salmonelleninfektion	7
2.2 Antigenpräsentierende Zellen des Immunsystem	8
2.2.1 Funktion der Antigen präsentierenden Zellen während der Induktion einer spezifischen Immunantwort	8
2.2.2 Dendritische Zellen	9
2.2.3 Makrophagen	10
2.2.4 B-Zellen	13
2.3 Der anatomische Bau der Peyerschen Platten und ihre immunologische Funktion.	13
3 Tiere, Material und Methoden	16
3.1 Puffer und Lösungen	16
3.1.1 Standardpuffer	16
3.1.2 Puffer, Lösungen und Medien für Salmonellen und Zellkultur	16
3.1.3 Puffer und Medien zur Isolierung der Einzelzellen und Separation der Dendritischen Zellen und Makrophagen über Dichtegradientenzentrifugation	17
3.1.4 Puffer und Lösungen für ELISA	18
3.1.5 Puffer und Lösungen für immunhistochemische Untersuchungen	19
3.1.6 Puffer für durchflusszytometrische Untersuchungen	19
3.1.7 Verwendete Antikörper	20
3.2 Verwendete Bakterienstämme für In-vitro- und In-vivo-Infektionen	21
3.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme	21
3.2.2 Vorbereitung von <i>S. Enteritidis</i> für In-vitro- und In-vivo-Infektion	22
3.2.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl aus Suspensionen und Organen	22
3.3 Die Makrophagenzelllinie RAW 264.7	23

3.4 Verwendete Versuchstiere, In-vivo-Infektion und Gewinnung von Untersuchungsmaterial	24
3.4.1 Genetischer Hintergrund und Zucht und Haltung der verwendeten Versuchsmäuse	24
3.4.2 Die orale Infektion der Mäuse mit S. Enteritidis	25
3.4.3 Blutabnahme aus dem retroorbitalen Plexus von narkotisierten Mäusen.....	25
3.4.4 Sektion der infizierten Mäuse	27
3.4.4.1 Tötung.....	27
3.4.4.2 Gewinnung von Herzblut.....	27
3.4.4.3 Organentnahme	28
3.5 Isolierung von Einzelzellen aus den Organen und Separation von Dendritischen Zellen und Makrophagen	28
3.5.1 Isolierung von Einzelzellen aus den Peyerschen Platten, den Darmlymphknoten und der Milz	28
3.5.2 Bestimmung der Anzahl extrazellulär vorliegender Salmonellen	31
3.5.3 Separation von phagozytierenden Zellen aus den Einzelzellen durch Dichtegradientenzentrifugation	31
3.5.4 Aufreinigung der DC über durchflusszytometrische Zellsortierung	33
3.5.5 In-vitro-Infektion von primären Zellen mit S. Enteritidis	33
3.5.6 Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen durch Ausplattieren der isolierten Zellen auf Agarplatten	33
3.6 Bestimmung der antigenspezifischen Antikörpertiter im Serum (ELISA)	34
3.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen	35
3.7.1 Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung von Zelloberflächenmarkern.....	35
3.7.2 Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung von Salmonellenantigen	36
3.7.3 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse).....	36
3.8 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen der Zell- und Gewebeproben	37
3.8.1 Detektion des Salmonellenantigen über den immunhistochemischen Nachweis mit einem spezifischen Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum	37
3.8.2 Immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.....	37
3.9 Probenvorbereitung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen	38
3.9.1 Vorbereitung der Organe	38
3.9.2 Vorbereitung der Zellen.....	39
3.9.3 Elektronenmikroskopische Präparation und Analyse	39
3.10 Verwendete Software	39

4 Ergebnisse	40
4.1 Vorversuche mit der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zum Nachweis der Salmonellen bzw. von Salmonellenantigen in in vitro infizierten Zellen	40
4.1.1 Immunhistochemische Detektion von S. Enteritidis-Antigen in in vitro infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7.....	41
4.1.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellen in in vitro mit SalmoVacSE® infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	43
4.1.3 Durchflusszytometrischer Nachweis von Salmonellenantigen in in vitro mit SalmoVacSE® infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	45
4.1.4 Nachweis lebender Salmonellen in in vitro infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	47
4.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von S. Enteritidis in in vitro infizierten DC aus den PP und der Milz.....	50
4.3 Analyse der separierten Zellen mit Hilfe von Oberflächenmolekülen (durchflusszytometrische Untersuchung)	52
4.4 In-vivo-Infektion von BALB/c-Mäusen mit Salmonella Enteritidis.....	54
4.4.1 Etablierung der Infektionsbedingungen	54
4.4.1.1 Bestimmung der Infektionsdosis in BALB/c-WT-Mäusen bei oraler Infektion mit S. Enteritidis.....	54
4.4.1.2 Untersuchung der Serokonversion nach oraler Infektion mit S. Enteritidis	55
4.4.2 Untersuchungen der S. Enteritidis-infizierten Mäuse 12 Stunden p.i.	56
4.4.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung aus den PP.....	56
4.4.2.2 Orale Infektion von Mäusen mit dem S. Enteritidis-Impfstamm SalmoVacSE? und anschließende Isolierung von Einzelzellen aus den PP.....	57
4.4.2.3 Orale Infektion von Mäusen mit dem schwach virulenten S. Enteritidis-Stamm 64/03 und anschließende Isolierung von Einzelzellen aus den PP.....	59
4.4.2.4 Untersuchung der Auswirkung von Hungerperioden vor der Infektion auf die Anzahl infizierter Phagozyten in PP.....	59
4.4.3 Untersuchungen der infizierten Mäuse 4 Stunden p.i.	60
4.4.4 Immunhistologische Untersuchungen der PP aus BALB/c-Mäusen infiziert mit S. Enteritidis 64/03 4 Stunden p.i. mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie.....	63
4.4.5 Bedeutung von Interleukin-12 während der Frühphase der oralen Salmonelleninfektion	65
5 Diskussion	68
5.1 Einleitung.....	68
5.2 Etablierung der Nachweismethoden für Salmonellenantigen und Salmonellen	68
5.3 Nachweis der In-vitro-Infizierbarkeit von Dendritischen Zellen der Milz und der Peyerschen Platten mit Salmonellen.....	70

5.4 Untersuchungen im In-vivo-Modell der oralen Salmonelleninfektion in Inzuchtmäusen	71
5.4.1 Nachweis von lebenden Salmonellen 12 Stunden nach In-vivo-Infektion von Mäusen in separierten Einzelzellen aus den PP	73
5.4.2 Nachweis extra- und intrazellulärer Salmonellen in den PP und Salmonellenantigen-tragender Zellen in der Milz vier Stunden p.i.....	74
5.4.3 Die Bedeutung von IL-12 während der Frühphase der oralen Salmonelleninfektion.....	75
5.4.4 Die Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie	77
6 Zusammenfassung.....	79
7.Summary	81
8 Literaturverzeichnis.....	83
9 Anhang	X

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Die Eigenschaften der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (nach JANEWAY & TRAVERS, 1997)	8
Tab. 2:	Anzahl infizierter Zellen aus 1×10^3 <i>in vitro</i> infizierten RAW 264.7-Zellen.....	46
Tab. 3:	Anzahl infizierter Zellen nach <i>In-vitro</i> -Infektion der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit unterschiedlich kultivierten SalmoVacSE [®] -Stämmen	47
Tab. 4:	Anzahl infizierter Zellen in den Peyerschen Platten 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit SalmoVacSE [®]	56
Tab. 5:	Durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen in den PP von Mäusen 12 Stunden nach oraler Infektion mit dem SalmoVacSE [®] -Stamm kultiviert in Mangelmedium.....	57
Tab. 6:	Durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen in den PP von Mäusen 12 Stunden nach oraler Infektion mit dem SalmoVacSE [®] -Stamm kultiviert in LB-Medium	57
Tab. 7:	Anzahl infizierter Zellen in den PP 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem schwach virulenten <i>S. Enteritidis</i> -Impfstamm 64/03.....	58
Tab. 8:	Anzahl infizierter Phagozyten in den PP 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem schwach virulenten <i>S. Enteritidis</i> -Impfstamm 64/03 mit Hungerperioden (12 Stunden) vor und nach der Infektion.....	59
Tab. 9:	Anzahl der Salmonellenkolonien intrazellulär in Einzelzellen und extrazellulär im Überstand aus PP, Milz und Darmlymphknoten 4 Stunden <i>p.i.</i> mit 1×10^{10} KBE <i>S. Enteritidis</i> 60	
Tab. 10:	Bestimmung der Gesamtkeimzahl und der Anzahl oinfizierter Zellen in den PP von BALB/c-WT- und BALB/c-IL-12-defizienten-Mäusen 4 Stunden <i>p.i.</i> mit 1×10^{10} KBE <i>S. Enteritidis</i> 64/03 pro Maus.....	64
Tab. 11:	Prozentualer Anteil der infizierten Zellen in Einzelzellsuspension von PP und Milz 4 Stunden <i>p.i.</i>	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anzahl der gemeldeten Fälle von <i>Enteritis infectiosa</i> in Deutschland von 1990 bis 1999 unter besonderer Berücksichtigung der Salmonellose (nach ROBERT KOCH INSTITUT 2001)	1
Abb. 2:	Unterschiede der unreifen und der reifen DC	10
Abb. 3:	Eine Peyersche Platte im Dünndarm einer Maus im Querschnitt	14
Abb. 4:	Schematischer Aufbau einer Peyerschen Platte	14
Abb. 5:	Blutabnahme aus dem retroorbitalen Plexus von narkotisierten Mäusen	26
Abb. 6:	Sektionssitus und Organe einer Maus	29/30
Abb. 7:	Schematischer Aufbau des Dichtegradienten zur Separation von Dendritischen Zellen und Makrophagen	32
Abb. 8:	Dichtegradient zur Separation von Dendritischen Zellen und Makrophagen	32
Abb. 9:	Immunhistologischer Nachweis von Salmonellenantigenen in <i>in vitro</i> mit SalmoVacSE [®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	42
Abb. 10:	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellenantigenen in <i>in vitro</i> mit SalmoVacSE [®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	44
Abb. 11:	Durchflusszytometrische Analyse nichtinfizierter und mit SalmoVacSE [®] infizierter Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	46
Abb. 12:	Durchflusszytometrische Analyse unterschiedlich infizierter Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7	49
Abb. 13:	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellenantigenen in <i>in vitro</i> mit SalmoVacSE [®] infizierten Dendritischen Zellen aus der Milz und den Peyerschen Platten	50
Abb. 14:	Subpopulationen der isolierten Zellfraktionen aus Milzen von naiven BALB/c-WT-Mäusen	52
Abb. 15:	Subpopulationen der isolierten Zellfraktionen aus Milzen von infizierten BALB/c-WT-Mäusen 12 Stunden <i>p.i.</i>	53

Abb. 16:	Überlebensrate der BALB/c-WT-Mäuse nach oraler Applikation von 1×10^{10} und 1×10^{11} KbE des <i>S. Enteritidis</i> -Impfstammes SalmoVacSE [®] pro Maus.....	55
Abb. 17:	Nachweis von Salmonellenantigenen in nicht separierten Einzelzellen aus Milz und Peyerschen Platten von BALB/c-WT-Mäusen 4 Stunden <i>p.i.</i> mit <i>S. Enteritidis</i> 64/03 mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchung.....	62
Abb. 18:	Nachweis von Salmonellenantigenen im Darmlumen und in der Darmwand, Immunfluoreszenzaufnahme mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie	64
Abb. 19:	Nachweis von Salmonellenantigenen in nicht separierten Einzelzellen aus Milz und Peyerschen Platten von BALB/c-WT-Mäusen 4 Stunden <i>p.i.</i> mit <i>S. Enteritidis</i> 64/03 mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchung	67

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure
AEC	3-Amino-9-Ethylcabazol
APC	Antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“)
BALB	Bezeichnung für einen Maus-Inzuchtstamm (Bagg Albino)
BALB/c-WT-Mäuse	Wildtyp-Mäuse des Inzuchtstammes
CSF	colony-stimulating-factor
CD	Oberflächenprotein („cluster of differentiation“)
cm	Centimeter, 1/100 Meter
DC	Dendritische Zelle („dendritic cell“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
FACS	Durchflusszytometer („fluorescence activated cell sorter“)
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (Zentrifugationsangabe)
GFP	„green-fluorescent-protein“
GM-CSF ...	Granulozyten-Makrophagen-Wachstumsfaktor („granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor“)
H/E-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HBSS	Phosphatlösung („Hank's buffered salt solution“)
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
IFN- γ	Interferon gamma
IgA	Immunglobulin A
IgG1/IgG2a	Immunglobulin G, Subklasse 1/Subklasse 2a
IL	Interleukin
IL-12p35	p35 Untereinheit des Interleukin-12
IL-12p40	p40 Untereinheit des Interleukin-12
IL-12p75	vollständiges Interleukin-12, Heterodimer
ISCOVE's	Zellkulturmedium, Modifikation des „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KM	Körpermasse
KZB	Keimzahlbestimmung
LB-Medium/LB-Agar	Luria-Bertani-Medium/Luria-Bertani-Agar
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Makrophagen-Wachstumsfaktor („macrophage-colony-stimulating-factor“)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minuten
MIP	„macrophage inflammatory protein“
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mg	Milligramm, 1/1000 Gramm
M	Molar
M-Zellen	membranöse Zellen („microfold cells“)
M ϕ	Makrophage(n)
μ g	Microgramm, 1/1000000 Gramm
μ l	Microliter, 1/1000000 Liter

µm	Micrometer, 1/1000000 Meter
NK-Zellen.....	natürliche Killer-Zellen („natural killer cells“)
Nramp 1	„natural resistance associated macrophage protein 1“
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
POD	Peroxidase
PP.....	Peyersche Platten
RPE.....	R-Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
RPMI 1640	Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institut“)
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Enteritidis
SPF	spezifisch Pathogen frei
SED.....	subepitheliale Domregion
<i>spi</i>	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
<i>spv</i>	<i>Salmonella</i> Plasmid für Virulenz
TRANCE/RANKL	„tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine / receptor activator of nuklear factor-kappaB ligand“
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
XLD-Agar.....	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

1 Einleitung

Erkrankungen durch die gramnegative Bakteriengattung *Salmonella* stellen weltweit ein großes Problem für die Gesundheit von Mensch und Tier dar (MEYER, 1999). Obwohl Salmonellen bei immunkompetenten Individuen eher ungefährliche gastrointestinale Erkrankungen (*Enteritiden* verursacht durch nicht adaptierte Serovare) hervorrufen, stellen generalisierte Salmonellosen (verursacht durch adaptierte und nicht adaptierte Serovare) ein nicht zu vernachlässigendes Risiko bei immunsupprimierten Menschen und Tieren dar (SELBITZ *et al.*, 1995). Dabei gelingt es den Salmonellen, vom Darmlumen aus andere Organe zu besiedeln und je nach Resistenzlage des Organismus akut oder latent generalisierte Salmonellosen hervorzurufen (MASTROENI *et al.*, 2000). Die Salmonellen können sich in bestimmten Organen, wie z. B. der Gallenblase, oder in Zellen (Makrophagen) dem Zugriff des Immunsystems entziehen.

Die Anzahl der Salmonellosen beim Menschen sinkt seit 1992 stetig, nimmt jedoch immer noch einen hohen Anteil der gemeldeten Gastroenteritiden ein (Abb. 1).

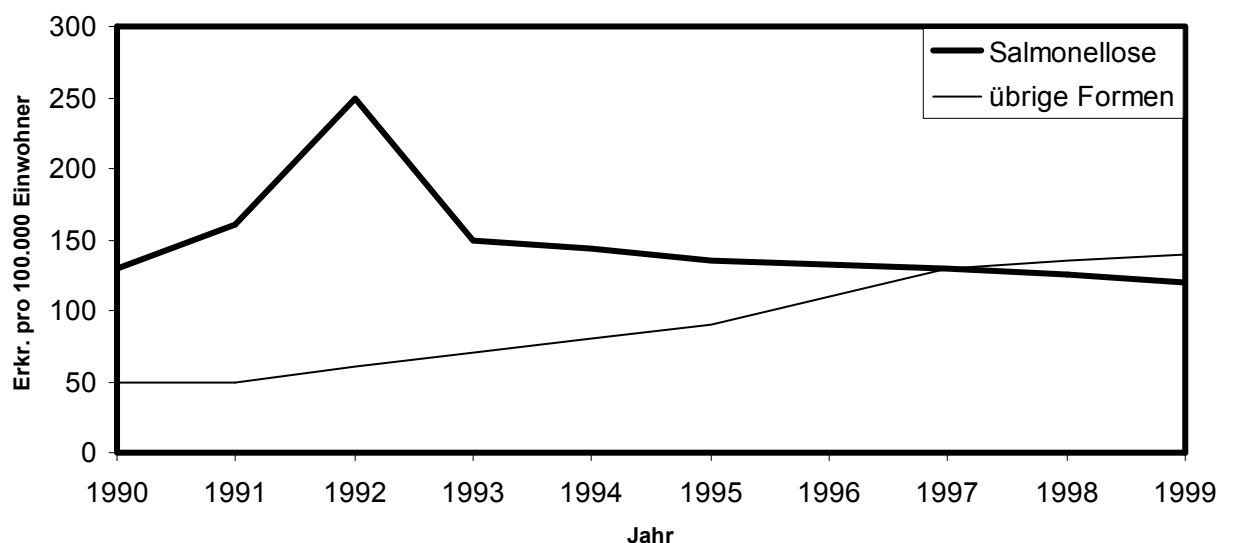


Abb. 1: Anzahl gemeldeter Fälle von *Enteritis infectiosa* in Deutschland von 1990 bis 1999 unter besonderer Berücksichtigung der Salmonellose (nach ROBERT KOCH INSTITUT, 2001)

Erkr.: Erkrankungen

Die Infektion von Mensch und Tier erfolgt in der Regel über die Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel. Dabei gelingt es einem Teil der Salmonellen die Salzsäurebarriere des Magens unbeschadet zu überwinden und in den Dünndarm zu gelangen. Sie sind imstande,

sich in diesem Bereich anzusiedeln, zu vermehren und Entzündungen auszulösen (Enteritiden).

Es ist bekannt, dass Salmonellen besonders gut über die membranösen Zellen (M-Zellen) in das Darmepithel eindringen und so in den Einzugsbereich der Peyerschen Platten (PP, lymphatische Organe der Darmwand) gelangen (KOHATA *et al.*, 1986; CLARK *et al.*, 1994). Hier sind insbesondere Makrophagen (M ϕ) und Dendritische Zellen (DC) lokalisiert, die eingedrungene Pathogene phagozytieren und die Antigene den spezifischen T- und B-Zellen präsentieren (CAMACHO VILLARREAL *et al.*, 1995; IWASAKI u. KELSALL, 1996). Trotzdem gelingt es den Salmonellen in einigen Fällen diese Abwehrbarriere des Organismus zu durchbrechen und sich systemisch im Organismus auszubreiten (CIRILLO *et al.*, 1998). Da es sich bei den Salmonellen um fakultativ intrazelluläre Bakterien handelt (LOWRY *et al.*, 1979; LALMANACH u. LANTIER, 1999; MASTROENI *et al.*, 2000), können sie in M ϕ überleben (EKZEMPLIAROV, 1965; HASHIM *et al.*, 2000) und die M ϕ als Transportvehikel in den Organismus nutzen. So konnten WIJBURG *et al.* zeigen, dass M ϕ für die Pathogenese einer Salmonellose wichtig sind, indem sie mit dazu beitragen, dass Salmonellen in die Milz und die Leber gelangen. Auf diese Weise bilden die M ϕ für die Salmonellen eine Nische, in der sie sich vermehren können (WIJBURG *et al.*, 2000). Die Bedeutung der DC während einer Salmonelleninfektion ist noch nicht hinreichend geklärt, obwohl die Kolokalisation der Salmonellen in diesen Zellen bekannt ist (HOPKINS u. KRAEHEBUHL, 1997; HOPKINS *et al.*, 2000).

Aufgrund der bekannten Funktion der M ϕ und DC als phagozytierende Zellen stehen folgende Arbeitshypothesen im Mittelpunkt dieser Arbeit:

1. Makrophagen sind sehr effektive Phagozyten. Sie versuchen möglichst viele Salmonellen zu phagozytieren und abzutöten, um die Infektion einzudämmen.
2. Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen. Sie phagozytieren nur eine geringe Anzahl der Salmonellen, prozessieren die Antigene und präsentieren diese den Effektorzellen des Immunsystems.
3. Salmonellen können in Makrophagen und Dendritischen Zellen überleben und durch diese im Organismus verteilt werden.

Von besonderem Interesse sind dabei die frühen Vorgänge (angeborene Immunität) in den PP während einer oralen Salmonelleninfektion und die Lokalisation der primären Salmonellen, die durch die Infektion in den Organismus gelangen. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb

ein orales Salmonelleninfektionsmodell in Mäusen etabliert und die Bedeutung der DC und der M ϕ in PP während der ersten Stunden nach einer oralen Salmonelleninfektion untersucht. Dazu wurden verschiedene Systeme zum Nachweis intrazellulärer Salmonellen und zum Nachweis von Salmonellenantigen etabliert.

2 Literaturübersicht

2.1 Salmonellen

2.1.1 Mikrobiologische Einordnung der Salmonellen

Salmonellen gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Die typischen Merkmale sind dabei das gramnegative Färbeverhalten, die Beweglichkeit und der Glukoseabbau. Die 2-3 μm langen, plumpen Stäbchen der Gattung *Salmonella* werden aufgrund ihrer Körper-(O)- und Geißel-(H)-Antigene nach dem Kaufmann-Withe-Schema eingeteilt, und anhand dieser Seroformel als Serovaren deklariert. Eine besondere salmonellenspezifische biochemische Eigenschaft ist die Bildung von Schwefelwasserstoff bei gleichzeitigem Unvermögen zum Abbau von Laktose (ROLLE u. MAYR, 1993).

Die Widerstandsfähigkeit der Salmonellen ist außerordentlich hoch. In Medien mit ausreichendem Protein- (>10 mg/ml) und Sauerstoffgehalt können diese mehrere Jahre überleben. Gegenüber üblichen Desinfektionsmittel reagieren Salmonellen empfindlich, solange sie nicht von Schmutzbestandteilen (vor allem Proteine) eingehüllt werden (SELBITZ *et al.*, 1995).

2.1.2 Pathogenese der Salmonelleninfektion

Infektion von Nutztieren: Die Infektion mit Salmonellen erfolgt in der Regel auf fäkal-oralem Weg. Salmonellen, die das saure Milieu im Magen unbeschadet überlebt haben, heften sich an die Dünndarmschleimhaut an und vermehren sich in den Krypten des Epithels (SELBITZ *et al.*, 1995). Der weitere Verlauf der Infektion hängt vor allem von folgenden Faktoren ab: 1. Resistenzlage des infizierten Individuums, 2. Pathogenität und Virulenz des Infektionsstammes; 3. Höhe der Infektionsdosis (ROLLE u. MAYR, 1993).

1. Die Resistenzlage des Individuums gegenüber Infektionserregern ist abhängig von verschiedensten biotischen und abiotischen Umweltfaktoren, die zu Immunsuppression führen können [Parasitenbefall, „Crowding“ (Stress durch Ein- und Umställen), Erregeranhäufung durch hohe Tierzahlen, schlechtes Klima, unhygienische Stallverhältnisse, Belastung des Futters durch Fusarien- und Aflatoxine]. Resistenzmindernde Faktoren sind von besonderer Bedeutung bei der

Ausprägung der latenten Salmonellose, die zur Zeit das Hauptproblem in den Beständen der landwirtschaftlichen Nutztiere bildet.

2. Die Pathogenität der Salmonellenserovare ist um so höher, je stärker die Anpassung der Salmonellen an eine bestimmte Tierart ist. Die Erreger der tierartspezifischen Salmonellosen sind für die entsprechende Tierart hoch pathogen, für andere Tierarten in der Regel nicht (*S. Dublin* → Rind, *S. Abortusovis* → Schaf, *S. Abortusequi* → Pferd, *S. Cholerasuis* → Schwein, *S. Gallinarum-Pullorum* → Huhn). Andere Serovare sind Tierart übergreifend pathogen (*S. Typhimurium*).
3. Gesunde Individuen müssen hohe Erregermengen (10^6 Keime) aufnehmen, damit sich eine Salmonellose entwickeln kann. Bei empfänglichen Individuen reichen auch schon geringe Erregermengen (100 Keime) aus, um eine Salmonellose zu induzieren (ROLLE u. MAYR, 1993).

Infektion des Menschen: Der Mensch infiziert sich in der Regel oral über kontaminierte Lebensmittel. Die primäre Infektionsquelle sind insbesondere von Geflügel, Rindern und Schweinen stammende Lebensmittel, wobei die Tiere in den seltensten Fällen klinisch erkrankt sind. Die Infektionsdosis für den Menschen liegt bei 10^4 bis 10^5 Keimen pro Individuum. Wenn sich Salmonellen in stark fetthaltigen Lebensmitteln befinden, sind jedoch Erkrankungen bereits bei Infektionsdosen unter 100 Keimen beobachtet worden. Salmonellen werden in fettreichen Lebensmitteln während der Magenpassage vom Fett umhüllt und sind dadurch besser vor Einwirkungen der Magensäure geschützt (SELBITZ *et al.*, 1995; MEYER, 1999). Durch direkten Kontakt mit salmonellenausscheidenden Tieren erfolgt sehr selten eine Übertragung auf den Menschen. Eine direkte oder indirekte Übertragung von Mensch zu Mensch - vor allem von verschiedenen mehrfach resistenten Salmonellen-Serovaren - kann als Hospitalinfektion bei besonders prädisponierten Personen oder unter hygienisch ungünstigen Bedingungen erfolgen.

(ROLLE u. MAYR, 1993; ROBERT KOCH INSTITUT, 2001)

2.1.3 Virulenzfaktoren der Salmonellen

Die Virulenzfaktoren der Salmonellen sind sehr vielfältig. Neben der Motilität gehören besonders Endotoxine dazu. Die Endotoxine stellen Lipopolysaccharide (LPS) dar, die Bestandteil der äußeren Membran der Erreger sind und u.a. mit dem Absterben der Mikroorganismen, aber auch durch Komplementwirkung oder unter Antibiotikagabe

freigesetzt werden. Die Endotoxine entfalten nach Absorption durch die Darmwand ihre Wirkung im gesamten Körper. Es kann zum Schock und (bei Schweinen) zur Ödemkrankheit kommen.

Eine Besonderheit der hoch virulenten Salmonellenstämme ist das Vorkommen zusätzlicher Pathogenitäts-Inseln neben dem eigentlichen Genom. Dies sind lange instabile Segmente, die den apathogenen Stämmen fehlen (OCHMAN *et al.*, 1996). Die Transkription dieser Gene erfolgt bevorzugt in intrazellulärer Umgebung (CIRILLO *et al.*, 1998). Die Salmonellen-Pathogenitäts-Insel-1 (*spi 1*) kodiert unter anderem für Proteine des Typ III-Sekretionsapparates. Mit dessen Hilfe werden Proteine, die wichtig für die Invasion in Epithelzellen sind, aus den Salmonellen ausgeschleust. Weiterhin kodieren Gene der *spi 1* für Regulatorproteine der Invasionsgene. Die Expression der Regulatorproteine und die Sekretion der Invasionsproteine wird durch äußere Faktoren wie O₂-Spannung und Osmolarität der Umgebung beeinflusst und ist abhängig vom Wachstumsstadium der Salmonellen (LUNDBURG *et al.*, 1999). Die *spi 2* ist wichtig für das Überleben der Salmonellen in Makrophagen (OCHMAN *et al.*, 1996). Aktuelle Untersuchungen differenzieren drei *spi*-Loci (FIERER u. GUINEY, 2001). Die Autoren postulieren folgende Funktionen: die *spi 1* ist wichtig für die Invasion der Epithelzellen; die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom kann die *spi 2* beeinflussen, während die *spi 3* für die Anpassung der Salmonellen an eine Umgebung mit niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen und niedrigem pH-Wert (Phagolysosom) Bedeutung besitzt und für ein dem Nramp-1 der Säugetiere ähnlichem Protein der Bakterien codiert (KEHRES *et al.*, 2000). Das Phagosom stellt die Vakuole dar, mit der die Salmonellen in die phagozytierende Zellen aufgenommen werden; die Lysosomen enthalten die abbauenden Enzyme der Phagozyten; beide Vakuolen verschmelzen zum Phagolysosom, um die aufgenommenen Erreger abzutöten.

Weitere Virulenzgene liegen als Plasmide vor (*spv*-Gene), die es den Salmonellen ermöglichen, nach dem Passieren der Darmbarriere Milz und Leber zu infizieren und sich dort rapide zu vermehren. Die Genexpression wird durch Stress induziert, insbesondere Nährstoffmangel und Wachstum in der stationären Phase sind für deren Hochregulation verantwortlich. Außerdem wird sie durch die intrazelluläre Lokalisation der Bakterien gefördert (GULIG *et al.*, 1997). Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer erhöhten Vermehrung der Salmonellen führen, sind jedoch z. Zt. noch ungeklärt. Mit Hilfe der Produkte der Virulenzgene können die Salmonellen in den Endosomen der Phagozyten der Lyse entgehen, indem sie die Formierung von Phagolysosomen verhindern (GARVIS *et al.*, 2001) und sich intrazellulär vermehren (GOVONI *et al.*, 1999).

2.1.4 Akute und latente Salmonelleninfektion

Nach einer Inkubationszeit von fünf bis 72 Stunden äußert sich die akute Salmonellose mit Diarrhoe. Weitere klinische Symptome sind unter anderem Fieber, Übelkeit, Erbrechen und akute Schmerzen im Abdomen (ROLLE u. MAYR, 1993). Die Behandlung erfolgt in der Regel symptomatisch durch Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich. Eine Antibiotikatherapie ist nur bei gleichzeitiger Bakteriämie erforderlich (KROKER, 1994), da Antibiotika die Bakterienausscheidung verlängern, die normalerweise nach drei bis sechs Wochen beendet ist (SELBITZ *et al.*, 1995; ROBERT KOCH INSTITUT, 2001). Leider konnte noch keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden.

Die latente Infektion stellt ein bedeutendes Problem dar, da sie klinisch nicht erkannt werden kann. Die Infektionsdosis ist nur gering; trotzdem kann ein Teil der aufgenommenen Salmonellen die Darmbarriere passieren und durch den Lymph- und Blutstrom in andere Organe - vor allem Leber und Milz - disseminieren. Später einwirkende resistenzmindernde Faktoren können zum Ausbruch einer akuten Salmonellose oder zur Etablierung von Dauerausscheidern führen (ROLLE u. MAYR, 1993).

2.2 Antigenpräsentierende Zellen des Immunsystem

2.2.1 Funktion der Antigen präsentierenden Zellen während der Induktion einer spezifischen Immunantwort

Die professionellen Antigen präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems sind Makrophagen (M ϕ), Dendritische Zellen (DC) und B-Zellen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie konstitutiv bzw. nach Stimulation auf ihrer Zelloberfläche Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) exprimieren (Tab. 1). Die besondere Fähigkeit der spezialisierten Antigen präsentierenden Zellen besteht darin, fremdes Material zu erkennen, zu phagozytieren, zu verarbeiten (prozessieren) und in geeigneter Form mit Hilfe von MHC-Molekülen T-Zellen zu präsentieren. B-Zellen erkennen kleine Proteine mit Hilfe von Immunglobulinrezeptoren, die an ihrer Oberfläche vorhanden sind (SHEVAN, 1990; JANEWAY u. TRAVERS, 1997). DC exprimieren nach der Reifung bzw. nach Beendigung der Phagozytosevorgänge in deutlich höherer Konzentration MHC-Moleküle als M ϕ , weshalb ihre Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation bedeutend besser ist (JANEWAY u. TRAVERS, 1997; BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998). DC und M ϕ werden durch bakterielles Antigen aktiviert und produzieren daraufhin Interleukin 12 (IL-12).

Tab. 1: **Die Eigenschaften der professionellen antigenpräsentierenden Zellen** (nach JANEWAY u. TRAVERS; 1997)

	Makrophagen	Dendritische Zellen	B-Zellen
Antigenaufnahme	Phagozytose	Phagozytose (unreife DC)	Antigenspezifischer Rezeptor
MHC-Expression	induzierbar durch Bakterien und Zytokine	konstitutiv	konstitutiv, steigt nach Aktivierung
Kostimulatorfreisetzung	induzierbar	konstitutiv (reife DC)	induzierbar
Präsentiertes Antigen	partikuläre Antigene intra- und extrazellulärer Pathogene	Peptide, virale Antigene	lösliche Antigene, Toxine, Viren
Lokalisation	lymphatisches Gewebe, Bindegewebe, Körperhöhlräume	lymphatisches Gewebe, Bindegewebe, Epithelien	lymphatisches Gewebe, peripheres Blut

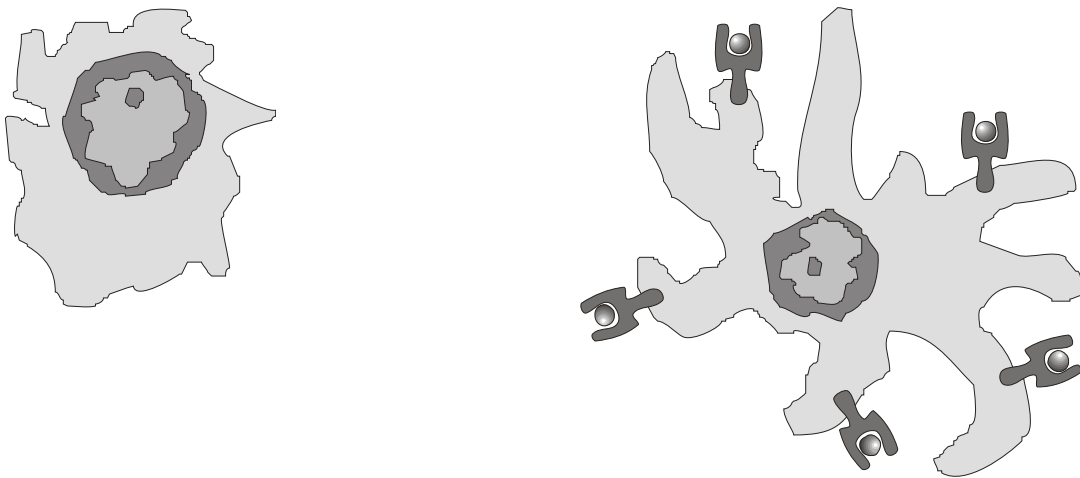
2.2.2 Dendritische Zellen

- Stammzellen, Reifung, Lokalisation, Verbleib, immunologische Funktion

Der gemeinsame Oberflächenmarker für alle DC ist CD11c (IWASAKI u. KELSALL, 2000). Die DC werden historisch bedingt in zwei Subpopulationen unterteilt: eine lymphoide Population und eine myeloide Population (IWASAKI u. KELSALL, 2000). In den PP existiert eine dritte, nicht klassifizierte Subpopulation der DC (IWASAKI u. KELSALL, 2001). Die myeloiden und lymphoiden DC wurden auf Grund ihrer zusätzlichen Oberflächenmarker den verschiedenen Stammzellen zugeordnet (SHORTMAN u. CAUX, 1997). Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass lymphoide ($CD8\alpha^+/CD11b^-$) und myeloide ($CD8\alpha^-/CD11b^+$) DC von identischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen (WU *et al.*, 2001). Sowohl lymphoide als auch myeloide Stammzellen können $CD8\alpha^+$ - und $CD8\alpha^-$ -DC hervorbringen. Die Expression des Oberflächenmarkers lässt daher keinen Rückschluss auf den Ursprung der DC zu. Möglicherweise handelt es sich um reifungsabhängige Unterschiede (MANZ *et al.*, 2001). Nichtteilungsfähige Vorläuferzellen sind auch in Geweben (Haut, Lunge, Milz, Niere, B- und T-Zellareale der Tonsillen) vorhanden. Unter Zytokineinfluss differenzieren diese Vorstufen in DC [aktiviert durch den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) + Interleukin 3 (IL-3)] oder in $M\phi$ [aktiviert durch den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF)]. Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die von einer Zelle gebildet werden und das Verhalten oder die Eigenschaften dieser oder einer anderen Zelle verändern (JANEWAY u. TRAVERS, 1997). *In vitro* ist es möglich, myeloide DC aus peripherem Blut unter Zusatz von GM-CSF und IL-4 zu kultivieren (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998).

An den DC unterscheidet man zwei konkrete Reifestadien, die unterschiedliche immunologische Funktionen wahrnehmen (Abb. 2). Die unreifen DC befinden sich an den Grenzflächen des Organismus (Haut, Schleimhaut, Darm, Lunge), um eingedrungene Erreger und Antigene sofort aufnehmen zu können. Diese Zellen wandern auch im Gewebe zu den Orten, an denen Antigene vorhanden sind. Die Faktoren, die eine zielgerichtete Wanderung auslösen, sind noch nicht vollständig bekannt. Lipopolysaccharide (LPS) stimulieren eine solche Wanderung, aber auch auf GM-CSF, Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-1 und MIP-1 α und β reagieren DC. Unreife DC in den Geweben können sehr gut phagozytieren, aber keine T-Zellen stimulieren, da sie die dazu nötigen kostimulatorischen Moleküle noch nicht exprimieren (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998). Sie nehmen Fremdmaterial auf

(Mikroorganismen über Phagozytose, Proteine über Makropinozytose) und bauen dieses mit Hilfe lysosomaler Enzyme und Proteasen ab (Antigenprocessing). Die DC sind dabei besonders effektive Phagozyten, weil sie Antigene auch rezeptorvermittelt aufnehmen können. Sie besitzen auf ihrer Oberflächen Mannose- (DEC-205), Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren. Deshalb werden auch schon geringe Mengen Antigen im Gewebe detektiert, aufgenommen und zu sekundären lymphatischen Geweben transportiert. Während des Antigenprocessing, also im Verlauf ihrer Reifung, wandern die Zellen in die regionären Lymphknoten, in denen eine große Anzahl naiver T- und B-Zellen vorhanden ist. Die Reifung der DC kann allerdings durch IL-10 verhindert werden (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998). In den Lymphknoten werden von den reifen DC die Antigene den naiven T-Lymphozyten über MHC Klasse II-Moleküle und zusätzliche kostimulatorische Moleküle (CD40, B7-2, LFA3) präsentiert, um in diesen Zellen eine spezifische Immunantwort zu induzieren (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998). Die Antigen-MHC Klasse II-Komplexe sind auf der Oberfläche der DC mehrere Tage stabil. Reife DC produzieren große Mengen IL-12 und fördern damit die spezifischen und unspezifischen Immunreaktionen (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998).



Unreife DC:

- wenig MHC II-Moleküle an der Oberfläche
- hohe Phagozytoseaktivität
- wenig kostimulatorische Moleküle an der Oberfläche
- lokalisiert in peripheren Geweben

Reife DC:

- viele MHC II-Moleküle an der Oberfläche
- geringe Phagozytoseaktivität
- viele kostimulatorische Moleküle an der Oberfläche
- lokalisiert in Lymphknoten

Abb. 2 : Unterschiede der unreifen und der reifen DC

In den Lymphknoten ist die Lebensdauer reifer DC begrenzt. Bereits bei Beginn des Reifungsprozesses der Zellen wird gleichzeitig ein weiterer Vorgang aktiviert, der dazu führt, dass in den DC nach einigen Tagen im Lymphknoten Apoptose erfolgt. Von den DC bleiben nur noch membranöse Vesikel übrig, die von $M\phi$ abgebaut werden. Dieser Vorgang, der eigentlich einen starken Verschleiß an antigenpräsentierenden Zellen bedeutet, ist deshalb notwendig, weil aktivierte DC Antigen-MHC-Klasse-II-Komplexe auf der Zelloberfläche sehr lange exprimieren (McLELLAN u. KÄMPGEN, 2000). Die Lebensdauer der reifen DC wird aber verlängert, wenn diese über sogenannte TRANCE/RANK-Rezeptoren (tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine / receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand) an TNF-ähnliche Faktoren auf Gedächtnis-T-Zellen binden (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998).

2.2.3 Makrophagen

- Stammzellen, Reifung, Lokalisation, Verbleib und immunologische Funktion

Die Vorläuferzellen unter anderem für Makrophagen ($M\phi$) sind die pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Angeregt durch IL-3, teilen sich diese Zellen, und deren Tochterzellen werden u. a. zu myeloiden Stammzellen für Granulozyten und Monozyten. Durch das differenzierte Zusammenwirken des GM-CSF mit dem Granulozyten-Koloniestimulierenden-Faktor (G-CSF) differenzieren sich deren Tochterzellen zu Makrophagenvorläuferzellen. Diese Zellen werden unter dem Einfluss des Koloniestimulierenden-Faktor 1 (CSF 1) zu Blutmonozyten. Gewebemakrophagen sind aus dem peripheren Blut ausgewanderte Monozyten, die in bestimmten Geweben jeweils sessil geworden sind. Die Stimuli zur Auswanderung der Monozyten aus dem peripheren Blut können bakterielle Antigene, Zytokine oder andere entzündliche Mediatoren darstellen (WILTROUT u. VARESIO, 1990).

Die Heterogenität der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen in den verschiedenen Organen ist Ausdruck ihrer Gewebespezifität. So sind die Monozyten, Histiozyten, Alveolarmakrophagen, Kupfferzellen, Synovialzellen Typ A, Mikrogliazellen, Osteoklasten und andere Gewebemakrophagen unterschiedlich lokalisierte $M\phi$. Alle Makrophagen tragen die Oberflächenmarker CD11b und F4/80 (IWASAKI u. KELSALL, 2000). Gemeinsam ist diesen Zellen auch die Fähigkeit zur Phagozytose sowie die Fähigkeit der Regulation von Funktionen der T- und B-Lymphozyten und der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (WILTROUT u. VARESIO, 1990). Lymphozyten sind die antigenspezifischen Effektorzellen

des Immunsystems. NK-Zellen sind Nicht-T-Nicht-B-Lymphozyten, die zytotoxisch wirken (JANEWAY u. TRAVERS, 1997).

Überalterte, das heißt irreversibel aktivierte oder durch Phagozytose überladene M ϕ werden in der Milz und in der Leber aus dem Blut "gefiltert" und abgebaut. Aktivierte M ϕ wandern in der Regel aktiv aus dem entzündlichen Gewebe in regionäre Lymphknoten aus, um dort spezifische T-Zellen zu aktivieren. Mit dem Lymph- und Blutstrom werden die M ϕ von dort in Milz und Leber geschwemmt und herausgefiltert. Das Zusammenwirken der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sorgt für ein Gleichgewicht zwischen Erneuerung und Zelltod, so dass dem Organismus immer genügend funktionstüchtige M ϕ zur Verfügung stehen (WILTROUT u. VARESIO, 1990).

Die grundsätzliche Funktion der M ϕ in einem Organismus besteht darin, fremdes Material zu erkennen, einzufangen, zu zerstören und zu entfernen. M ϕ sind deshalb als zelluläre Komponente des angeborenen, unspezifischen Immunsystems besonders gut in der Lage, Fremdmaterial zu phagozytieren. Sie sind die eigentlichen „Fresszellen“. Trotzdem beschränken sich ihre Fähigkeiten und Aufgaben während einer Immunantwort nicht nur auf die Phagozytose. Sie sind auch antigenpräsentierende Zellen, die mit Hilfe von Antigen-MHC II-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen Antigen spezifische T-Zellen aktivieren. M ϕ , die nicht durch Phagozytose überladen wurden, bauen die Antigene vollständig ab und verlieren nach einiger Zeit auch die Antigen-MHC-Klasse-II-Komplexe auf ihrer Oberfläche (Eckhart Kämpgen, www.uni-wuerzburg.de/blick/1997-1).

Die Aktivierung der M ϕ erfolgt über Interferon-gamma (IFN- γ) und einen zweiten zusätzlichen Stimulus. Dieser sekundäre Faktor kann exogen (bakterielles Antigen, LPS) oder endogen (TNF α) sein. IFN- γ -Produzenten sind vor allem T-Lymphozyten und NK-Zellen. Diese werden durch die Sekretion von IL-12 aus M ϕ zur Zytokinproduktion angeregt. TNF α wird durch M ϕ produziert und wirkt als autokriner Mediator, bei IFN- γ hingegen erfolgt die Bindung über Rezeptoren an der Oberfläche der M ϕ und IFN- γ induziert die Synthese von Sauerstoffradikalen, Stickstoffmonoxid und antimikrobieller Enzyme. Mit Hilfe dieser Moleküle können die M ϕ extra- und intrazelluläre Erreger effektiv zerstören. Immunogene Peptide der abgetöteten Erreger werden dann über MHC Klasse II-Moleküle naiven T-Zellen als Antigene präsentiert. Aktivierte M ϕ exprimieren mehr MHC Klasse II-Moleküle als ruhende M ϕ . Dies führt zu einer effektiveren Antigenpräsentation und einer verbesserten Aktivierung der T- und B-Zellen (WILTROUT u. VARESIO, 1990; JANEWAY u. TRAVERS, 1997).

2.2.4 B-Zellen

Die B-Zellen werden durch die Oberflächenmarker CD19 und CD45R (B220) charakterisiert (HATHCOCK *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1996). In der Klasse der APC nehmen die B-Zellen eine Sonderrolle ein, da sie Antigene über schon vorhandene antigenspezifische Rezeptoren erkennen. Durch ihre Oberflächenimmunglobuline sind B-Zellen in der Lage, lösliche Moleküle zu binden und anschließend Peptidfragmente als Peptid-MHC-Komplexe zu präsentieren. Dieser Mechanismus der Antigenaufnahme ist sehr effizient. Da die B-Zellen konstitutiv auf ihrer Oberfläche viele MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, entstehen sehr viele spezifische Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe. Kostimulatorische Moleküle exprimieren die B-Zellen nicht konstitutiv, können aber durch verschiedene mikrobielle Bestandteile dazu veranlasst werden. Dann sind die B-Zellen auch in der Lage, T-Zellen zu aktivieren. Ohne eine Infektion können deshalb lösliche Proteine keine Immunantwort auslösen und T-Zellen nicht aktivieren. Stattdessen führt die Antigenpräsentation ohne kostimulatorische Aktivität zu anergen (nicht reaktiven) T-Zellen (Toleranzinduktion; JANEWAY u. TRAVERS, 1997).

2.3 Der anatomische Bau der Peyerschen Platten und ihre immunologische Funktion

Die Peyerschen Platten (PP) sind Ansammlungen von Lymphfollikeln (*Noduli lymphatici aggregatii*) in der *Tela submucosa* des Dünndarms. Sie sind auf der antimesenterialen Seite des Darmes lokalisiert und finden sich hauptsächlich im Bereich des *Ileums*. Die Lymphfollikel erreichen in der Regel das Darmepithel und wölben dieses kuppelartig in das Darmlumen vor (Follikel assoziiertes Epithel (FAE); NEUTRA *et al.*, 1996). Im Bereich der PP befinden sich im Darmepithel sogenannte membranöse Zellen (M-Zellen). Diese Zellen kommen einzeln oder in kleinen Gruppen vor. Sie besitzen keinen deutlichen Mikrovillisaum und sind sehr flach (NEUTRA *et al.*, 1996; WEYRAUCH u. SMOLLICH, 1998). Die M-Zellen nehmen aus dem Darmlumen Antigene über Endozytose auf, schleusen es durch ihr Zytoplasma und geben es an der Basallamina durch Exozytose wieder ab (NEUTRA *et al.*, 1996; WEYRAUCH u. SMOLLICH, 1998). In diesem Bereich zwischen Epithel und PP, der subepithelialen Domregion (SED), befinden sich DC und M ϕ . Diese nehmen das Antigen auf, verarbeiten es gemäß ihrer Funktion als APC und präsentieren es den naiven T-Zellen in der interfollikulären Region (IFR; IWASAKI u. KELSALL, 2000). Im Keimzentrum (*Centrum*

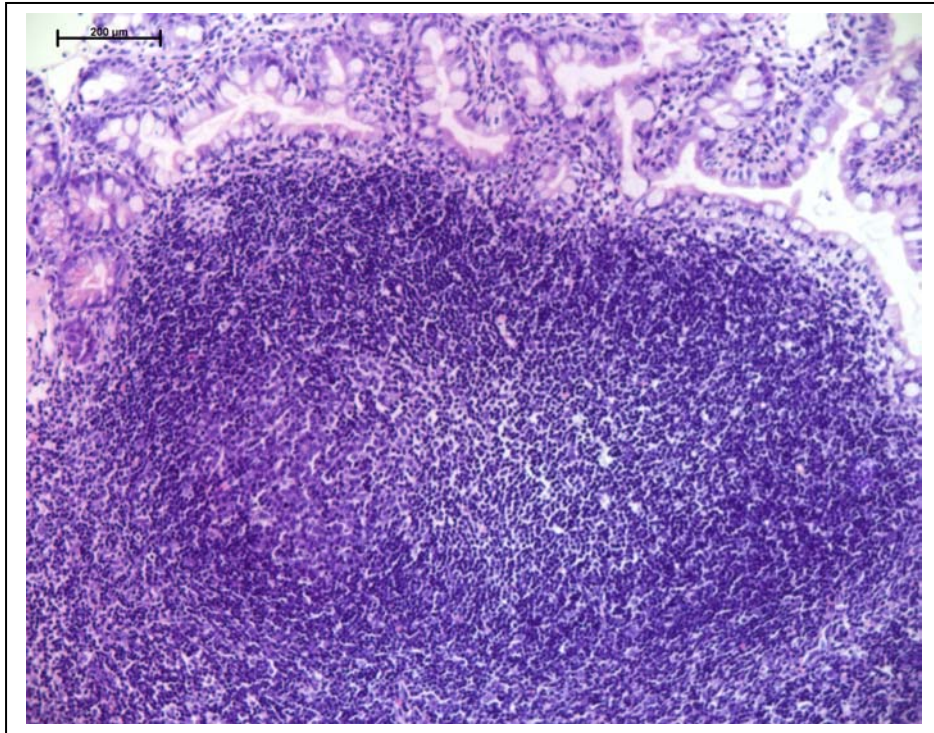


Abb. 3: **Eine Peyersche Platte im Dünndarm einer Maus im Querschnitt.**
Hämatoxylinfärbung

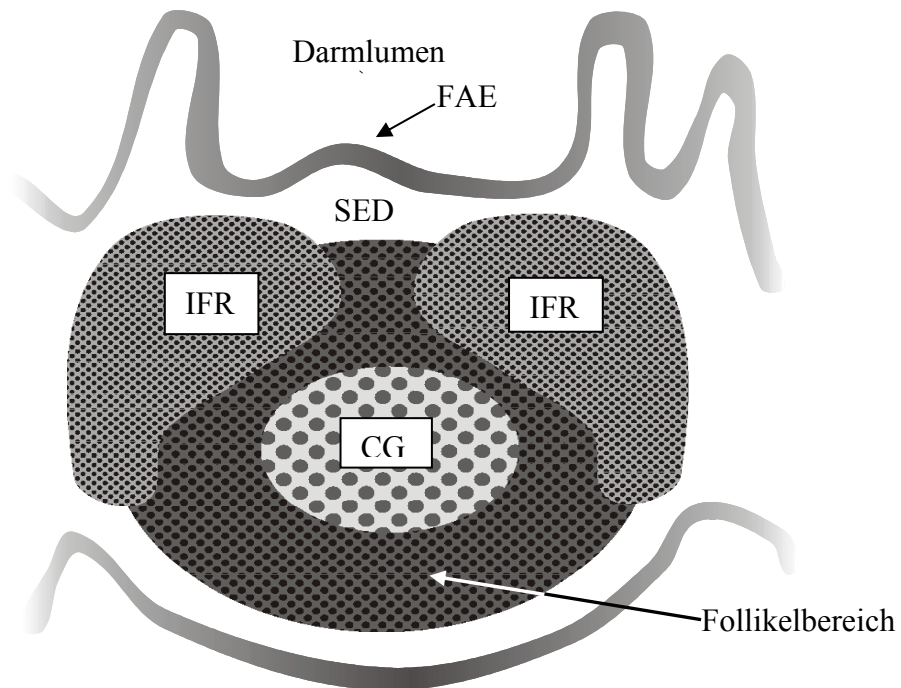


Abb. 4: **Schematischer Aufbau einer Peyerschen Platte**

- FAE: Follikel assoziiertes Epithel
 SED: subepitheliale Domregion
 IFR: interfollikular Region (T-Zell-Region)
 CG: Centrum germinativum

germinativum) des Lymphfollikel sind T-, B-, Plasma-Zellen und M ϕ zu finden (WEYRAUCH u. SMOLLICH, 1998) (Abb. 3 und Abb. 4).

Die Verteilung der verschiedenen Subpopulationen der DC in den Peyerschen Platten ist sehr unterschiedlich. CD8 α^+ DC befinden sich hauptsächlich in der SED, während CD8 α^- DC in der IFR lokalisiert sind. Eine weitere, nicht klassifizierte Subpopulation der DC ist nur intraepithelial in Kolokalisation mit den M-Zellen anzutreffen (IWASAKI u. KELSALL, 2001).

Die PP sind ein wichtiges lymphatisches Organ des Organismus, da über den oralen Weg sehr viele Antigene aufgenommen werden. Sie sind der Ort, in dem das Immunsystem über die Toleranz gegenüber Antigenen aus Nahrungsbestandteilen oder über die Immunantwort gegenüber pathogenen Antigenen entscheidet. Dabei spielen die M ϕ und DC eine wichtige Rolle, da sie entweder eine effektive, spezifische T-Zellantwort auslösen können oder aber regulatorische bzw. anerge T-Zellen induzieren.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Puffer und Lösungen

3.1.1 Standardpuffer

PBS 10-fach Konzentrat für ELISA und Histologie

KH ₂ PO ₄	26,0 mM
Na ₂ HPO ₄	104,0 mM
NaCl	1,4 M

in aqua dest.

PBS 1-fach Arbeitslösung

PBS 10x	10%(v/v)
---------	----------

in aqua dest.

PBS für die Zellkultur

KH ₂ PO ₄	15,0 mM
Na ₂ HPO ₄ × 2(H ₂ O)	130,0 mM
NaCl	137,0 mM
KCl	2,6 mM

pH 7,4 (einstellen mit NaOH oder HCl)

in aqua dest.

3.1.2 Puffer, Lösungen und Medien für Salmonellen und Zellkultur

Kulturmedium für Salmonellen:

LB-Medium:

Hefextrakt	1,0% (w/v)
Pepton	0,5% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)
NaOH 1N	0,1% (w/v)

in aqua dest.

LB-Agar:

Agar-Agar	1,5% (w/v)
NaOH 1N	0,4% (v/v)

in LB-Medium

Einfriermedium für Salmonellen:

DMSO	10,0% (v/v)
------	-------------

in PBS

Zellseparationspuffer:

EDTA	1,0 mM
Hepes-NaCl	10,0 mM
Bovines Serumalbumin	0,5% (w/v)
NaCl	137,0 mM
pH 7,4 (einstellen mit NaOH oder HCl)	
in aqua dest.	

Puffer zur oralen Infektion von Mäusen:

NaHCO ₃	3,0% (w/v)
in PBS	

3.1.4 Puffer und Lösungen für ELISAABTS-Konzentrat:

ABTS	1,0% (w/v)
in aqua dest.	

Mc Ilvain´s Puffer:

Lösung A: NaH ₂ PO ₄	200,0 mM
Lösung B: Zitronensäure	110,0 mM
Gebrauchslösung:	
Lösung A	46,8% (v/v)
Lösung B	53,2% (v/v)
pH 4,6 (einstellen mit NaOH oder H ₃ PO ₄)	

ABTS Arbeitslösung:

ABTS-Konzentrat	10,0% (v/v)
H ₂ O ₂ , 30%ig	0,1% (v/v)
in Mc Ilvain´s Puffer	

Blockierungspuffer für ELISA:

Ziegennormalserum	20,0% (v/v)
in PBS	

Gelatine-Konzentrat:

Gelatine (Schwein)	2,0% (w/v)
in aqua dest.	

PBS-Tween:

Tween [®] 20	0,05% (v/v)
in PBS	

Probenverdünnungspuffer:

Gelatine-Konzentrat	5,0% (v/v)
Bovines Serumalbumin	0,5% (w/v)
in PBS	

3.1.5 Puffer und Lösungen für immunhistochemische UntersuchungenFixierlösungen:

Azeton	100,0 %
Formaldehydlösung	4,0% (v/v)
Glutaraldehydlösung	3,0% (v/v)
Saccharoselösung	20,0% (w/v)

Blockierungspuffer für endogene Peroxidase:

Wasserstoffperoxid	0,5% (v/v)
in Methanol	

Blockierungspuffer:

Ziegennormalserum	20,0% (v/v)
in PBS	

AEC-Substratkit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA):

Buffer-Stock-Solution	2 Tropfen
AEC-Stock-Solution	3 Tropfen
Hydrogen-Peroxidase-Solution	2 Tropfen
in 5ml aqua dest.	

Hämatoxylin für die Kernfärbung
Kaisers Glyzeringelatine zum Eindecken

3.1.6 Puffer für durchflusszytometrische UntersuchungenFACS-Puffer für extrazelluläre Oberflächenmarkerfärbung:

Fetales Kälberserum	1,0% (v/v)
in PBS	

FACS-Puffer für intrazelluläre Antigenfärbung:

Fetales Kälberserum	1,0% (v/v)
Saponin	0,1% (w/v)
in PBS	

FACS-Fixierpuffer:

Formaldehydlösung 4% (v/v)
in PBS

3.1.7 verwendete Antikörper

antigenspezifischer Isotypen ELISA:

Antigen *Salmonella* Enteritidis inaktiviert 1×10^7 KbE-Äquivalente/ml,
100 µl/Kavität

Detektionsantikörper Ratte-anti-Maus IgG1 POD, monoklonal (Southern Biotechnologies, Birmingham, UK)
Ratte-anti-Maus IgG2a POD, monoklonal (Southern Biotechnologies)
Ratte-anti-Maus IgA POD, monoklonal (Southern Biotechnologies)

Immunhistochemische Untersuchungen:

Anti-Salmonellenserum Kaninchen-anti-*S. Enteritidis*, polyklonales Serum

Detektionsantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG H+L POD, polyklonal (Southern Biotechnologies)

Durchflusszytometrische Untersuchungen und konfokale Mikroskopie:

Anti-Salmonellenserum Kaninchen-anti-*S. Enteritidis*, polyklonales Serum

Detektionsantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG H+L FITC, polyklonal (Southern Biotechnologies)

Antikörper gegen
Oberflächenmoleküle Ratte-anti-Maus CD11c FITC, monoklonal (Caltag Laboratories Burlingame, CA, USA)
Ratte-anti-Maus F4/80 RPE, monoklonal (Caltag Laboratories)
Ratte-anti-Maus CD11c RPE, monoklonal (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
Ratte-anti-Maus CD11b FITC, monoklonal (Caltag Laboratories)
Ratte-anti-Maus B220 RPE, monoklonal (Caltag Laboratories)
Ratte-anti-Maus CD19 FITC, monoklonal (Pharmingen)
Ratte-anti-Maus CD8α RPE, monoklonal (Caltag Laboratories)
Ratte-anti-Maus CD4 FITC, monoklonal (Pharmingen)

3.2 Verwendete Bakterienstämme für *In-vitro*- und *In-vivo*-Infektionen

Für die Infektionsversuche wurden der auxotrophe (ade^-/his^-) Impfstamm *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis SalmoVac[®] und der schwach virulente Elternstamm *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis 64/03 (ade^+/his^+) des Impfstoffwerk-Dessau-Tornau verwendet (SPRINGER *et al.*, 2000; LEHMANN *et al.*, 2001).

3.2.1 Kultivierung der Bakterienstämme

Die *S. Enteritidis*-Stämme wurden bei -80 °C in DMSO-haltigem PBS-Puffer gelagert. Zum Ausverdünnen des DMSO nach dem Auftauen wurde die Salmonellensuspension in ein 2 ml-Eppendorfröhrchen überführt und mit 1,5 ml kaltem PBS-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei $4.000 \times g$ für fünf Minuten bei 4 °C . Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet in der benötigten Menge PBS-Puffer aufgenommen.

Als Kultivierungsmedium für *S. Enteritidis* wurde Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) verwendet. Es wurde eine Vorkultur mit 20 ml LB-Medium angelegt. Das Animpfen der Kultur erfolgte entweder mit aufgetauter Salmonellensuspension oder von einer Agarkultur. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bebrütet. Für die Hauptkultur wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml der Vorkultur versetzt. Die Hauptkultur wurde acht Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und dann geerntet. Dazu erfolgte die Zentrifugation bei $4.000 \times g$ für 15 Minuten bei 4 °C in 50 ml Röhrchen. Überstände wurden verworfen und die Salmonellen in kaltem PBS-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt (Waschschritt). Die Salmonellen wurden in 15 ml PBS aufgenommen, mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und eingefroren. Durch das Einfrieren von 1 ml-Portionen konnten für die Infektionsversuche identische Infektionsdosen genutzt werden. Die Gesamtkeimzahl der Portionen wurde durch Auftauen und Ausplattierung einer Portion ermittelt (Kap. 3.2.3).

Um die Invasivität der Salmonellen zu beeinflussen, wurden diese auch in einem speziellen Mangelmedium kultiviert. Dieses wurde von Dr. Schrödl (Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Salmonellen wurden in diesem Medium für 72 Stunden inkubiert und dann geerntet. Mit diesem Mangelmedium wurden deutlich niedrigere Bakterienmengen gewonnen als durch Kultivierung in LB-Medium.

3.2.2 Vorbereitung von *S. Enteritidis* für *In-vitro*- und *In-vivo*-Infektion

Zur Infektion von Zellkulturen oder Mäusen kamen eingefrorene Salmonellen zur Anwendung. Die Salmonellen wurden wie in Kap. 3.2.1 beschrieben aufgetaut und im entsprechenden Volumen aufgenommen, um die gewünschte Keimzahl pro ml zu erhalten. Für die Infektion von Zellkulturen erfolgte eine Aufnahme der Salmonellen in PBS-Puffer oder Zellkulturmedium. Die Salmonellen für die Infektion der Mäuse wurden in PBS-Puffer mit 3 % (w/v) Natriumbikarbonat aufgenommen, um die Magensäure der Mäuse geringgradig abzupuffern. Die aktuelle Infektionsdosis wurde gezielt aus jedem Inokulum bestimmt (siehe Kap. 3.2.3).

3.2.3 Bestimmung der Gesamtkeimzahl aus Suspensionen und Organen

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl aus Organen, z.B. Milz, Darmlymphknoten und Peyersche Platten (PP), wurden diese mit Hilfe von Zellsieben mit einer Porengröße von 40 µm (Cellstrainer™, Falcon, BD, Heidelberg, Deutschland) homogenisiert. Die Suspension aus den Organen oder die Salmonellensuspension für Infektionen wurde in 96-well-Gewebekulturplatten seriell 1 : 10 verdünnt. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 10 µl auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar nach Taylor (XLD-Agar, Mikrobiologie Handbuch, Merck, Oktober 1996) ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C im Trockenbrutschrank.

Die Anzahl der gewachsenen Salmonellenkolonien wurde als Gesamtkeimzahl pro ml Ausgangssuspension berechnet. Daraus wurde der Keimgehalt für das gesamte Organ bestimmt.

Die PP wurden vor der Homogenisierung für eine Stunde in Zellkulturmedium (RPMI 1640) mit 0,1 mg/ml Gentamicin inkubiert, um eine Kontamination mit Salmonellen aus dem Darmlumen zu verhindern.

3.3 Die Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Die aus BALB/c-Mäusen isolierte Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurde in ISCOVE's Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen mit PBS für die Zellkultur gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in neue Kulturflaschen überführt.

Für die *In-vitro*-Infektionsversuche der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit *S. Enteritidis* wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 25 cm²-Zellkulturflasche oder 5×10^7 Zellen pro 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Für die Dauer von drei Stunden erhielten die M ϕ in Zellkulturmedium (ISCOVE's) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Spannung die Möglichkeit erneut zu adhären. Ihre gesamten "immunologischen" Funktionen sind erst bei vollständiger Adhärenz ausgeprägt (JANEWAY u. TRAVERS, 1997). Die Zellen wurden dann mit der entsprechenden Anzahl Salmonellen infiziert (1 Salmonelle pro M ϕ , bis 1.000 Salmonellen pro M ϕ). Der eigentliche Zeitraum der Infektion umfasste eine Stunde, während der die M ϕ die Salmonellen phagozytieren konnten. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die noch nicht phagozytierten Salmonellen mit PBS-Puffer abgewaschen. Die M ϕ wurden dann noch mindestens eine Stunde in gentamicinhaltigem Zellkulturmedium (0,1 mg/ml Gentamicin) inkubiert, um die nicht durch das Waschen entfernten, extrazellulär verbliebenen Bakterien abzutöten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung aus den Flaschen abgelöst und geerntet. Die Zellen wurden dann entweder durch Ausplattieren, mit Hilfe der Durchflußzytometrie oder über Elektronenmikroskopie analysiert.

Zur Vorbereitung infizierter Zellen für die Immunhistochemie wurden die M ϕ auf Kammerobjektträgern (ChamberSlides™, Nunc) ausgesät. Dazu wurden in einem Objektträger mit acht Kammern 5×10^4 Zellen pro Kammer in 200 μ l Zellkulturmedium (ISCOVE's) ausgesät. Die Zellen erhielten wiederum Gelegenheit zu adhären und wurden im gewünschten Infektionsverhältnis mit *S. Enteritidis* infiziert. Nach der Infektion folgte auch hier ein Waschschrift mit PBS-Puffer und die Inkubation in gentamicinhaltigem Medium. Das Zellkulturmedium wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgegossen, die Kammern vom Objektträger entfernt und der Objektträger in einem Becherglas mit PBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für zehn Minuten in Azeton bei 4 °C. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C gelagert.

3.4 Verwendete Versuchstiere, *In-vivo*-Infektion und Gewinnung von Untersuchungsmaterial

3.4.1 Genetischer Hintergrund und Zucht und Haltung der verwendeten Versuchsmäuse

Für die *In-vivo*-Versuche wurden sechs bis acht Wochen alte Inzuchtmäuse vom Stamm BALB/c verwendet (The Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA). Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte in einem spezifisch pathogenfreien Bereich (SPF). Futter und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung (Ausnahme siehe Kap. 3.4.2). Alle Gegenstände und Abfälle, die den infektiösen Bereich verließen, wurden autoklaviert. Es erfolgte eine halbjährliche Überprüfung des Hygienestatus durch Untersuchung von Seren der Tiere auf virusspezifische Antikörpertiter (Untersuchung unter anderem auf Antikörper gegen murine Hepatitisviren, Reoviren, Sendaiviren, murine Pneumoviren) im Labor für biomedizinische Diagnostik (Prof. Kraft, Bio Doc, Hannover). Die bakteriologische und die parasitologische Untersuchung erfolgte im Institut für Bakteriologie und Mykologie (Frau Prof. Krüger) und im Institut für Parasitologie (Frau Prof. Ribbeck) der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Für alle Versuchsmäuse lag ein genehmigter Tierversuchsantrag beim Regierungspräsidium Leipzig vor (Genehmigung vom 29.05.98, Tierversuchsvorhaben 01/98).

Der Mausstamm BALB wurde 1913 von H. J. Bagg als „Bagg Albino“ entwickelt. Die Inzucht erfolgte zuerst 1923 durch Mc Dowell (Mouse Genome Informatics). Dieser Stamm zeichnet sich durch eine genetisch determinierte Empfänglichkeit für intrazelluläre Erreger (Leishmanien, Mykobakterien, Salmonellen) aus (immunity against typhimurium, *ity^s*). Die Suszeptibilität beruht auf einer Mutation im Genlocus *nramp1* (natural resistance associated macrophage protein 1), die zur Expression eines fehlerhaften Proteins führt (GOVONI *et al.*, 1999; ATKINSON u. BARTON, 1999; HACKAM *et al.*, 1998; NORTH *et al.*, 1999). Das Nramp-1 gehört zur Familie der Transporterproteine für zweiwertige Metallionen und ist in besonders hoher Konzentration an späten Endosomen und Lysosomen zu finden (TABUCHI *et al.*, 2000). Mit diesem Protein werden Fe^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen gebunden, um sie dem Zugriff der Bakterien zu entziehen (KEHRES *et al.*, 2000).

Für die *In-vivo*-Infektionsversuche wurden BALB/c-Wildtyp-Mäuse (BALB/c-WT-Mäuse) und in späten Versuchen auch gentechnisch veränderte Mäuse verwendet (BALB/c IL-12p35^{-/-}). BALB/c-WT-Mäuse besitzen ein intaktes, vollständiges Genom (Ausnahme Nramp 1), welches sie dazu befähigt, alle natürlichen Strukturen und Moleküle zu bilden, die in Mäusen vorkommen. Die gentechnisch veränderten Mäuse besitzen ein zusätzliches

defektes Gen, das dazu führt, dass sie eine Untereinheit des Interleukins-12 (IL-12) nicht produzieren können. IL-12 besteht aus zwei Proteinen, einem Protein, das 35 kDa groß ist und einem Protein von 40 kDa Größe. Das funktionelle IL-12 ist ein Heterodimer mit einer Größe von 75 kDa (TRINCHIERI, 1998 a). IL-12p35-gendefiziente Mäuse können die 35 kDa-Untereinheit nicht bilden, aber die 40 kDa-Untereinheit. Diese IL-12p40 Untereinheit wird von den produzierenden Zellen sezerniert und besitzt als Homodimer immunmodulierende Funktion (GILLESSEN *et al.*, 1995).

Ein Teil der BALB/c-IL-12p35-gendefizienten-Mäuse wurde mit anti-IL-12p40-Antikörpern am Tag 2 und 1 vor der oralen Infektion mit Salmonellen behandelt. Sie erhielten 100 µg Antikörper (Klon 10F6, THOMPSON-SNIPES *et al.*, 1998) in PBS mit 1 % Mausnormalserum *intra peritoneal* appliziert. Dadurch wurden diese Mäuse phänotypisch zu IL-12p35/p40-defizienten Tieren.

3.4.2 Die orale Infektion der Mäuse mit *S. Enteritidis*

Die intragastrikale Applikation von *S. Enteritidis* erfolgte mit Hilfe einer Knopfkanüle (HEILAND VET GmbH, Hamburg, Deutschland). Die nicht sedierten Mäuse wurden mit der Hand fixiert und die Kanüle über die Maulhöhle in den Magen eingeführt. Es können mit dieser Methode maximal 200 µl eingegeben werden. Die Mäuse wurden danach wieder in ihren Käfig zurückgesetzt und für einige Minuten beobachtet, um ihr Allgemeinverhalten zu kontrollieren.

Um die Auswirkung von Hungerperioden auf die Infektion zu prüfen, wurde einem Teil der Mäuse 12 Stunden vor und 12 Stunden nach der Infektion das Futter entzogen. Da diese Mäuse dazu neigten Einstreu aufzunehmen, wurde auch diese während der Hungerperiode aus dem Käfig entfernt.

3.4.3 Blutabnahme aus dem retroorbitalen *Plexus* von narkotisierten Mäusen (FRIEDEL *et al.*, 1975)

Zur Blutentnahme aus dem retroorbitalen Plexus ist ein Narkotisieren der Mäuse nötig. Die Tiere erhielten dafür Ketamin[®] (100,0 mg/kg KM; WDT, Garbsen) und Rompun[™] (5,0 mg/kg KM; Bayer AG, Leverkusen) als Mischung *intraperitoneal* injiziert. (Die chirurgische Toleranz ist nach 7 bis 8 Minuten erreicht.) Die Tiere wurden daraufhin in Bauchlage mit der linken Hand am Hinterkopf fixiert. Mit der rechten Hand wurde ein Kapillarröhrchen im

A:



B:



Abb. 5: **Blutabnahme aus dem retroorbitalen Plexus von narkotisierten Mäusen**

A:

- Fixieren des Kopfes mit der linken Hand,
- Stauen der *Vena jugularis* mit dem linken Daumen,
- Mit dem Kapillarröhrchen am Bulbus vorbei auf den Augenhintergrund eingehen.

B:

- Durch Drehbewegung unter leichtem Druck den Plexus eröffnen
- Das Kapillerröhrchen wird herausgezogen und austretendes Blut durch Kapillarkräfte in das Röhrchen aufgenommen.

medialen Augenwinkel am Bulbus vorbei bis auf den Augenhintergrund eingeführt (Abb. 5A).

Durch mäßigen Druck und leichte Drehbewegungen wurde der retroorbitale Plexus eröffnet. Stauen im Bereich *der Vena jugularis* mit dem linken Daumen führte zu kontinuierlichem Blutaustritt aus dem Plexus. Das Blut konnte außen am medialen Augenwinkel in die Kapillare aufgenommen werden (Abb. 5B). Mit dieser Methode können einer Maus ohne Schaden $1 \times$ pro Woche bis zu 200 μ l Blut entnommen werden. Durch Abstauen und leichtes Eindrücken des Bulbus in die Orbita wurde die Blutung zum Stillstand gebracht. Nach Säuberung der Augenpartie wurden die Mäuse in Seitenlage in ihren Käfig zum Aufwachen gelegt. Die Narkose hält ca. 2 Stunden an, wobei die Analgesie für diesen schmerzhaften Eingriff nur in der ersten halben Stunde ausreichend ist. Bei sachgemäßer Durchführung zieht diese Methode der Blutentnahme keine Erblindung oder andere Beeinträchtigungen der Mäuse nach sich.

Das Serum wurde nach dem Koagulieren aus dem Vollblut durch Zentrifugation bei $4.000 \times g$, 10 min, 4 °C gewonnen. Dieses wurde dann für die Untersuchungen im ELISA verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

3.4.4 Sektion der infizierten Mäuse

3.4.4.1 Tötung

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Chloroform betäubt und durch anschließendes Ausbluten getötet.

3.4.4.2 Gewinnung von Herzblut

Zur Gewinnung von Herzblut (Ausbluten) wurde der Tierkörper in Rückenlage auf einer Unterlage fixiert. Thorax und Abdomen wurden mit Desinfektionslösung befeuchtet, um eine Kontamination durch abgeschnittene Haare zu vermeiden. Das Fell wurde entlang der *Linea alba* auf ganzer Länge geöffnet und seitlich fixiert. Zur Eröffnung des Thorax wurde das Sternum abgesetzt. Das Herz, welches jetzt frei zugänglich war, wurde mit einem Scherenschlag geöffnet und das austretende Blut aus dem Thorax mit Hilfe einer Pipette aufgenommen.

3.4.4.3 Organentnahme

Nach dem Töten der Mäuse durch Ausbluten erfolgte die sterile Entnahme der Organe. Dazu wurde das Abdomen eröffnet, so dass die intraabdominalen Organe frei lagen (Abb. 6A). Zuerst wurde die auf der linken Seite befindliche Milz entnommen (Abb. 6A, 6B). Zur Präparation der Darmlymphknoten und der PP wurde das gesamte Darmpaket *in situ* aus dem Tierkörper herausgenommen (Abb. 6C). Die Darmlymphknoten befinden sich im großen Netz im Bereich des Überganges von *Jejunum* zum *Caecum*. Die drei bis vier hellgrauen, stechnadelkopfgroßen Knötchen wurden aus dem in der Regel sehr fettreichen Netz herauspräpariert. Um die PP zu präparieren, musste das gesamte Netz vom Dünndarm entfernt werden. Die PP befinden sich auf der antimesenterialen Seite des Darmes und sind nach dem Ausbreiten des Darmes als grauweiße Erhebungen auf der Darmwand erkennbar (Abb. 6D). Durch tangentielle Schnitte wurden sie mit möglichst geringer Öffnung des Darmlumens vom Darm abgetrennt. Die Verteilung der PP auf die Länge der Darmabschnitte folgt keiner Gesetzmäßigkeit. Im Mittel konnten pro Maus neun bis zwölf PP gewonnen werden.

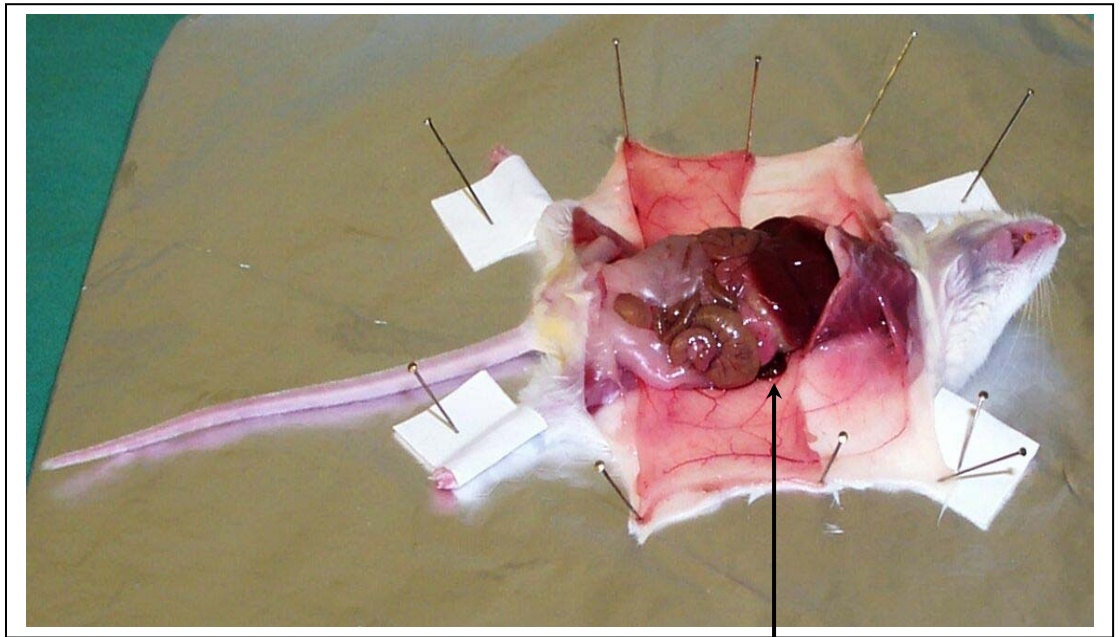
Alle Organe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung in sterilem, kaltem Zellkulturmedium (RPMI 1640) gelagert.

3.5 Isolierung von Einzelzellen aus den Organen und Separation von Dendritische Zellen und Makrophagen

3.5.1 Isolierung von Einzelzellen aus den Peyerschen Platten, den Darmlymphknoten und der Milz

Zur Gewinnung von Einzelzellen wurden die Organe mit einer scharfen Schere in 10 ml Medium I zerkleinert. Nach Überführung der Organteile samt Medium in einen 100 ml Glaskolben wurden zu der Suspension 100 μ l Kollagenase D-Stammlösung hinzugegeben (Endkonzentration 0,1 mg/ml). Die Kolben wurden auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und durch ein Zellsieb mit der Porengröße 100 μ m in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Gewebestücke im Kolben wurden erneut mit kollagenasehaltigem Medium I aufgefüllt und für weitere 30 min bei 37 °C verdaut. Im Anschluss wurden die Gewebestücke mit dem Überstand durch das Zellsieb in das 50 ml-Röhrchen passiert. Es erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 \times g, 4 °C für 6 min. Die Zellen wurden anschließend in Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

A



Milz

B

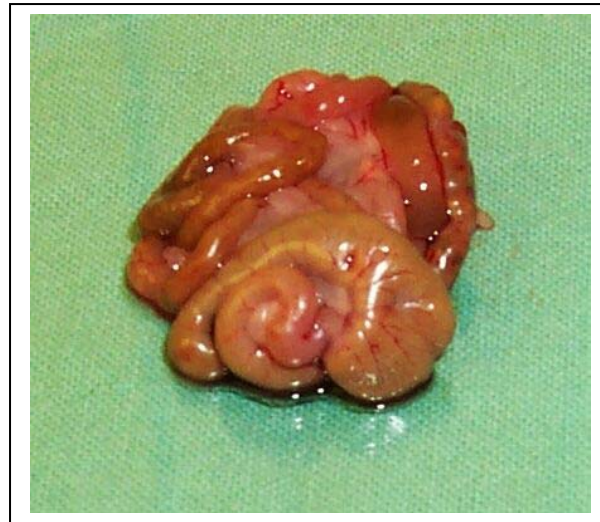


Abb. 6 A/B: Sektionssitus und Organe einer Maus

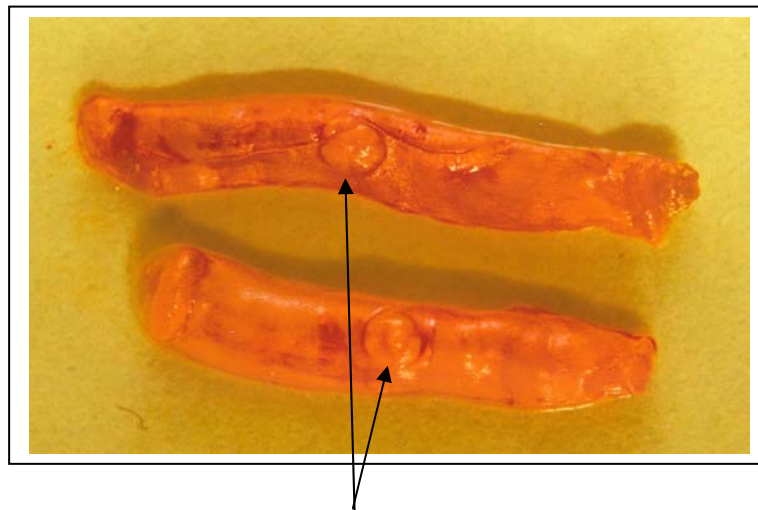
A: Sektionssitus einer Maus, Vorbereitung zur Organentnahme

B: Milz einer Maus, doppelte natürliche Größe

C



D



Peyersche Platten

Abb. 6 C/D: Fortsetzung

Abb. C: vollständiges Darpaket nach Entnahme aus dem Abdomen, Vergrößerung 1,5x
Abb. D: Dünndarmabschnitte mit Peyerschen Platten, Vergrößerung 5x

3.5.2 Bestimmung der Anzahl extrazellulär vorliegender Salmonellen

Während der Isolierung der Einzelzellen aus den Organen fällt ein Zentrifugationsüberstand an. Da die Zellen mit $300 \times g$ abzentrifugiert wurden, können sich extrazelluläre Salmonellen im Überstand befinden. Der Überstand wurde deshalb bei $4.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min erneut abzentrifugiert. Das anfallende Pellet wurde nach dem Abgießen der Flüssigkeit in 1 ml PBS aufgenommen und auf einer XLD-Agarplatte ausplattiert. Nach dem Eintrocknen der Suspension wurde der Agar bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 Stunden im Trockenbrutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der gewachsenen Salmonellenkolonien.

3.5.3 Separation von phagozytierenden Zellen aus den Einzelzellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Isolierung der Einzelzellen wurden die phagozytierenden Zellen über Dichtegradientenzentrifugation separiert. Dabei wurde die unterschiedliche spezifische Dichte der Zellpopulationen ausgenutzt. Die Dichte der DC und der M ϕ beträgt $1,068 \text{ g/ml}$. Das Zellpellet der Einzelzellen wurde in 3 ml HBSS-Lösung aufgenommen und mit einem Milliliter OptiPrep™ versetzt (= 17 %ige OptiPreplösung). Diese Suspension wurde mit 5 ml einer 12 %igen OptiPreplösung (Dichte = $1,068 \text{ g/ml}$, 41 ml Zellseparationspuffer + 10 ml OptiPrep™) überschichtet. Darauf folgten 2 ml HBSS-Lösung. Die Herstellung des Gradienten erfolgte in einem 15 ml-Röhrchen (Abb. 7 und Abb. 8). Der Gradient wurde im Anschluss bei $600 \times g$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min ohne Bremse zentrifugiert (RUEDL *et al.*, 1996). Die phagozytierenden Zellen reicherten sich in der oberen Interphase des Gradienten an. In der unteren Interphase befanden sich B- und T-Zellen. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden mit Hilfe von Pasteurpipetten gewonnen und einem Waschschrift in HBSS-Lösung unterzogen ($300 \times g$, 6 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Danach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer. Die Zusammensetzung der Zellpopulationen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt (Kap. 3.7.1).

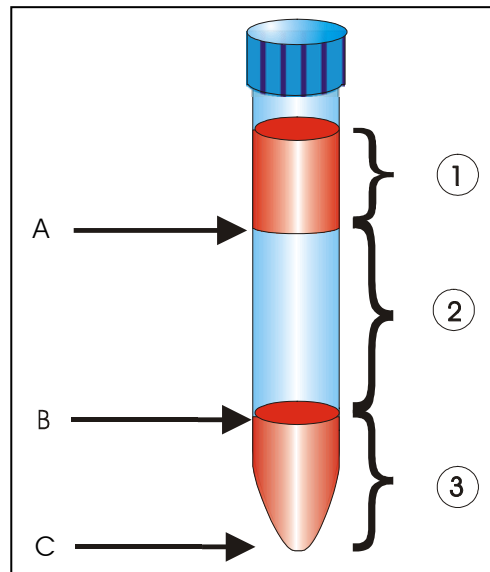


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Dichtegradienten zur Separation von Dendritischen Zellen und Makrophagen

A = Zwischenphase A = phagozytierende Zellen
 B = Zwischenphase B = B- und T-Zellen
 C = Pellet = Restzellen

1 = HBSS-Lösung
 2 = 4.1-Puffer + OptiPrep™, Dichte = 1,068g/ml
 3 = HBSS-Lösung + OptiPrep™, Dichte = 1,084g/ml

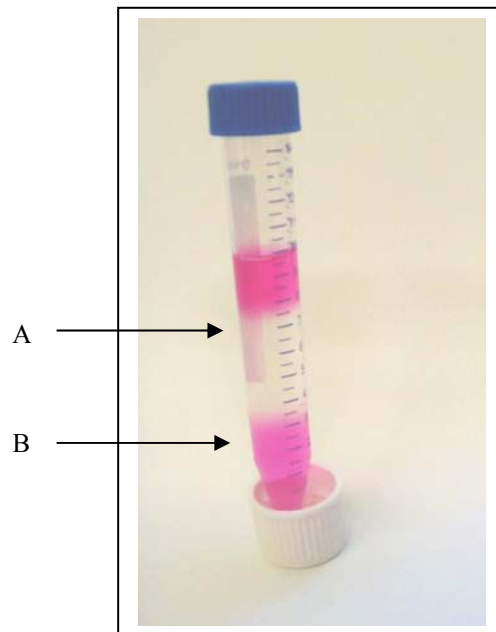


Abb. 8: Dichtegradient zur Separation von Dendritischen Zellen und Makrophagen

A: phagozytierende Zellen
 B: B- und T-Zellen

3.5.4 Aufreinigung der DC über durchflusszytometrische Zellsortierung

Nach der Separation über Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellen mit einem RPE markiertem anti-CD11c-Antikörper für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend in einem Durchflusszytometer sortiert (FACStar Plus, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Diese Gerät sortiert die Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften in RPE-positive (DC) und RPE-negative Zellen. Damit konnte ein Reinheitsgrad der Zellen von 90 % erreicht werden. Diese aufgereinigten Zellen wurden für die *In-vitro*-Infektion (Kap. 3.5.5) verwendet.

3.5.5 *In-vitro*-Infektion von primären Zellen mit *S. Enteritidis*

Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die DC in 1,5 ml Zellkulturmedium (RPMI 1640) aufgenommen und mit *S. Enteritidis* infiziert. Die Zellen wurden für eine Stunde in Gegenwart von *S. Enteritidis* im Zellkulturbrutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Spannung inkubiert. Danach erfolgte die Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation und ein Waschschrift mit PBS-Puffer (300 × g, 6 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden dann für die elektronenmikroskopische Analyse vorbereitet (Kap. 3.9.3).

3.5.6 Bestimmung der Anzahl infizierter Zellen durch Ausplattieren der isolierten Zellen auf Agarplatten

Durch das Ausplattieren von intakten Zellen auf XLD-Agar kann die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die lebende Salmonellen enthalten. Die aufgetragenen Zellen lysieren während des Eintrocknens der Suspension und geben dadurch die intrazellulär gelegenen Salmonellen frei, die auf dem Agar zu sichtbaren Kolonien auswachsen können. Mit dieser Methode kann jedoch nicht differenziert werden, wieviele lebende Salmonellen in einer Zellen enthalten sind (TANG *et al.*, 1993).

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^7 Einzelzellen bzw. alle gewonnenen Zellen der Fraktion der phagozytierenden Zellen und der Fraktion der B- und T-Zellen einer Maus auf eine Agarplatte ausplattiert. Aus einer Maus konnten ca. $2,5 \times 10^6$ Phagozyten und ca. 5×10^6 Zellen der B- und T-Zellen isoliert werden. Nach dem Eintrocknen der Suspension wurde der Agar bei 37 °C für 15 bis 18 Stunden im Trockenbrutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der gewachsenen Salmonellenkolonien.

In Vorversuchen war durch mikroskopische Kontrolle festgestellt worden, dass bei der Ausplattierung von 1×10^7 Zellen alle Zellen einzeln lagen und ihr Abstand groß genug war, um ein Konfluieren der wachsenden Salmonellenkolonien zu verhindern. Dafür durften die Salmonellenkolonien jedoch nicht zu lange wachsen, sondern mussten bereits nach 15 Stunden Inkubation kontrolliert werden. Dieser Umstand war jedoch nur für infizierte Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 von Bedeutung. Nur bei Ausplattierung *in vitro* infizierter Zellen war die Anzahl der Zellen, die lebende Salmonellen tragen, so hoch, dass mehrere infizierte Zellen nebeneinander liegen und die Salmonellenkolonien während der Wachstumsphase konfluieren würden. Da nur sehr wenige Einzelzellen, die aus einer oral infizierten Maus separiert wurden, lebende Salmonellen trugen, erfolgte ein komplettes Auftragen dieser Zellen einer Maus auf eine Agarplatte.

3.6 Bestimmung der antigenspezifischen Antikörpertiter im Serum (ELISA)

Zur Untersuchung der Serumproben auf Salmonellenantigen-spezifische Antikörper ist in unserem Labor ein spezifischer Antigen-ELISA entwickelt worden (Jörg Lehmann, persönliche Mitteilung). ELISA-Platten (Polysorp™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurden mit *Salmonella* Enteritidis-Antigen beschichtet. Dazu wurden hitzegetötete und kryolysierte Salmonellen in einer Konzentration von 1×10^5 KbE-Äquivalente pro ml in PBS verwendet (100 µl/Kavität). Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden nach zwei Waschschritten mit PBS 200 µl PBS-Puffer mit 0,05 % Tween® 20 (v/v) und 20 % Ziegennormalserum (v/v) pro Kavität aufgetragen. Das Blockieren erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Serumproben und ein Kontrollnormalserum einer naiven Maus in seriellen Verdünnungen (verdünnt in Serum-Verdünnungs-Puffer) aufgetragen. Die Proben verblieben über Nacht bei 4 °C in der Platte. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween® 20 wurde ein Peroxidase markierter Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper in der Verdünnung 1 : 5.000 als Detektionsantikörper verwendet. Dieser verblieb entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf der Platte.

Die Substratreaktion erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween® 20 mit ABTS-Reagenz. Die Umsetzungsreaktion wurde nicht abgestoppt. Die Extinktionsmessung erfolgte im ELISA-Reader (Mikrotiterplattenspektrophotometer, Molecular Devices, Menlo Park, USA) bei einer Wellenlänge von 415 nm nach 15 min Entwicklungszeit.

Als Ergebnis wird für die Serumproben ein antigenspezifischer Antikörpertiter angegeben. Dieses ist der reziproke Wert der ersten Verdünnungsstufe, in der die Extinktion der Probe kleiner oder gleich der doppelten Extinktion des Kontrollserums in der entsprechenden Verdünnungsstufe ist.

Mit Hilfe der Detektionsantikörper Ziege-anti-Maus-IgG1-POD, Ziege-anti-Maus-IgG2a-POD und Ziege-anti-Maus-IgA-POD konnten die Titer der antigenspezifischen murinen Immunglobulinisotypen bestimmt werden.

3.7 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden Einzelzellen benötigt, die in Suspension vorlagen. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich entweder um frisch isolierte Zellen aus Mäusen oder um geerntete Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7. Pro Probenansatz waren mindestens 1×10^6 Zellen nötig. Diese Anzahl Zellen wurde in 100 μ l PBS-Puffer mit 1 % (v/v) FKS aufgenommen.

3.7.1 Extrazelluläre Fluoreszenzfärbung von Zelloberflächenmarkern

Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden direktmarkierte Antikörper verwendet. Vor dem eigentlichen Färbeschritt erfolgte eine Blockierung von unspezifischen Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit einem unmarkierten anti CD16/CD32-Antikörper (Southern Biotechnology) für 20 min bei Raumtemperatur. Je Probenansatz wurden die Zellen anschließend mit 1 μ l des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Oberflächenantikörper in 4 ml-FACS-Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson) gefärbt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei $300 \times g$, 4 °C für 4 min dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland; Kap. 3.7.3) wurden die Zellen in 100 bis 200 μ l FACS-Fixierpuffer aufgenommen.

Die Antikörper wurden kombiniert eingesetzt, das heißt die Zellen wurden gleichzeitig mit einem FITC-markierten Antikörper und mit einem RPE-markierten Antikörper gefärbt.

Folgende Antikörperdoppelmarkierungen wurden verwendet:

Oberflächenmoleküle der M ϕ :	Anti-CD11b RPE	Anti-F4/80 FITC
Oberflächenmoleküle der DC:	Anti-CD8 α RPE	Anti-CD11c FITC
Oberflächenmoleküle der B-Zellen:	Anti-B220 RPE	Anti-CD19 FITC
Oberflächenmoleküle der T-Zellen:	Anti-CD8 α RPE	Anti-CD4 FITC

3.7.2 Intrazelluläre Fluoreszenzfärbung von Salmonellenantigenen

Für die intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mussten die eingesetzten Zellen permeabilisiert werden, damit die Antikörper in die Zelle gelangen konnten. Dazu wurden die Zellen zuerst mit phosphatgepufferter Paraformaldehydlösung (4 %ig w/v) für 10 min bei 4°C fixiert. Das Fixans wurde mit FACS-Puffer ausverdünnt und die Zellen bei 300 × g, 6 min, 4 °C abzentrifugiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen und gleichzeitig die Blockierung der unspezifischen Bindungen in FACS-Puffer mit 0,1 % (w/v) Saponin und 20 % (v/v) Ziegennormalserum für eine halbe Stunde bei 4 °C. Alle weiteren Schritte erfolgten in FACS-Puffer mit 0,1 % Saponin, da die Porenbildung durch Saponin reversibel ist. Nach drei Waschschritten mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit *S. Enteritidis*-spezifischem Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum (LEHMANN *et al.*, 2001) in einer Verdünnung von 1 : 5.000 für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1 : 750 eingesetzt und verblieb für eine halbe Stunde bei 4 °C auf den Zellen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in FACS-Fixierpuffer aufgenommen. Da es sich bei dieser Färbung um eine indirekte Markierung mit einem Sekundärantikörper handelte, wurde eine Probe der Zellen jeweils als Konjugatkontrolle mitgeführt. In dieser Probe wurde kein Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum verwendet, sondern nur der Sekundärantikörper.

3.7.3 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse)

Die Analyse der Zellen erfolgte in einem Durchflußzytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Zur Auswertung wurde das Programm „CellQuest“ (Becton-Dickinson) verwendet.

3.8 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen der Zell- und Gewebeproben

3.8.1 Detektion des Salmonellenantigen über den immunhistochemischen Nachweis mit einem spezifischen Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum

Nach dem Auftauen wurden die Objektträger mit den infizierten Zellkulturen getrocknet und für fünf bis zehn Minuten in Azeton bei 4 °C nachfixiert. Die Zellkulturen wurden danach mit PBS-Puffer äquilibriert. Zum Blockieren unspezifischer Peroxidasereaktionen erfolgte der erste Inkubationsschritt in Methanol mit 0,5 % (v/v) H₂O₂ für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit PBS wurden unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers durch Inkubation der Zellkulturen in PBS mit 20 % (v/v) Ziegennormalserum für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Das Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum (LEHMANN *et al.*, 2001) wurde nach zwei Waschschritten mit PBS in einer Verdünnung von 1 : 5.000 in PBS aufgetragen und verblieb für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf den Objektträgern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mit einem peroxidasemarkierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Der Detektionsantikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 750 in PBS-Puffer eingesetzt und verblieb für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf den Objektträgern. Die Farbreaktion erfolgte mit dem AEC-Substrat-Kit für Peroxidase (Vector Laboratories). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gefärbt und die Zellkulturen mit Glyzeringelatine eingedeckt. Positive Reaktionen waren als rote Ablagerungen in den Zellen erkennbar, die Zellkerne waren leicht hellblau angefärbt.

Die Analyse der fertigen Präparate und die Anfertigung digitaler Aufnahmen erfolgte am Routinemikroskop Axioskop 2 (Zeiss, Jena, Deutschland) mit digitaler Kamera und mit Hilfe des Programmes Axio Vision (Zeiss, Jena).

3.8.2 Immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie beruht auf der Immunfluoreszenzmarkierung bestimmter Strukturen mit Hilfe von Antikörpern, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Der Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liegt in der Anwendung hochentwickelter Laser- und Computertechnik. Es besteht die Möglichkeit, optische Schnitte mit definiertem Abstand durch ein Präparat zu legen. Durch spezielle Computersoftware ist die dreidimensionale Rekonstruktion aus einer zweidimensionalen

Datenbank möglich. Damit können Zellen in histologischen Schnitten dreidimensional dargestellt werden.

Für die Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurden Proben der PP verschiedener Mäuse vorbereitet. Die Vorfixierung der Proben erfolgte mit 4 %iger (w/v) Glutaraldehydlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Organproben in PBS-Puffer gespült und über Nacht in 20 %iger (w/v) Saccharoselösung dehydriert. Am folgenden Tag wurden die Proben in Tissue-Tek[®] mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren. Im Labor der Bacterial Infection Group (Veterinary School, University of Cambridge, UK) wurden von den Proben der PP Schnitte in einer Stärke von 10 µm auf Objektträger aufgezogen, fixiert und gefärbt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden markierte Antikörper gegen die Oberflächmoleküle der DC (anti-CD11c) und der Mφ (anti-F4/80, anti-CD11b) in folgenden Kombinationen verwendet: Ratte-anti-Maus-CD11c FITC / Ratte-anti-Maus-F4/80 RPE und Ratte-anti-Maus-CD11c RPE / Ratte-anti-Maus-CD11b FITC. Alle Schnitte wurden zusätzlich mit dem Kaninchen-anti-Salmonellen-Serum (LEHMANN *et al.*, 2001) und einem FITC-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper gefärbt. Alle Waschschritte während der Färbung erfolgten dreimal mit PBS-Puffer. Alle Schnitte wurden auf den Objektträgern mit Vecta-shield, welches den Kernfarbstoff Dapi enthielt (Vector Laboratories), eingedeckt. Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte am Leica TCS-NT *confocal laser scanning* Mikroskop (Leica Camera AG, Solms, Deutschland) im Multi-Imaging Centre in the School of Biological Sciences, University of Cambridge, UK.

3.9 Probenvorbereitung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

3.9.1 Vorbereitung der Organe

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Organteile innerhalb weniger Minuten nach Tötung der Tiere fixiert. Von den entnommenen Organen wurden deshalb sofort nach der Entnahme aus dem Tierkörper Proben mit einer Kantenlänge von maximal 1,5 mm vorbereitet. Von jedem Organ wurde eine Probe in Glutaraldehydlösung fixiert. Die weitere Behandlung und Einbettung der Proben wurde freundlicherweise im Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt.

3.9.2 Vorbereitung der Zellen

Die *in vitro* infizierten DC wurden nach der Infektion durch Zentrifugation pelletiert ($300 \times g$, 4°C , 6 min) und einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde dann vorsichtig mit Glutaraldehyd überschichtet.

Infizierte Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 wurden aus den Flaschen geerntet, in PBS-Puffer gewaschen und die Zellpellets ebenfalls mit der Fixierlösung überschichtet.

Auch hier wurden die weiteren Schritte für die elektronenmikroskopische Analyse durch das Institut für Veterinär-Pathologie durchgeführt.

3.9.3 Elektronenmikroskopische Präparation und Analyse

Die Glutaraldehyd fixierten Proben wurden nach einem standardisierten Verfahren in Glycidether 100-Mischung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Zur orientierenden Lichtmikroskopie erfolgte die Anfertigung von Semidünnschnitten ($0,5 \mu\text{m}$) mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert AG, Wien) und die Färbung mit 1 %iger Toluidinblaulösung. Von den ausgewählten Arealen wurden 60 bis 90 nm dicke Ultradünnschnitte mit einem Diamantmesser (Diatom, Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden auf Formvar (Serva, Heidelberg, Deutschland) befilmte Kupfernetze (Tesla, Brno, Slowakei) aufgezogen und mit Uranylazetat und Bleizitrat doppelt kontrastiert.

Die Auswertung der Dünnschnitte erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Jena, Deutschland).

3.10 Verwendete Software

Zur Erstellung dieser Arbeit wurde das Programm WinWord2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die Graphiken wurden mit Hilfe des Programmes CorelDraw[®] 9.0 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) angefertigt.

Die experimentellen Daten werden im Text und in den Abbildungen als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung der ermittelten Werte angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammes Excel 2000 (Microsoft Corporation). Unterschiede in der Signifikanz wurden durch einen zweiseitigen t-Test (SigmaSTAT 2.0) geschätzt.

4 Ergebnisse

Makrophagen (M ϕ) und Dendritische Zellen (DC) sind die bekannten Zielzellen der Salmonellen (LOWRIE *et al.*, 1979; FINLAY u. FALKOW, 1989; GARCIA-DEL PORTILLO u. FINLAY, 1994; HOPKINS u. KRAEHENBUHL, 1997; MARRIOTT *et al.*, 1999). Während HOPKINS u. KRAEHENBUHL die Daten über die Kolokalisation der Salmonellen mit den DC der PP nicht zeigten, konnten MARRIOTT *et al.* nur *in vitro* zeigen, dass Salmonellen DC infizieren und in diesen Zellen überleben können. Aufgrund der Verwandtschaft der DC mit M ϕ und der herausragenden Bedeutung der DC als antigenpräsentierende Zellen (APC) sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob DC auch *in vivo* Salmonellen aufnehmen können. Um Salmonellen in murinen DC *ex vivo* nachweisen zu können, war es nötig, Nachweisverfahren zu etablieren, mit denen intrazelluläre Salmonellen erkannt werden können. Mit Hilfe der Zelllinie RAW 264.7 wurden Verfahren erarbeitet, um intrazelluläre Salmonellen bzw. Salmonellenantigen nachzuweisen. Dabei handelt es sich prinzipiell um zwei verschiedene Vorgehensweisen: auf der einen Seite werden lebende Salmonellen über ihr Wachstum nachgewiesen, auf der anderen Seite erfolgt der Nachweis von Salmonellenantigen (lebende Bakterien und totes Material) über spezifische Antikörper. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden BALB/c-Mäuse oral mit *S. Enteritidis* infiziert und anschließend die Peyerschen Platten (PP), die mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen und die Lokalisation von lebenden Salmonellen und Salmonellenantigen untersucht.

4.1 Vorversuche mit der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zum Nachweis der Salmonellen bzw. von Salmonellenantigen in *in vitro* infizierten Zellen

Zur Etablierung geeigneter Nachweisverfahren für intrazelluläre Salmonellen bzw. Salmonellenantigen wurden Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit dem auxotrophen Impfstamm SalmoVacSE[®] (ade⁻/his⁻; Impfstoffwerk Dessau-Tornau, Rosslau, Deutschland) infiziert. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen oder auf Kammerobjektträgern kultiviert und *S. Enteritidis* hinzugefügt. Nach einer Stunde Infektionszeit wurden die nicht phagozytierten, extrazellulär vorliegenden Salmonellen mit PBS abgewaschen und die Zellen in gentamicinhaltigem Medium weiter kultiviert. Gentamicin tötet extrazellulär vorliegende, nicht phagozytierte Salmonellen ab, intrazelluläre Salmonellen werden nicht beeinflusst (TANG *et al.*, 1993). Nach dem Ernten der Zellen mit

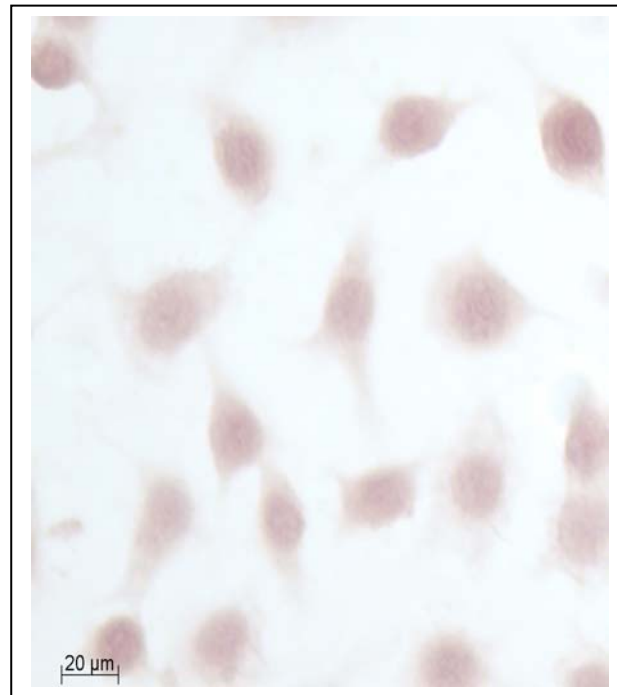
Trypsin-EDTA-Lösung bzw. Fixieren der Objektträger wurden mit verschiedenen Verfahren Salmonellen bzw. Salmonellenantigene nachgewiesen.

4.1.1 Immunhistochemische Detektion von *S. Enteritidis*-Antigen in *in vitro* infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Die Detektion des Salmonellenantigens erfolgte mit einem *S. Enteritidis*-spezifischen Kaninchen-Antiserum (LEHMANN *et al.*, 2001) und einem Peroxidase-markierten Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper.

Es zeigte sich, dass bei einem Infektionsverhältnis von 100 Salmonellen auf einen M ϕ fast alle Zellen mindestens eine Salmonelle enthielten (Abb. 9B). Wird das Infektionsverhältnis niedriger gewählt, z.B. eine Salmonelle auf einen M ϕ , so sind nur ca. 1/3 der Zellen infiziert (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus erwies sich das aufgebaute Nachweissystem (LEHMANN *et al.*, 2001) als spezifisch, da bei nichtinfizierten Zellen keine Anfärbung erfolgte (Abb. 9A).

A



B

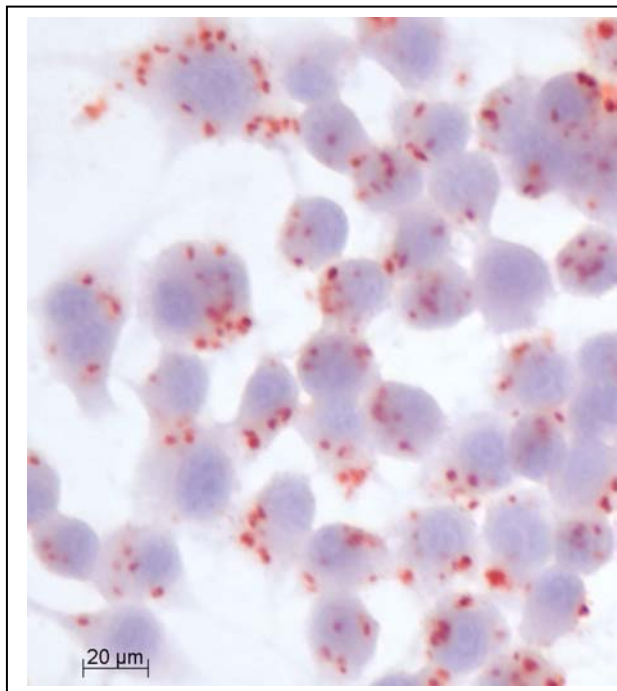


Abb. 9: **Immunhistologischer Nachweis von Salmonellenantigenen in *in vitro* mit SalmoVacSE[®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7**

A: nichtinfizierte Makrophagen, kein Salmonellenantigen nachweisbar

B: infizierte Makrophagen, (Infektionsverhältnis 100 Salmonellen pro Makrophage), Salmonellenantigen intrazellulär nachweisbar

4.1.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellen in *in vitro* mit SalmoVacSE[®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Als weitere Nachweismethode für Salmonellen eignet sich die elektronenmikroskopische Analyse infizierter Zellen. Unabhängig von ihrer subzellulären Lokalisation können auch abgetötete Salmonellen aufgrund ihrer Morphologie gut mit Hilfe der Transmissions-elektronenmikroskopie identifiziert werden. In den untersuchten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 sind die Salmonellen sehr gut zu erkennen. Zum Teil befinden sie sich zu mehreren in Phagosomem bzw. Phagolysosomem eingeschlossen. Aus der elektronenmikroskopischen Darstellung (Abb. 10) ist ersichtlich, dass das immunhistochemisch nachgewiesene Salmonellenantigen (Abb.9) überwiegend auf intrazelluläre Salmonellen zurückzuführen ist.

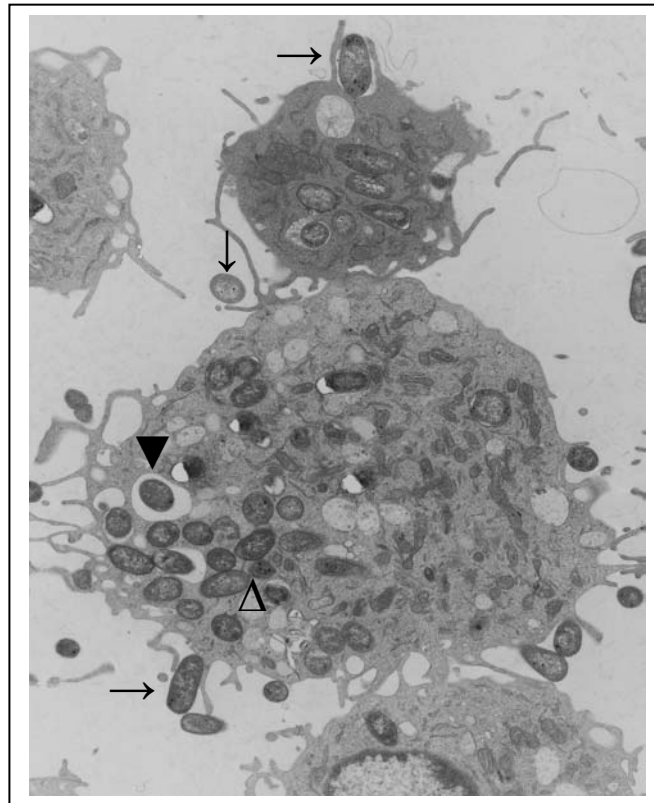


Abb. 10: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellen in *in vitro* mit SalmoVacSE[®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

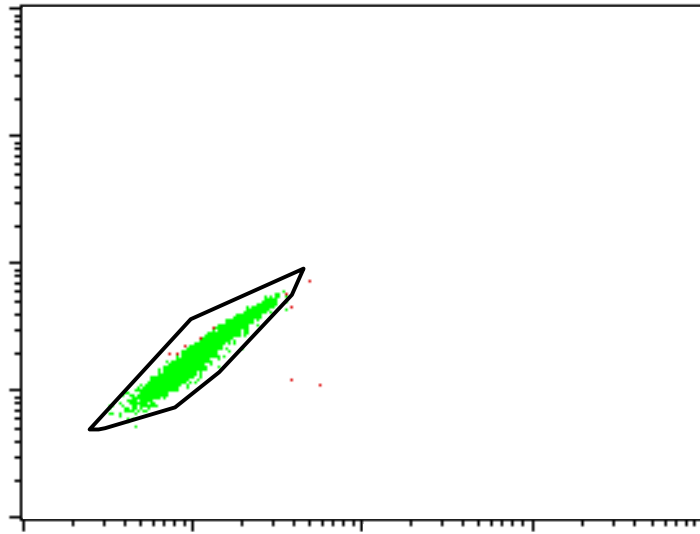
Infektionsverhältnis 100 Salmonellen pro Makrophage

Salmonellen befinden sich in Phagosomen (Δ), Phagolysosomen (\blacktriangledown) und membranassoziiert (\downarrow), Vergr.: 3.000x

4.1.3 Durchflusszytometrischer Nachweis von Salmonellenantigenen in *in vitro* mit SalmoVacSE[®] infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen bietet die durchflusszytometrische Analyse eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von intrazellulärem Salmonellenantigen in Einzelzellen. Dazu wurden infizierte Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 nach dem Ernten mit Paraformaldehydpuffer fixiert, mit Saponin permeabilisiert und die Salmonellen mit dem schon erwähnten Kaninchen-Anti-Salmonellen-Serum und einem FITC-markierten Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper markiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer (FACSCalibur). Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen korreliert dabei mit ihrem Gehalt an intrazellulärem Salmonellenantigen. Das heißt, Makrophagen, die viel Salmonellenantigen tragen, fluoreszieren stärker als Zellen, die weniger Antigen enthalten. Die nicht infizierten Zellen besitzen eine Autofluoreszenz, die für die Analyse im Durchflusszytometer nötig ist. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der nichtinfizierten (Abb. 11A) und der infizierten Zellen (Abb. 11B) zeigt eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität der infizierten Zellen. Somit war dieses System zur Analyse von isolierten Einzelzellen in Suspension sehr gut geeignet und es konnten mit Hilfe des Durchflusszytometers sehr viele Zellen mit hoher Genauigkeit analysiert werden.

A:



B:

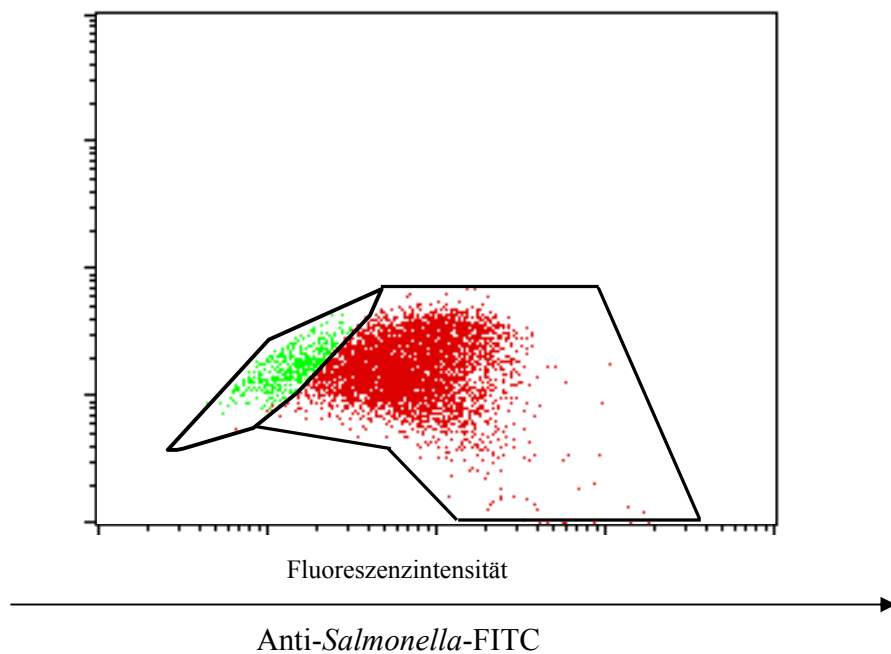


Abb. 11: **Durchflusszytometrische Analyse nichtinfizierter und mit SalmoVac[®] infizierter Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7**

A: nichtinfizierte Makrophagen

B: infizierte Makrophagen

Die nicht infizierten Zellen sind in beiden Abbildungen grün; Zellen, die Salmonellenantigenen enthalten, sind rot dargestellt. Y-Achse: Rot-Fluoreszenz im 2. Analysekanal.

4.1.4 Nachweis lebender Salmonellen in *in vitro* infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Um die Anzahl der Zellen zu bestimmen, die lebende Salmonellen enthielten, wurden nach Infektion und Zählung der Zellen 1×10^3 Zellen auf Luria-Bertani-Nährboden (LB-Agar) ausplattiert.

Die Auszählung der gewachsenen Kolonien (Tab. 2) ergab, dass die Anzahl der Zellen, die lebende Salmonellen trugen, sowohl vom Infektionsverhältnis als auch von der Zeitdauer nach der Infektion abhängig ist.

Tab. 2: Anzahl der infizierten Zellen aus 1×10^3 *in vitro* infizierten RAW 264.7-Zellen

Infektionsverhältnis (Salmonellen : Makrophagen)	Zeit <i>p.i.</i> 1 Stunde	Zeit <i>p.i.</i> 4 Stunden	Zeit <i>p.i.</i> 24 Stunden
1 : 1	9,6 ± 2,1	4,6 ± 1,2 ^a	1,6 ± 1,6 ^a
10 : 1	98,6 ± 14,2	21,0 ± 13,7 ^b	11,0 ± 5,3 ^b
100 : 1	643,0 ± 61,6	228,0 ± 70,6 ^b	114,0 ± 9,9 ^b

Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten, Mittelwert aus zwei Ausplattierungen ± Standardfehler, Signifikanz (t-Test) immer im Vergleich zum Wert 1 Stunde *p.i.*: a: $p < 0,05$; b: $p < 0,005$

Es zeigte sich, dass der Anteil der Zellen, die lebende Salmonellen trugen, mit steigender Infektionsdosis zunahm. Während bei einem Infektionsverhältnis von 1 : 1 nach einer Stunde ca. 1 % der Zellen infiziert waren, betrug der Anteil bei einem Infektionsverhältnis von 100 : 1 64 % ± 6 %. Aus dem zeitlichen Verlauf ließ sich ersehen, dass sich die bakterizide Aktivität der M ϕ effektiv darstellte, aber nach 24 Stunden noch nicht alle Salmonellen abgetötet worden waren. Auch bei einer niedrigen Infektionsdosis befanden sich nach 24 Stunden immer noch 1-10 % lebende Salmonellen in den M ϕ .

Da in parallel durchgeführten Infektionen von Mäusen mit dieser Nachweismethode nur sehr wenige mit lebenden Salmonellen infizierte Zellen nachgewiesen werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Invasivität des *S. Enteritidis* Impfstammes SalmoVacSE[®] durch Änderung der Kultivierungsbedingungen zu erhöhen. Um eine möglichst hohe Invasivität der Salmonellen zu erreichen, wurde der Stamm in einem Mangelmedium kultiviert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Schrödl, Institut für Bakteriologie

und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig). Diese Art der Kultivierung sollte dazu führen, dass die Salmonellen die für die Invasivität erforderlichen Virulenzfaktoren besonders stark ausprägen. *In-vitro*-Infektionsversuche mit der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 ließen erkennen, dass der Anteil der Zellen, die lebende Salmonellen trugen, deutlich höher war, wenn die Makrophagenzelllinie mit Salmonellen infiziert wurde, die in Mangelmedium kultiviert worden waren (Tab.3).

Tab. 3: Anzahl der infizierten Zellen nach *In-vitro*-Infektion der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 mit unterschiedlich kultivierten SalmoVacSE[®]-Stämmen

Infektionsverhältnis / Zeit nach Infektion	SalmoVacSE [®] konventionell kultiviert	SalmoVacSE [®] in Mangelmedium kultiviert
1 : 1 / 1 Stunde	19,5 ± 3,5	61,5 ± 6,4
1 : 1 / 4 Stunden	16,5 ± 0,7	70,0 ± 7,1

Ausplattierung von 1×10^3 infizierten Zellen, ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten, Mittelwerte aus zwei Ausplattierungen \pm Standardfehler

Auch über die durchflusszytometrische Analyse der unterschiedlich infizierten M ϕ konnte die erhöhte Invasivität der Salmonellen, die in Mangelmedium kultiviert worden waren, nachgewiesen werden (Abb. 12A und 12B).

Im Gegensatz zu Zellen, die mit konventionell kultivierten Salmonellen infiziert wurden (Abb. 12A), war die Anzahl Salmonellenantigen-tragender Zellen fast dreimal so hoch und diese Zellen tragen deutlich mehr Salmonellenantigen (höhere Fluoreszenzintensität), wenn sie mit Salmonellen aus dem Mangelmedium infiziert worden waren (Abb. 12B).

Als Infektionsdosis wurde für beide Salmonellenkulturen ein Infektionsverhältnis von 1 : 1 gewählt. Der Anteil infizierter Zellen lag für die Infektion mit konventionell kultivierten Salmonellen bei 7 %, während die Salmonellen aus dem Mangelmedium ca. 80 % der M ϕ infizieren konnten. Die mittlere Fluoreszenzintensität der positiven Zellen stieg von 49 (Infektion mit konventionell kultivierten Salmonellen) auf 142 (Infektion mit Salmonellen aus Mangelmedium). Aus diesen Analyseergebnissen geht hervor, dass die Invasivität der Bakterien, die in Mangelmedium kultiviert worden waren, *in vitro* deutlich höher war, als die Invasivität der konventionell kultivierten Salmonellen. Daher wurde später versucht, auch *in vivo* nach oraler Infektion von Mäusen mit dem in Mangelmedium kultivierten Stamm, eine erhöhte Anzahl infizierter Zellen durch Ausplattieren zu finden.

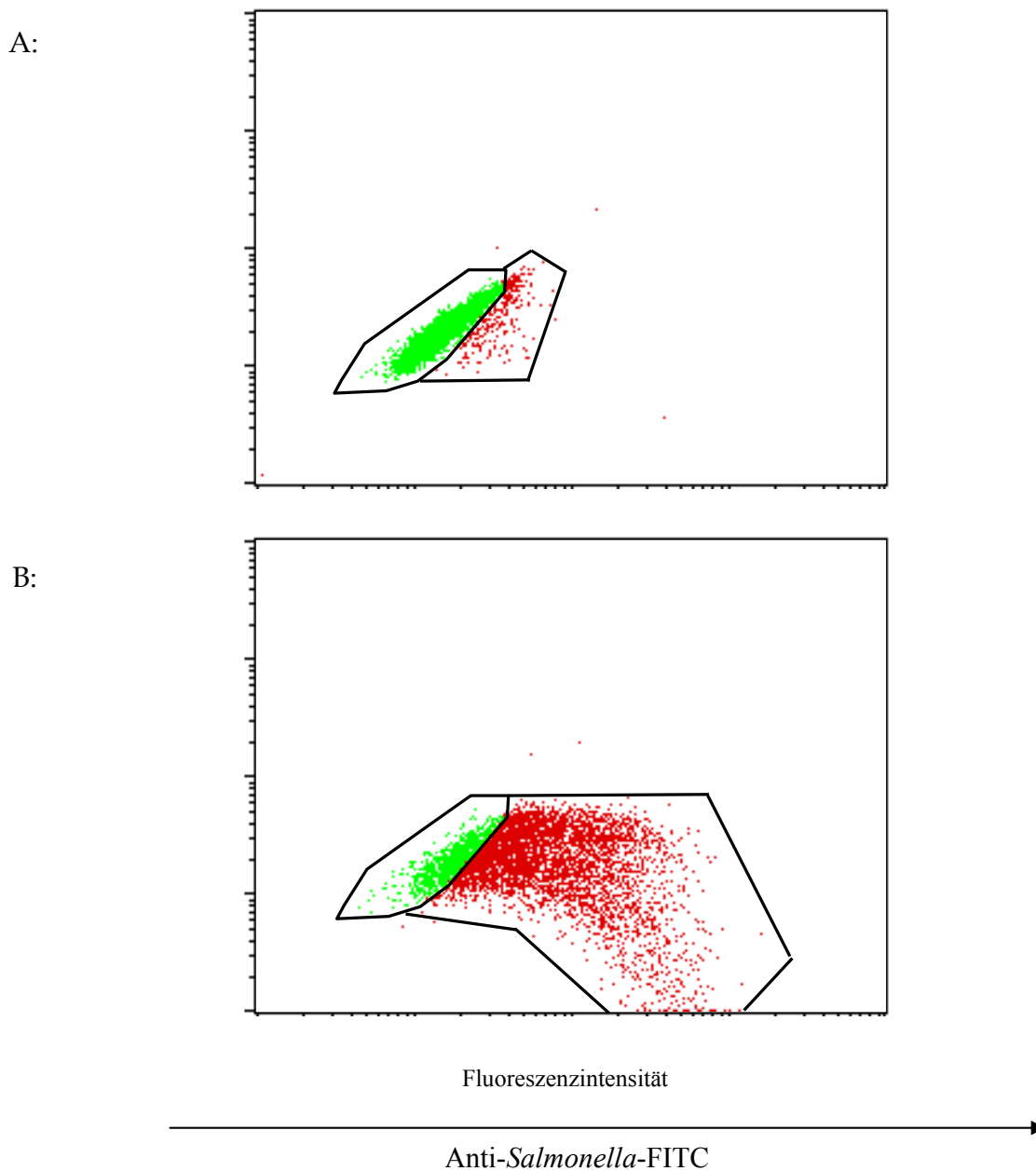


Abb. 12: **Durchflusszytometrische Analyse unterschiedlich infizierter Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7**

A: Makrophagen infiziert mit konventionell kultivierten *S. Enteritidis*, Infektionsverhältnis 1:1, 1 Stunde p.i.

B: Makrophagen infiziert mit *S. Enteritidis* kultiviert in Stressmedium, Infektionsverhältnis 1:1, 1 Stunde p.i.

Die nichtinfizierten Zellen sind in beiden Abbildungen grün; Zellen, die Salmonellenantigen enthalten sind rot dargestellt. Y-Achse: Rot-Fluoreszenz im 2. Analysekanal

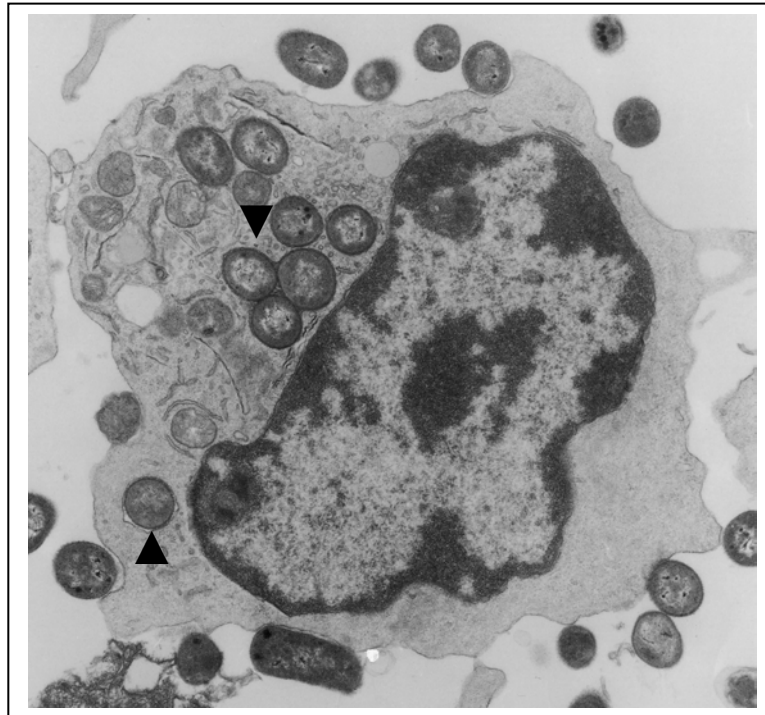
4.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis von *S. Enteritidis* in *in vitro* infizierten DC aus den PP und der Milz

Während einer Infektion gelangen Salmonellen nach oraler Aufnahme und Passage von Vormagen und Magen in den Dünndarm und dringen im Bereich der M-Zellen in die Mucosa ein. Sie erreichen damit ein Gewebe, in dem sehr viele M ϕ und DC vorhanden sind. Beide Zelltypen sind zur Phagozytose fähig. Es war jedoch bisher nicht bekannt, ob DC tatsächlich Salmonellen aufnehmen. Um zu untersuchen, ob DC Salmonellen phagozytieren bzw. mit Salmonellen infiziert werden können, wurden Zellen aus dem Bereich der PP und aus der Milz durch enzymatische Desintegration vereinzelt und anschließend über Dichtegradientenzentrifugation separiert. Die gewonnenen phagozytierenden Zellen wurden über den spezifischen Marker für DC der Maus, CD11c, im Durchflusszytometer sortiert. Dabei konnte eine Aufreinigung der DC von 90 % erreicht werden. Die gewonnenen Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und für eine Stunde zusammen mit *S. Enteritidis* inkubiert. Das Infektionsverhältnis betrug 1.000 Salmonellen pro DC. Zur Kontrolle wurden Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 parallel mit Salmonellen inkubiert, dabei wurden gleiche Infektionsbedingungen und das gleiche Infektionsverhältnis (1.000 : 1) gewählt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und für die elektronenmikroskopische Untersuchung fixiert.

In den elektronenmikroskopischen Präparaten waren die Salmonellen aufgrund ihrer Morphologie gut zu erkennen (Abb. 13A und 13B; GHADIALLY, 1997). Die DC sowohl aus den PP als auch aus der Milz enthielten intrazelluläre Salmonellen. Wie zu erwarten war, waren auch in der M ϕ -Zelllinie intrazelluläre Salmonellen zu finden (Abb. 10, Kap. 4.1.2). Die Anzahl der Salmonellen in den DC der unterschiedlichen Organe war variabel. Die DC der PP enthielten 5 bis 13 Salmonellen, während in den DC der Milz 2 bis 7 Salmonellen zu finden waren. Die zur Kontrolle infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 enthielten 5 bis 30 Salmonellen. Zur Auszählung gelangten 10 bis 12 Zellen pro Zellpopulation mit Hilfe elektronenmikroskopischer Fotografien.

Die Bakterien befanden sich in den Zellen nicht frei im Zytoplasma, sondern eingeschlossen in Vakuolen. Wie bereits bekannt, ließ sich für M ϕ die Infizierbarkeit mit Salmonellen bestätigen. Darüber hinaus gelang es, die Aufnahme von Salmonellen in DC nachzuweisen. Die Experimente belegen, dass die DC aus den PP und der Milz tendenziell weniger Salmonellen aufnehmen als Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7.

A



B

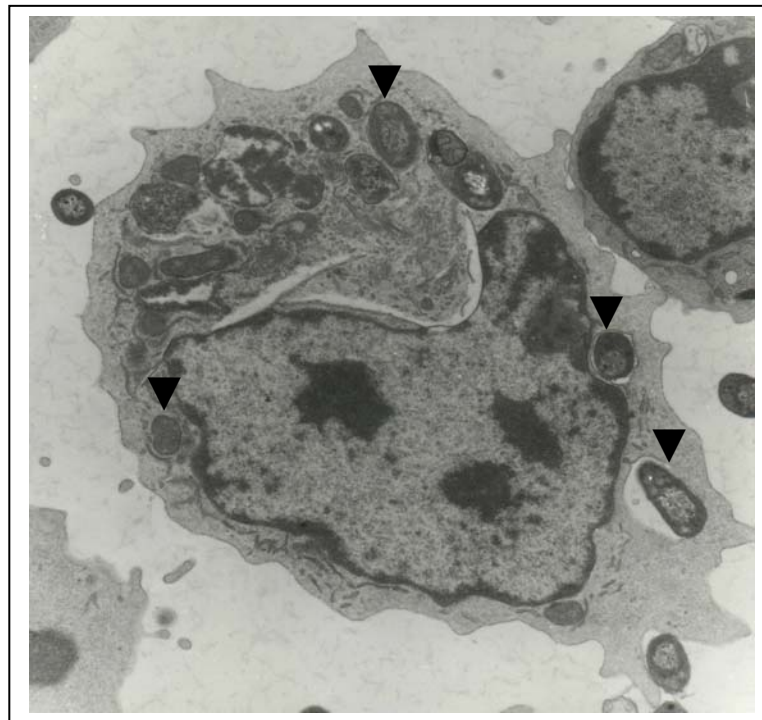


Abb. 13: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Salmonellen in *in vitro* mit SalmoVacSE[®] infizierten Dendritischen Zellen aus der Milz und den Peyerschen Platten

A: infizierte Dendritische Zelle aus der Milz

B: infizierte Dendritische Zelle aus den Peyerschen Platten

Intrazelluläre Salmonellen (▼), Vergrößerung 3.000x

4.3 Analyse der separierten Zellen mit Hilfe von Oberflächenmolekülen (durchflusszytometrische Untersuchung)

Die Zellen, die unter Nutzung des Dichtegradienten isoliert werden konnten, wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse auf die Ausprägung ihrer Oberflächenmoleküle untersucht. Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass sich aus den Einzelzellen der naiven BALB/c-WT-Mäuse folgende Zellpopulationen separieren ließen: In der Fraktion mit einer Dichte von $\leq 1,068$ g/ml (obere Fraktion im Gradienten) wurden $61,5 \pm 3,5$ % DC, $36 \pm 7,3$ % M ϕ und $16,1 \pm 2,3$ % B-Zellen gefunden.

Die Fraktion mit einer Dichte von $\geq 1,068$ g/ml und $\leq 1,084$ g/ml (untere Fraktion) enthielt $50 \pm 5,9$ % B-Zellen, $21,5 \pm 4,9$ % CD4-positive T-Zellen, $11,8 \pm 2,3$ % CD8 α -positive T-Zellen, $15,5 \pm 1,3$ % DC und $4,5 \pm 1,7$ % M ϕ (Abb. 14). Bei der Bewertung dieser Anteile der Zellpopulationen in einer Zellfraktion ist zu beachten, dass es zu Überschneidungen kommt, da besonders die Subpopulationen der DC zusätzlich zum DC-Oberflächenmolekül auch Oberflächenmoleküle der M ϕ (CD11b) und der CD8 α^+ -T-Zellen tragen (CD8 α).

In der Fraktion mit geringerer Dichte befanden sich also die phagozytierenden Zellen, während die Fraktion mit höherer Dichte zu ca. 80 % B- und T-Zellen enthielt.

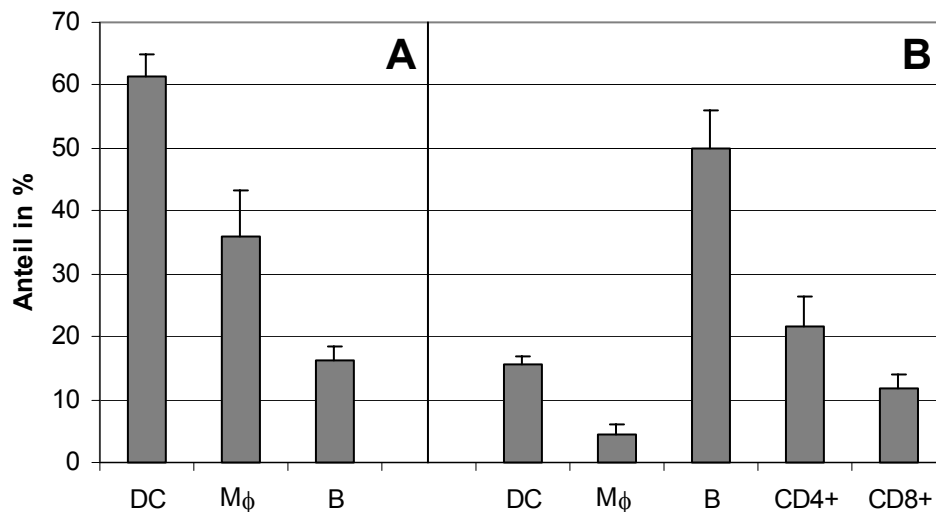


Abb. 14: **Subpopulationen der isolierten Zellfraktionen aus Milzen von naiven BALB/c-WT-Mäusen**

Verteilung der Oberflächenmarker in den isolierten Zellfraktionen mit unterschiedlicher Dichte in Prozent.

A: Fraktion der Zellen mit einer Dichte von $\leq 1,068$ g/ml (obere Fraktion im Gradienten),

B: Fraktion der Zellen mit einer Dichte von $\geq 1,068$ g/ml und $\leq 1,084$ g/ml (untere Fraktion), Analyse der Oberflächenmoleküle der isolierten Einzelzellen aus Milzen, separiert über Dichtegradientenzentrifugation, Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Analysen

Die Analyse der Oberflächenmarker 12 Stunden nach einer Salmonelleninfektion ergab ein etwas anderes Bild (Abb.: 15). Die separierten Zellpopulationen aus den Milzen infizierter BALB/-WT-Mäuse zeigten in der Fraktion mit einer Dichte von $\leq 1,068$ g/ml einen verringerten Anteil von M ϕ ($6,4 \pm 3,0$ %), dadurch nahm die Populationen der DC und der B-Zellen leicht zu (DC: $63,9 \pm 1,1$ %, B-Zellen: $20,1 \pm 2,5$ %).

In der Fraktion mit einer Dichte von $\geq 1,068$ g/ml und $\leq 1,084$ g/ml konnten aus den infizierten Milzen deutlich höhere Anteile der phagozytierenden Zellen ermittelt werden als aus naiven Milzen. So stieg der Anteil der DC von 15,5 % auf $49,3 \pm 3,6$ % und der M ϕ -Anteil von 4,5 % auf $11,0 \pm 1,5$ %. Der Anteil der B-Zellen betrug hier $35,1 \pm 1,4$ %, während die CD4-positiven $33,6 \pm 9,8$ % erreichten. Nur der Anteil der CD8 α -positiven Zellen blieb mit $13,8 \pm 2,7$ % konstant.

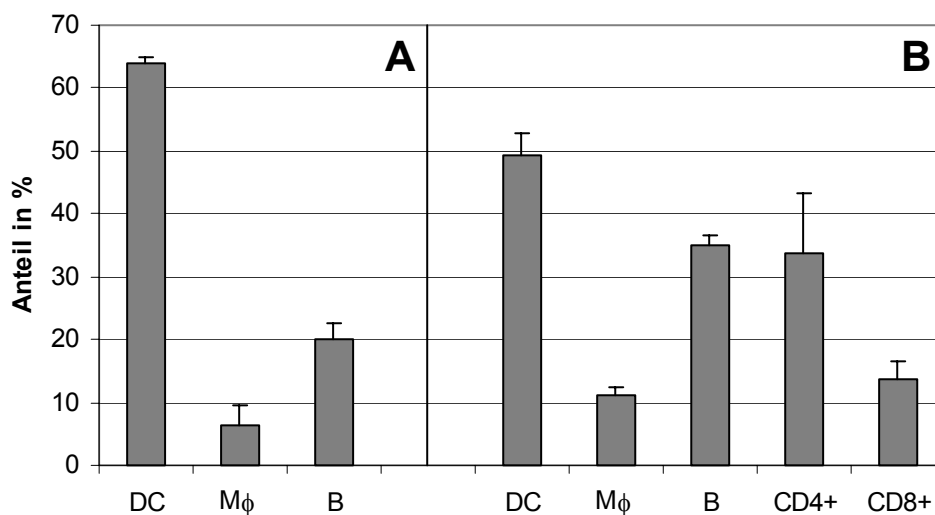


Abb. 15: **Subpopulationen der isolierten Zellfraktionen aus Milzen von infizierten BALB/c-WT-Mäusen 12 Stunden *p.i.***

Verteilung der Oberflächenmarker in den isolierten Zellfraktionen mit unterschiedlicher Dichte in Prozent.

A: Fraktion der Zellen mit einer Dichte von $\leq 1,068$ g/ml,

B: Fraktion der Zellen mit einer Dichte von $\geq 1,068$ g/ml und $\leq 1,084$ g/ml, Infektionsdosis 1×10^{10} *S. Enteritidis* 64/03 pro Maus. Analyse der Oberflächenmarker der isolierten Einzelzellen aus Milzen, separiert über Dichtegradientenzentrifugation, Mittelwert \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Analysen.

4.4 *In-vivo*-Infektion von BALB/c-Mäusen mit *Salmonella* Enteritidis

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass nicht nur M ϕ , sondern auch DC Salmonellen aufnehmen können, sollte mit einer *In-vivo*-Infektion bei BALB/c-Mäusen die zelluläre Lokalisation der Salmonellen geklärt werden. Dazu wurden BALB/c-WT-Mäuse oral per Knopfkanüle mit *S. Enteritidis* infiziert. Es wurden der *S. Enteritidis*-Impfstamm (SalmoVacSE[®], ade⁻/his⁻) und der schwach virulenter Elternstamm (*S. Enteritidis* 64/03, ade⁺/his⁺) verwendet. Da sich im Laufe der Experimente zeigte, dass die Invasivität des Impfstammes sehr gering war und sich *in vivo* nicht durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen steigern ließ, wurde in späteren Experimenten der virulentere Stamm 64/03 verwendet.

4.4.1 Etablierung der Infektionsbedingungen

Für die orale Infektion von Mäusen mit *S. Enteritidis* existierten keine Erfahrungswerte. Zur Etablierung der geeigneten Infektionsbedingungen, die eine Infektion induzieren, wurde in Vorversuchen eine Infektionsdosis ermittelt, die möglichst hoch sein sollte, aber die Mäuse nicht innerhalb von 24 Stunden töten würde. Um sicherzustellen, dass sich das Immunsystem der Mäuse mit Salmonellenantigen auseinandergesetzt hatte, wurde zusätzlich das Serum der Mäuse nach oraler Infektion auf Salmonellenantigen-spezifische Antikörper untersucht.

4.4.1.1 Bestimmung der Infektionsdosis in BALB/c-WT-Mäusen bei oraler Infektion mit *S. Enteritidis*

Da es sich bei dem eingesetzten *S. Enteritidis*-Stamm um einen attenuierten Impfstamm handelt, wurden für den Vorversuch bereits sehr hohe Infektionsdosen gewählt. In zwei verschiedenen Gruppen wurden je vier BALB/c-WT-Mäuse oral mit 1×10^{10} und 1×10^{11} KbE Salmonellen pro Maus infiziert. Die Überlebensrate der infizierten Mäuse zeigt sehr deutlich, dass mit 1×10^{10} und 1×10^{11} KbE pro Maus der kritische Bereich der Infektionsdosis erreicht wurde (Abb. 16).

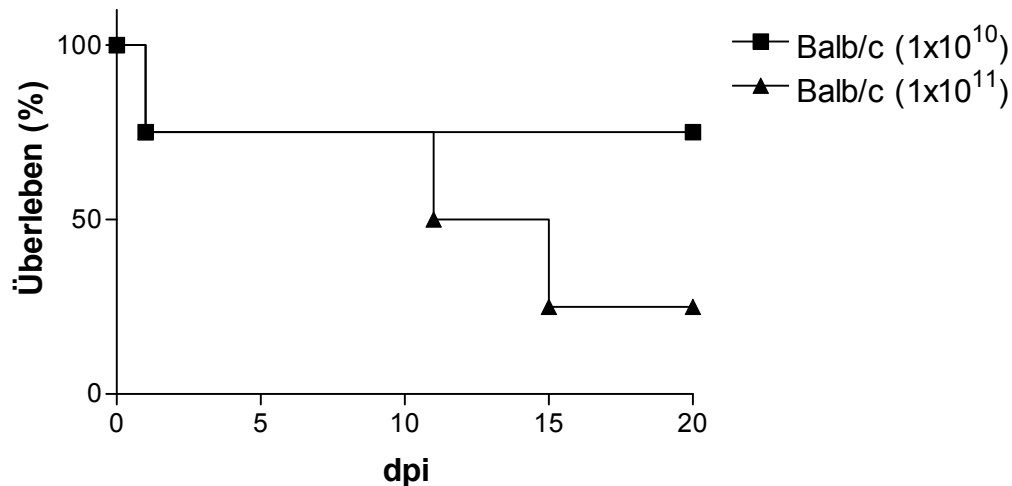


Abb. 16: Überlebensrate der BALB/c-WT-Mäuse nach oraler Applikation von 1×10^{10} und 1×10^{11} KbE des *S. Enteritidis*-Impfstammes SalmoVacSE[®] pro Maus

Beobachtungszeitraum 20 Tage, 4 Tiere pro Gruppe, ein Experiment, dpi = Tage *p.i.*

Es starb in beiden Infektionsgruppen schon am ersten Tag eine Maus. Daraus ließ sich ersehen, dass die letale Infektionsdosis mit dem *S. Enteritidis* Impfstamm im Bereich von 1×10^{12} KbE pro Maus liegen würde. Aus klinischer Sicht zeigte sich, dass die Gruppe der Mäuse mit einer Infektionsdosis von 1×10^{11} KbE Salmonellen pro Maus schon wenige Stunden nach der Infektion deutlich krank waren. Tiere dieser Gruppe fielen durch gestäubtes Fell, erhöhte Atemfrequenz und Apathie auf. Obwohl auch aus der Gruppe mit einer Infektionsdosis von 1×10^{10} KbE Salmonellen pro Tier eine Maus starb, zeigten diese Tiere keine Krankheitsanzeichen. Um für weitere Infektionsversuche sicher zu sein, dass mit einer hohen Infektionsdosis kein tödlicher LPS-Schock innerhalb von 12 Stunden *p.i.* induziert werden würde, wurde für alle folgenden Experimente die Infektionsdosis 1×10^{10} KbE pro Maus gewählt.

In späteren Infektionsversuchen wurde der schwach virulente Elternstamm *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 eingesetzt. Die Überprüfung im Vorversuch ergab, dass auch bei oraler Infektion mit diesem Stamm eine Infektionsdosis von 1×10^{10} KbE pro Maus subletal war.

4.4.1.2 Untersuchung der Serokonversion nach oraler Infektion mit *S. Enteritidis*

Um sicher zu stellen, dass auch bei niedrigen Infektionsdosen Salmonellenantigenen oder lebende Salmonellen die Darmbarriere passiert und das Immunsystem der Mäuse auf

S. Enteritidis-Antigene reagiert hatte, erfolgten Serumuntersuchungen am 35. Tag *p.i.* Dabei wurde der Salmonellenantigen-spezifische Immunglobulintiter 12 infizierter Mäuse im Vergleich zu naiven Mäusen mittels eines *S. Enteritidis*-Antigen-spezifischen ELISA bestimmt.

Bei einer oralen Infektionsdosis von 5×10^4 KbE *S. Enteritidis* pro Maus erreichten die infizierten Mäuse folgende Immunglobulintiter im Serum:

IgA: 4.000 bis 16.000

IgG1: 4.000 bis 64.000

IgG2a: 32.000 bis 256.000.

Nachdem mit Hilfe der Bestimmung der Infektionsdosis pro Maus und der Überprüfung der Serokonversion das orale Infektionsmodell für *S. Enteritidis* in BALB/c-WT-Mäusen etabliert war, konnte dazu übergegangen werden, die Rolle der phagozytierenden Zellen während der oralen Infektion mit *S. Enteritidis* in den Mäusen zu untersuchen. Da insbesondere die unspezifischen Mechanismen von Interesse waren und bekannterweise die M ϕ rasch nach Infektion aktiviert werden, wurde zunächst der Zeitpunkt von 12 Stunden *p.i.* gewählt, um die Lokalisation der Salmonellen und des Salmonellenantigens zu untersuchen. Dieser Zeitraum sollte ausreichen, um einer möglichst hohen Zahl von Salmonellen das Passieren der Darmbarriere zu ermöglichen. Die eingedrungenen Salmonellen würden dann besonders im Bereich der PP auf M ϕ und DC treffen und von diesen Zellen phagozytiert werden. Ein Nachweis dieser Bakterien in den Zellen der PP sollte deshalb möglich sein.

4.4.2 Untersuchungen der *S. Enteritidis*-infizierten Mäuse 12 Stunden *p.i.*

4.4.2.1 Gesamtkeimzahlbestimmung aus den PP

Die Gesamtkeimzahlbestimmung aus drei PP von BALB/c-WT-Mäusen ergab 12 Stunden *p.i.* mit 1×10^{10} KbE des SalmoVacSE[®]-Stammes durchschnittlich $1,0 \pm 0,5$ Salmonellen.

12 Stunden *p.i.* Infektion mit 1×10^{10} KbE des schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stammes 64/03 konnten aus drei PP der BALB/c-WT-Mäuse durchschnittlich $30,0 \pm 10,5$ Salmonellen isoliert werden.

Die Aufarbeitung erfolgte nach Inkubation der PP für eine Stunde in gentamicinhaltigem Medium, um die Kontamination aus dem Darmlumen auszuschließen.

4.4.2.2 Orale Infektion von Mäusen mit dem *S. Enteritidis*-Impfstamm SalmoVacSE® und anschließende Isolierung von Einzelzellen aus den PP

Um Salmonellen in isolierten Einzelzellen aus PP nachzuweisen, wurden BALB/c-WT-Mäuse in drei unabhängigen Experimenten oral mit 1×10^{10} KbE *S. Enteritidis* pro Maus infiziert. Zwölf Stunden *p.i.* wurden die Mäuse getötet und die PP, die Darmlymphknoten sowie die Milz steril entnommen. Durch enzymatische Desintegration wurden Einzelzellen isoliert und diese mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation in die Fraktion der phagozytierenden Zellen (obere Fraktion), die Fraktion der B-Zellen (untere Fraktion) und sogenannte Restzellen (Interstitiumzellen, Epithelzellen etc., Pellet) separiert. Die intakten Einzelzellen wurden auf selektivem Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar, Merck) ausplattiert, um einer potentiellen Kontamination mit physiologischen Darmbakterien entgegenzuwirken. Die Salmonellen als Produzenten von Schwefelwasserstoff führen auf XLD-Agar zur Bildung von schwarzem Eisensulfid. Dieses Pigment kennzeichnet die Salmonellenkolonien mit einem schwarzen Zentrum. Die Auszählung der Salmonellenkolonien ergab die in Tab. 4 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 4: Anzahl infizierter Zellen in den Peyerschen Platten 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit SalmoVacSE®

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis KbE pro Maus	Fraktion der Phagozyten	Fraktion der B-Zellen	Restzellen
3	9	10^{10}	$1,3 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$	$1,6 \pm 1,2$

Mittelwert \pm Standardfehler (pro 10 PP) aus drei unabhängigen Experimenten

Die Anzahl der mit lebenden Salmonellen infizierten Zellen war in der Fraktion der phagozytierenden Zellen sehr gering, besonders wenn berücksichtigt wird, dass aus den PP einer Maus (10 bis 12 PP) im Durchschnitt $1,5$ bis $2,5 \times 10^6$ phagozytierende Zellen mit B-Zellen isoliert werden konnten. Aus der mittleren Fraktion der B-Zellen und den Restzellen wurden ebenfalls nur geringe Zahlen infizierter Zellen isoliert.

Parallel durchgeführte Untersuchungen der Gesamtkeimzahl in den Darmlymphknoten ergaben im Durchschnitt $4,8 \pm 1,3$ Salmonellen pro Lymphknoten, wobei eine Kontamination aus dem Darm durch die Aufarbeitungstechnik ausgeschlossen werden kann.

Um eine höhere Anzahl mit lebenden Salmonellen infizierter Zellen zu erhalten, wurde daraufhin der *S. Enteritidis*-Impfstamm in Mangelmedium kultiviert, um die Ausprägung der Virulenzfaktoren zu fördern (Kap. 3.2.1 und Kap. 4.1.4). BALB/c-WT-Mäuse wurden mit

diesem Salmonellenstamm aus dem Mangelmedium oral infiziert und 12 Stunden *p.i.* untersucht. Das Ergebnis der Ausplattierung der isolierten Zellen aus drei unabhängigen Experimenten zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen in den PP von Mäusen 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem SalmoVacSE®-Stamm kultiviert in Mangelmedium

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis KbE pro Maus	Fraktion der Phagozyten	Fraktion der B-Zellen	Restzellen
3	10	10^9	0	0	1

Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten

Eine Kontrollinfektion von BALB/c-WT-Mäusen mit einer Infektionsdosis von 1×10^9 KbE konventionell kultivierter Salmonellen pro Maus ergab eine ebenso niedrige Anzahl infizierter Zellen in den PP (Tab. 6).

Tab. 6: Durchschnittliche Anzahl infizierter Zellen in den PP von Mäusen nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem SalmoVacSE®-Stamm kultiviert in LB-Medium

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis pro Maus	Fraktion der Phagozyten	Fraktion der B-Zellen	Restzellen
1	3	10^9	1	0	1

Die Auflistung der Ergebnisse in Tab. 5 verdeutlicht, dass keine phagozytierenden Zellen mit lebenden Salmonellen nachgewiesen werden konnten. Trotz der erhöhten Invasivität *in vitro* in der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 brachte der *S. Enteritidis*-Impfstamm kultiviert in Mangelmedium *in vivo* in den Zellen der PP der oral infizierten Mäuse keine Erhöhung des Ausplattierungsergebnisses. Die Gesamtkeimzahlbestimmung aus den Darmlymphknoten zeigte, dass diese Organe steril waren. Es hatte also auch keine Dissemination von Salmonellen-tragenden Zellen in die Darmlymphknoten stattgefunden. Deshalb wurden die nachfolgenden Infektionsversuche mit 1×10^{10} KbE des schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stammes 64/03 pro Maus durchgeführt. Durch seine erhöhte Virulenz im Vergleich zum Impfstamm SalmoVacSE® sollte ein besseres Passieren der Darmwand und daran anschließend eine erhöhte Anzahl der mit lebenden Salmonellen infizierten Zellen erzielt werden.

4.3.2.3 Orale Infektion von Mäusen mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 und anschließende Isolierung von Einzelzellen aus den PP

In vier unabhängigen Experimenten wurden BALB/c-WT-Mäuse mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 oral infiziert. 12 Stunden p.i. wurden die Mäuse getötet, die Einzelzellen aus den PP isoliert und ausplattiert. Das Ergebnis der Auszählung der Salmonellenkolonien ist in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Anzahl infizierter Zellen in den PP 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis KbE pro Maus	Fraktion der Phagozyten	Fraktion der B-Zellen	Restzellen
4	8	10^{10}	$8,5 \pm 8,2$	$19,3 \pm 9,5$	$16,1 \pm 13,1$

Mittelwerte \pm Standardfehler (pro 10 PP) aus vier unabhängigen Experimenten

Tatsächlich war nach Infektion mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 die Anzahl infizierter Phagozyten deutlich höher als nach Infektion mit dem SalmoVacSE[®]-Stamm (vergl. Tab. 4). Allerdings ergab die Ausplattierung der Zellen, dass auch die Zahl der infizierten B- und T-Zellen etwa doppelt so hoch war wie die Zahl infizierter Phagozyten. Während der Infektion mit dem SalmoVacSE[®]-Stamm hatten sich auf deutlich niedrigerem Niveau genau entgegengesetzte Verhältnisse ergeben. In diesem Fall waren mehr Phagozyten als B- und T-Zellen infiziert.

Die parallel erfolgte Gesamtkeimzahlbestimmung in den Darmlymphknoten ergab nur für eine Maus 4 Salmonellen im Lymphknoten, die untersuchten Milzen waren sämtlich steril.

4.3.2.4 Untersuchung der Auswirkung von Hungerperioden vor der Infektion auf die Anzahl infizierter Phagozyten in PP

Mit der Nutzung des schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stammes 64/03 war es gelungen, eine erhöhte Anzahl mit lebenden Salmonellen infizierter Zellen aus den PP zu isolieren. In einigen Veröffentlichungen zu oralen Infektionsmodellen beschreiben die Experimentatoren den Entzug von Futter vor der oralen Infektion (DANIELS *et al.*, 1996; SHORTMAN *et al.*, 2000), andere verzichten auf Hungerperioden (BOST & CLEMENTS, 1995; CHONG *et al.*, 1996; MASTROENI *et al.*, 1996; GULIG *et al.*, 1997). Da angenommen werden konnte, dass durch das Hungern die Säureproduktion im Magen der Mäuse sistiert, wurden die Auswirkungen von Hungerperioden auf die Anzahl infizierter Zellen in den PP 12 Stunden

p.i. untersucht. Dadurch konnte jedoch kein Anstieg der Zahl der Salmonellenkolonien in der Fraktion der phagozytierenden Zellen erreicht werden. Es kam im Gegenteil zu einer Verminderung der Salmonellenkolonien (Tab. 8).

Parallel durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen der separierten Einzelzellen 12 Stunden *p.i.* führten nicht zur Detektion von Salmonellenantigen-tragenden Zellen in der Milz und in den PP.

Tab. 8: Anzahl infizierter Phagozyten in den PP 12 Stunden nach oraler Infektion von BALB/c-WT-Mäusen mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 mit Hungerperioden (12 Stunden) vor und nach der Infektion

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Infektionsdosis KbE pro Maus	Fraktion der Phagozyten
3	26	10^{10}	$1,2 \pm 3,23$

Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten pro 10 PP

Mäuse besitzen einen sogenannten Vormagen (persönliche Mitteilung von Frau Scholz, Medizinisch-Experimentelles Zentrum der Universität Leipzig), in dem Futter gespeichert und kontinuierlich an den Hauptmagen abgegeben wird. Deshalb arbeitet der Mäusemagen kontinuierlich, und die Säureproduktion kann durch Hungerperioden nicht eingeschränkt werden. Es sind also *per os* verabreichte Salmonellen, die nach Hungerperioden appliziert werden, der Säure besonders ausgesetzt, da sie nicht von Nahrungsprotein geschützt werden. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass der Anteil lebender Salmonellen im Dünndarm nach Hungerperioden nur sehr gering ist.

4.4.3 Untersuchungen der infizierten Mäuse 4 Stunden *p.i.*

KIRBY *et al.* konnten zeigen, dass sich die Zellpopulation in der Milz infizierter Mäuse schon 4 Stunden *p.i.* nach oraler Infektion signifikant verändert (KIRBY *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass sich das Immunsystem der Mäuse schon innerhalb dieser kurzen Zeit mit den Salmonellen auseinandergesetzt hat. Daraufhin und aufgrund der niedrigen Zahl infizierter Phagozyten 12 Stunden *p.i.*, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die infizierten Mäuse bereits 4 Stunden *p.i.* getötet und die Lokalisation der Salmonellen untersucht.

Für die Untersuchung der Mäuse 4 Stunden *p.i.* wurden die BALB/c-WT-Mäuse mit 1×10^{10} KbE des schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stammes 64/03 oral infiziert. Nach der Tötung wurden die PP, die mesenterialen Lymphknoten und die Milz entnommen, um den Weg

infizierter Zellen zu verfolgen. Aus den Organen wurden die Einzelzellen isoliert und aus jeweils zwei PP erfolgte die Bestimmung der Gesamtkeimzahl. Die Zellpopulationen wurden nicht separiert, sondern die Gesamtzellpopulation ausplattiert. Während der Isolierung der Einzelzellen wurde der anfallende Überstand nicht verworfen, sondern durch Ausplattieren auf das Vorhandensein von extrazellulären Salmonellen untersucht. Es zeigte sich, dass ein ebenso großer Anteil der Salmonellen extrazellulär wie intrazellulär vorlag. Gleichzeitig war zu erkennen, dass in den Lymphknoten nur eine sehr geringe Anzahl an Salmonellen anzutreffen war, während sich die Milzen der Mäuse 4 Stunden *p.i.* noch steril zeigten (Tab. 9).

Tab. 9: **Anzahl der Salmonellenkolonien intrazellulär in Einzelzellen und extrazellulär im Überstand aus PP, Milz und Darmlymphknoten 4 Stunden *p.i.* mit 1×10^{10} KBE *S. Enteritidis* 64/03**

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	intrazellulär in Peyerschen Platten	extrazellulär in Peyerschen Platten	intrazellulär in Lymphknoten	intrazellulär in Milz	extrazellulär in Milz
3	12	11,3 ± 10,6	14,0 ± 14,9	6,9 ± 14,1	0	0

Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten

Die Gesamtkeimzahl aus zwei PP 4 Stunden *p.i.* mit dem schwach virulenten *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 ergab im Durchschnitt 6 Salmonellen, wobei die Zahlen aus den einzelnen Mäusen (12) von 38 bis 0 Salmonellen stark schwankten.

Durchflusszytometrische Untersuchungen der Einzelzellen aus den PP und der Milz ergaben jedoch nicht nur salmonellenantigenhaltige Zellen in den PP, sondern auch in der Milz (Abb. 17). 0,04 % der Einzelzellen aus den PP trugen Salmonellenantigen, während 0,01 % der Einzelzellen aus der Milz Salmonellenantigen enthielten (Werte nach Abzug der Konjugatkontrolle).

In den elektronenmikroskopischen Präparaten der PP und der Milzen konnten keine Salmonellen nachgewiesen werden.

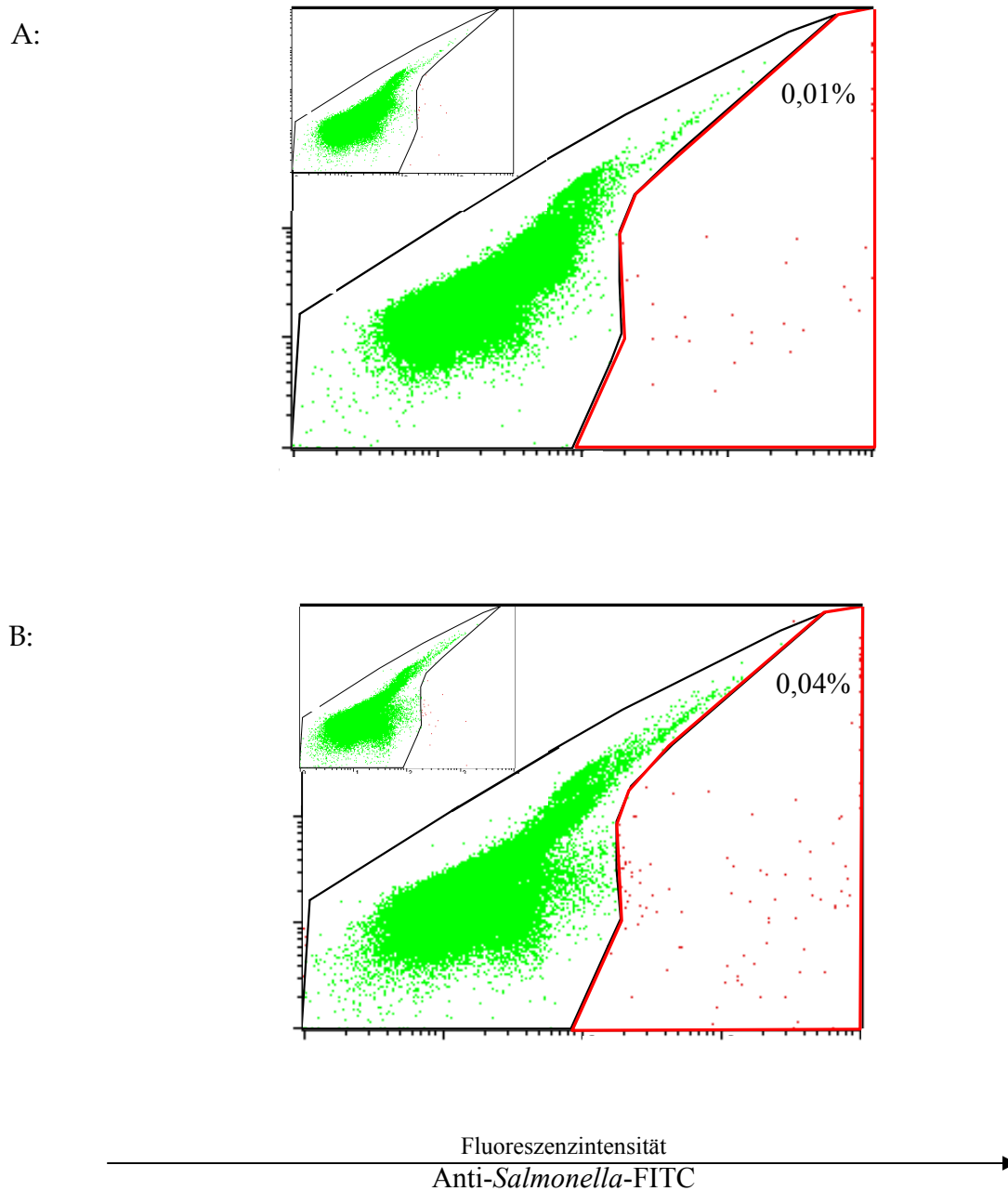


Abb. 17: Nachweis von Salmonellenantigenen in nicht separierten Einzelzellen aus Milz und Peyerschen Platten von BALB/c-WT-Mäusen 4 Stunden *p.i.* mit *S. Enteritidis* 64/03 mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchung

A: Einzelzellen aus Milz

B: Einzelzellen aus Peyerschen Platten

Die nichtinfizierten Zellen sind grün; Zellen, die Salmonellenantigenen enthalten sind rot dargestellt. Der Einsatz in den Abb. jeweils oben links entspricht der Konjugatkontrolle.

Y-Achse: Rot-Fluoreszenz im 2. Analysekanal.

4.4.4 Immunhistologische Untersuchungen der PP aus BALB/c-Mäusen infiziert mit *S. Enteritidis* 64/03 4 Stunden *p.i.* mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

Mit einem konfokalen Mikroskop wurden immunhistologische Untersuchungen an PP nichtinfizierter und 4 Stunden mit *S. Enteritidis*-infizierter Mäuse vorgenommen. Auf Grund der Laser- und Computertechnik besteht die Möglichkeit, verhältnismäßig dicke Schnitte (30 µm) in verschiedenen Ebenen zu untersuchen. Untersucht wurden die PP der BALB/c-WT-Mäuse in Bezug auf die Lokalisation von Salmonellenantigenen im Gewebe sowie die Ausprägung der Oberflächenmoleküle CD11c für DC und F4/80 und CD11b für Mφ.

In den PP der infizierten Mäuse war Salmonellenantigen nachweisbar. Sowohl im Darmlumen als auch im Gewebe der Lymphfollikel (Abb. 18) konnte punktuell Antigen nachgewiesen werden. Es konnte eine diskrete Kolo-kalisation des Antigens mit Zellen gefunden werden, die sich sowohl mit CD11c (DC) als auch für F4/80 / CD11b (Mφ) markieren werden ließen.

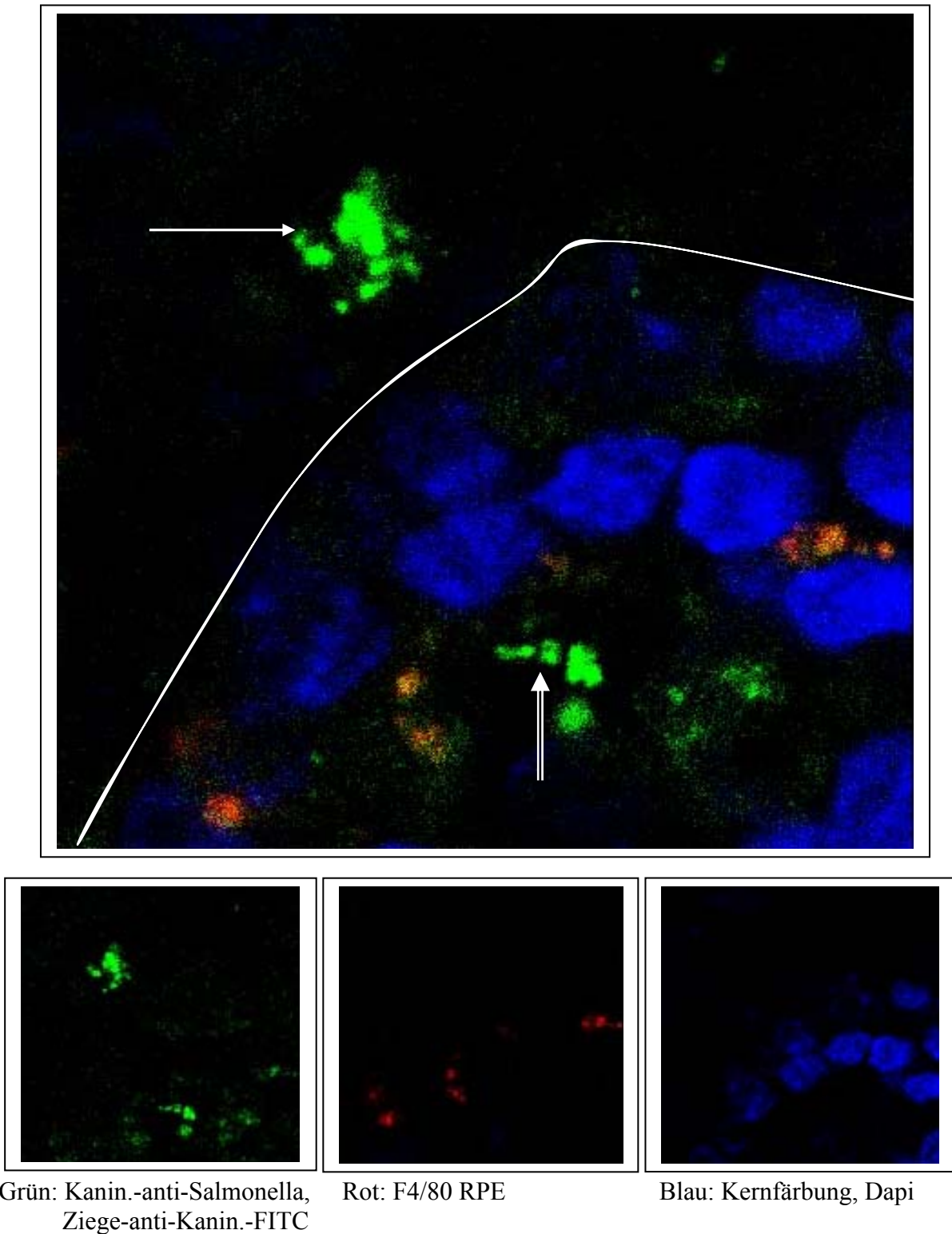


Abb. 18: Nachweis von Salmonellenantigenen im Darmlumen und in der Darmwand, Immunfluoreszenzaufnahme mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

→ Salmonellenantigenen im Darmlumen

⇒ Salmonellenantigenen in der Darmwand

Die durchgezogene Linie zeigt den Übergang Darmepithel-Darmlumen.

4.4.5 Bedeutung von Interleukin-12 während der Frühphase der oralen Salmonelleninfektion

Aufgrund der herausragenden Bedeutung von Interleukin 12 (IL-12) in der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien lag es nahe, zu prüfen, ob IL-12 bereits während der Phase der angeborenen Immunität einer Salmonelleninfektion von Bedeutung ist, da die DC und M ϕ die Hauptproduzenten von IL-12 darstellen. Für diese Untersuchungen standen IL-12p35-defiziente-Mäuse zur Verfügung. Ein Teil dieser Mäuse wurde mit Anti-IL-12p40-Antikörpern behandelt, so dass diese Mäuse funktionell als IL-12p35/p40-defiziente Mäuse anzusehen sind. Beide Gruppen besitzen somit kein funktionelles IL-12p75.

Es wurden vergleichende Infektionen mit BALB/c-WT-Mäusen, BALB/c-IL-12p35-defizienten-Mäusen und BALB/c-IL12p35/p40-defizienten-Mäusen (anti-IL-12p40-behandelt) durchgeführt. Die Mäuse wurden oral mit 10^{10} KbE *S. Enteritidis* 64/03 pro Maus infiziert, vier Stunden *p.i.* getötet und die PP wurden untersucht.

Die Gesamtkeimbelastung in den PP der WT-Mäuse war signifikant niedriger als in den PP der Mäuse, denen IL-12 fehlt (Tab. 10). Die Anzahl infizierter Zellen in den PP war jedoch in den unterschiedlichen Genotypen fast identisch. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Phagozytosevorgang nicht durch IL-12 beeinflusst wird, aber die konstitutive Produktion antimikrobieller Faktoren durch IL-12 gefördert wird (autokrine Regulierung).

Tab. 10: **Bestimmung der Gesamtkeimzahl und der Anzahl infizierter Zellen in den PP von BALB/c-WT- und BALB/c-IL-12-defizienten-Mäusen 4 Stunden *p.i.* mit 1×10^{10} KbE *S. Enteritidis* 64/03 pro Maus**

Anzahl Experimente	Anzahl Mäuse	Genotyp	Gesamtkeimzahl (#)	Anzahl infizierter Zellen
4	16	BALB/c-WT	$6,7 \pm 2,9$	$41,7 \pm 14,8$
4	16	BALB/c-IL-12p35 ^{-/-}	$28,1 \pm 8,9$ *	$49,9 \pm 12,5$
4	16	BALB/c-IL12p35 ^{-/-} + anti-IL-12p40	$34,0 \pm 10,3$	$45,8 \pm 14,0$

* p = 0,0468;

Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier unabhängigen Experimenten, # Homogenat aus jeweils 2 PP, Signifikanz (Student's t-Test) im Vergleich zu den Werten der Wildtyp-Mäuse

Parallel durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben in dieser Versuchsreihe wiederum Salmonellenantigen-haltige Zellen in den PP und der Milz in den WT- und auch den IL-12-defizienten Mäusen (Tab. 11).

Tab. 11: Prozentualer Anteil der infizierten Zellen in Einzelzellsuspensionen von PP und Milz 4 Stunden *p.i.*

Genotypen	infizierte Zellen der Peyerschen Platten	infizierte Zellen der Milz
BALB/c WT	0,42 %	0,13 %
BALB/c IL-12p35 ^{-/-}	0,61 %	0,09 %
BALB/c IL-12p35 ^{-/-} + anti IL-12p40	0,49 %	0,10 %

Die Zellen wurden aus den Mäusen 4 Stunden *p.i.* isoliert. Die Infektionsdosis betrug 1×10^{10} KBE *S. Enteritidis* 64/03 pro Maus. Die durchflusszytometrische Detektion von Salmonellenantigen erfolgte mit Hilfe des spezifischen Kaninchen-anti-Salmonellen-Serums, als Sekundärantikörper wurde der FITC-markierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet.

In Abb. 19 sind die „Scatter-Blot“-Analysen der Einzelzellen der infizierten BALB/c-WT-Mäuse beispielhaft dargestellt.

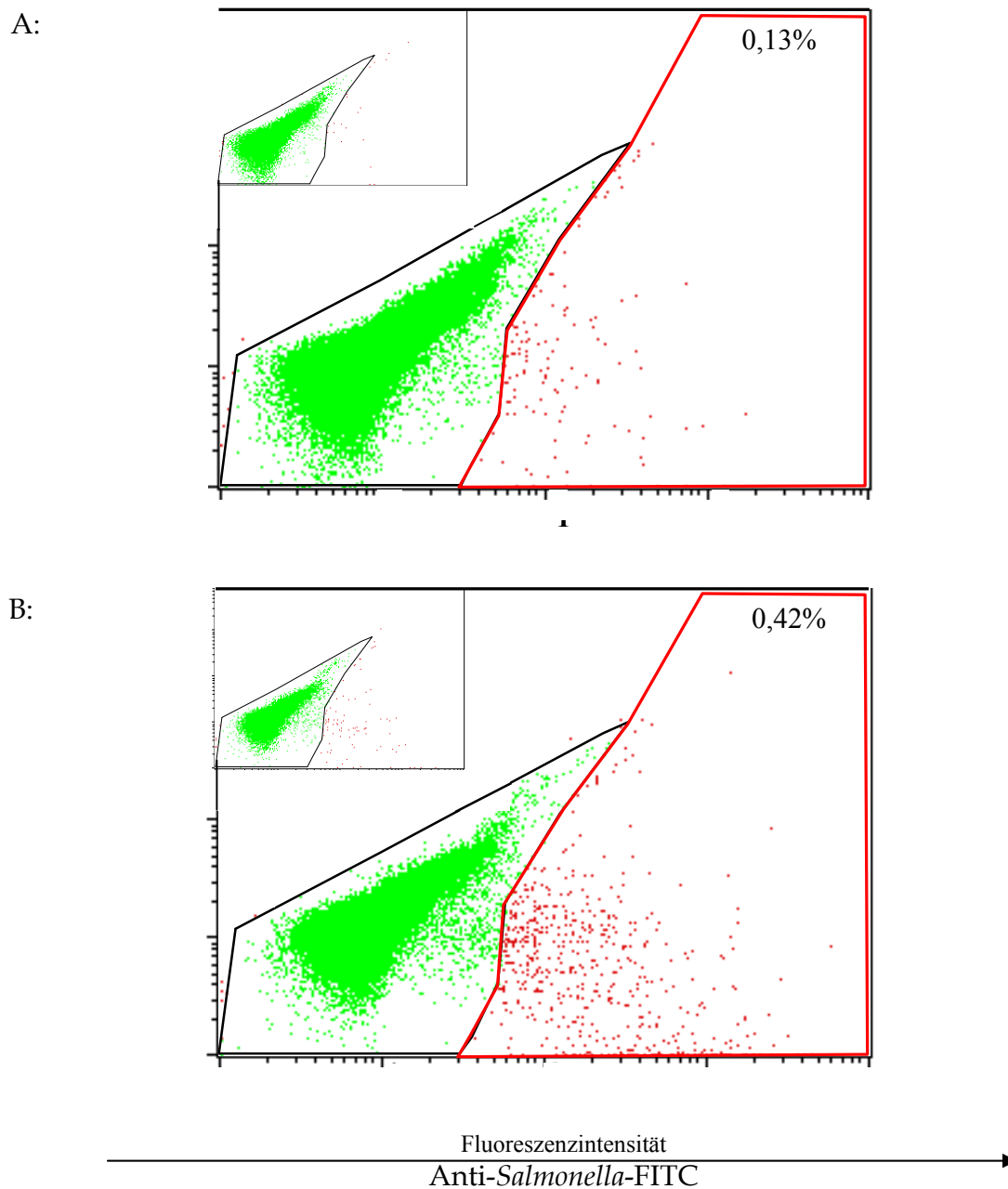


Abb. 19: Nachweis von Salmonellenantigenen in nicht separierten Einzelzellen aus Milz und Peyerschen Platten von BALB/c-WT-Mäusen 4 Stunden *p.i.* mit *S. Enteritidis* 64/03 mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchung

A: Einzelzellen aus Milz

B: Einzelzellen aus Peyerschen Platten

Die nichtinfizierten Zellen sind in beiden Abbildungen grün; Zellen, die Salmonellenantigenen enthalten, sind rot dargestellt. Der Einsatz in den Abb. jeweils oben links entspricht der Konjugatkontrolle. Y-Achse: Rot-Fluoreszenz im 2. Analysekanal.

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, in welchen Zellen der PP lebende Salmonellen und Salmonellenantigen wenige Stunden nach oraler Infektion von Mäusen nachgewiesen werden können. Aufgrund der bekannten Funktion der Dendritischen Zellen und Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen und deren bevorzugter Lokalisation in den lymphatischen Organen des Dünndarms (PP) standen diese Zellen im Mittelpunkt der Arbeit. Die ermittelten Daten belegen, dass Dendritische Zellen genau wie Makrophagen *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* mit Salmonellen infiziert werden können. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in der Frühphase der Salmonelleninfektion in der Darmwand neben den intrazellulären auch extrazelluläre Salmonellen vorhanden sind. Durchflusszytometrische Daten belegen, dass schon vier Stunden nach oraler Infektion mit Salmonellen in der Milz Zellen vorhanden sind, die Salmonellenantigen tragen.

5.2 Etablierung der Nachweismethoden für Salmonellenantigen und Salmonellen

Die immunhistologischen Untersuchungen der *in vitro* infizierten Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zeigten, dass sich mit dem spezifischen Kaninchen-Antiserum Salmonellen gut nachweisen ließen. Das Antiserum reagierte spezifisch mit dem Salmonellenantigen und färbte keine zellulären Strukturen an. Das spezifische Antiserum ermöglichte neben den immunhistochemischen Untersuchungen auch die durchflusszytometrische Analyse von Zellen, die mit Salmonellen infiziert worden waren. Nach dem gleichen Prinzip wie für die immunhistochemischen Untersuchungen wird für die durchflusszytometrische Analyse Salmonellenantigen durch die Kaninchenantikörper markiert. Diese Bindungen werden im über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper der Laseranalyse zugänglich gemacht. Der Vorteil der durchflusszytometrischen Analyse liegt darin, dass eine große Anzahl von Einzelzellen schnell und sicher untersucht werden kann.

Die elektronenmikroskopische Analyse der *in vitro* infizierten Zellen ergab, dass es möglich ist, die subzelluläre Lokalisation der Salmonellen zu erkennen. Die Morphologie der Salmonellen erlaubt es, diese in eukaryotischen Zellen zu identifizieren (GHAFIALLY, 1997). Aufgrund ihrer Innenstruktur ist eine Verwechslung mit Mitochondrien der Zelle nicht möglich.

Lebende Salmonellen konnten in Makrophagen nach Infektion der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 auch noch 24 Stunden *p.i.* durch Ausplattierung infizierter Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis von lebenden Salmonellen in den M ϕ zeigt, wie widerstandsfähig Salmonellen sind. Obwohl zum Zeitpunkt vier Stunden *p.i.* die Anzahl infizierter Zellen nur circa die Hälfte bzw. ein Drittel der Anzahl infizierter Zellen zum Zeitpunkt eine Stunde *p.i.* betrug, sank der Anteil dieser Zellen bis zum Zeitpunkt 24 Stunden *p.i.* nur noch um die Hälfte. Rein rechnerisch hätten bei gleichbleibender Bakterizidie der M ϕ während der gesamten Inkubationsdauer nach 24 Stunden keine lebenden Salmonellen mehr nachweisbar sein dürfen. Dass jedoch immer noch vitale Salmonellen in den infizierten Zellen zu finden waren, kann damit begründet werden, dass Salmonellen in den M ϕ überleben können (FINLAY u. FALKOW, 1989; GARCIA-DEL-PORTILLO u. FINLAY, 1994). Dafür spielen die Virulenzfaktoren der Salmonellen eine Rolle (Kap 2.1.3). Die Genprodukte der Salmonellen-Pathogenitäts-Inseln (*spi*) werden bevorzugt in intrazellulärer Umgebung exprimiert (GULIG *et al.*, 1997). Diese Proteine sind wichtig für das Überleben der Salmonellen in phagozytierenden Zellen. Ihre Expression findet jedoch nicht sofort nach Aufnahme oder Eindringen in eine Zelle statt, sondern es vergehen vier bis fünf Stunden, bis die entsprechenden Gene abgelesen und umgeschrieben worden sind. In dieser Zeit, in der die Salmonellen den Bakterizidiemechanismen der M ϕ ungeschützt ausgesetzt sind, können die M ϕ sehr viele Salmonellen abtöten (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2000). Die Salmonellen, die diese erste Phase überlebt haben, sind nun aber in der Lage, sich mit Hilfe der Genprodukte der *spi* zu schützen. Es kommt also zur Selektion der am besten adaptierten Salmonellen. Diese können in den M ϕ überleben, weshalb die Anzahl infizierter Zellen vom Zeitpunkt vier Stunden *p.i.* bis zum Zeitpunkt 24 Stunden *p.i.* nur geringfügig sinkt.

In vitro konnte gezeigt werden, dass M ϕ bis zum Zeitpunkt sechs Stunden nach einer Salmonelleninfektion 99 % der Infektionsdosis abtöten können, danach bleibt jedoch die Anzahl lebender Salmonellen über lange Zeit (mind. 14 Stunden) konstant (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2000).

Der Vergleich der Sensitivität der unterschiedlichen Methoden zeigte, dass mit Hilfe des spezifischen Kaninchen-anti-Salmonellenserums in den immunhistologischen Untersuchungen und in den Untersuchungen mit Hilfe der Durchflusszytometrie ein deutlich höherer Anteil positiver Zellen gefunden wurde als durch Ausplattieren der infizierten Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Antiserum **Salmonellenantigen** nachweist. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um lebende Salmonellen oder abgebaute Bestandteile der Mikroorganismen handelt. Durch die Ausplattierung der infizierten Zellen werden nur

lebende Salmonellen nachgewiesen, die in der Lage sind, nach ihrem Aufenthalt in den M ϕ weiterzuwachsen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Nachweismethoden wird deutlich, weshalb in den durchflusszytometrischen Untersuchungen ca. 90 % der M ϕ positiv für Salmonellenantigen befunden wurden, während unter gleichen Infektionsbedingungen (Infektionsverhältnis 100 : 1) durch Ausplattieren nur 60 % der M ϕ mit lebenden Salmonellen infiziert waren. Die Sensitivität der immunhistochemischen Methoden ist also deutlich besser als die des Plattierungsverfahrens.

Parallel durchgeführte *In-vivo*-Infektionsversuche an Mäusen hatten nur eine sehr geringe Zahl mit lebenden Salmonellen infizierter Zellen erbracht. Hinweise aus der Literatur machten deutlich, dass die Kultivierungsbedingungen und die Zusammensetzung des Infektionspuffers einen Einfluss auf die Invasivität der Salmonellen *in vivo* haben (CLARK *et al.*, 1998). Mit der Kultivierung in einem Mangelmedium (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Schrödl, Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig) konnte die Invasivität der Salmonellen *in vitro* beeinflusst werden. Es zeigte sich, dass der SalmoVacSE[®]-Stamm kultiviert in Mangelmedium *in vitro* um ein Vielfaches besser in der Lage war, Zellen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 zu infizieren, als der konventionell kultivierte Stamm. Diese erhöhte *In-vitro*-Invasivität war jedoch *in vivo* nicht zu beobachten.

5.3 Nachweis der *In-vitro*-Infizierbarkeit von Dendritischen Zellen der Milz und der Peyerschen Platten mit Salmonellen

Die *In-vitro*-Infektion der isolierten und mit Hilfe des Durchflusszytometers sortierten DC aus den PP und der Milz und die anschließende elektronenmikroskopische Analyse der Zellen ergab, dass DC mit Salmonellen infizierbar sind. Direkt zum Zeitpunkt dieser Erkenntnis veröffentlichten MARRIOTT *et al.* ihre Ergebnisse und bestätigten damit die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten. Zusätzlich konnten sie über Gentamicinbehandlung belegen, dass Salmonellen *in vitro* in DC überleben und sich vermehren können. Bereits eine Stunde *p.i.* konnten sie lebende Salmonellen in DC nachweisen (MARRIOTT *et al.*, 1999). In einer weiteren Veröffentlichung konnten GARCIA DEL PORTILLO *et al.* erneut an Zellkulturen nachweisen, dass Salmonellen in DC überleben können (GARCIA-DEL PORTILLO *et al.*, 2000). Auf Grund unterschiedlicher Infektionsbedingungen konnten sie jedoch nicht zeigen, dass sich Salmonellen in DC vermehren können.

Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergaben, dass die DC tendenziell weniger Salmonellen aufnehmen als die M ϕ . Dies könnte

damit zusammenhängen, dass die DC nur als unreife Zellen gut phagozytieren können und während der Reifung diese Funktion verlieren (BANCHEREAU u. STEINMANN, 1998). Die M ϕ jedoch sind nach ihrer Aktivierung noch besser in der Lage Erreger, zu phagozytieren (AUGER u. ROSS, 1992).

Damit waren *in vitro* alle Möglichkeiten des Nachweises von Salmonellenantigenen durch Einsatz des Kaninchen-Antiserums und durchflusszytometrische Messungen, weiterhin von lebenden Salmonellen mit Hilfe der Gentamicinbehandlung sowie von intrazellulärer Lokalisation der Salmonellen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen etabliert. Diese Vorarbeiten schufen die Voraussetzungen dazu, die entscheidende Frage zu beantworten, ob auch *in vivo* Salmonellen in den Zellen infizierter Mäuse nachweisbar sind.

5.4 Untersuchungen im *In-vivo*-Modell der oralen Salmonelleninfektion in Inzuchtmäusen

In der Literatur werden intraperitoneale (MATSUURA *et al.*, 1990; CONLAN *et al.*, 1994; NAIKI *et al.*, 1999), intravenöse (PIE *et al.*, 1996; MASTROENI *et al.*, 1998; WIJBURG *et al.*, 2000) oder orale (BOOST *et al.*, 1995; CHONG *et al.*, 1996; MASTROENI *et al.*, 1996; GULIG *et al.*, 1997) Infektionsmodelle beschrieben. Histologische Untersuchungen der Darmwand nach einer kurzzeitigen Salmonelleninfektion erfolgten bis jetzt nur in Loop-Modellen (JONES *et al.*, 1994; PENHEITER *et al.*, 1997; HOPKINS *et al.*, 2000). Dazu werden Darmschlingen narkotisierter Mäuse aus dem Abdomen vorverlagert, abgebunden, und in das Darmlumen wird die Salmonellensuspension appliziert. Dieses Vorgehen erlaubt es, die Vorgänge am Darmepithel während einer Salmonelleninfektion realitätsnah zu untersuchen, spiegelt jedoch nicht die natürliche Infektion wieder. Bei der natürlichen bzw. oralen Infektion müssen die Salmonellen den Magen passieren. Dort wird ein Großteil der Salmonellen durch die Magensäure abgetötet, so dass nur ein Bruchteil der Infektionsdosis vital den Dünndarm erreicht. HOHMANN *et al.* hatten festgestellt, dass nur 0,01 % der oralen Infektionsdosis lebend in den Dünndarm gelangen, und dass von diesen Salmonellen etwa 25 % mit den PP assoziiert sind (HOHMANN *et al.*, 1978). Die toten Bakterien setzen große Mengen LPS frei, welches zusätzlich das Darmepithel schädigt und deshalb die Invasivität der Salmonellen beeinflusst (STENZEL, 1975; JONES *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994; MERCER *et al.*, 1996). Die Untersuchungen in den oralen Modellen beschränkten sich auf die Analyse der Gesamtkeimzahlen in den PP und anderen Organen ab dem Zeitpunkt zwei Tage *p.i.* oder auf den Nachweis der Induktion von Zytokinen auf mRNA-Ebene

(RAMARATHINAM *et al.*, 1991; BOOST *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der phagozytierenden Zellen innerhalb der ersten Stunden einer oralen Salmonelleninfektion untersucht werden. Dabei wurde auf die Wiederfindung der Salmonellen, die durch die orale Infektion in den Organismus gelangten, Wert gelegt. Deshalb erfolgten die Analysen innerhalb des ersten Tages *p.i.*

Für die Etablierung des oralen Infektionsmodells musste vorher untersucht werden, welcher maximalen Infektionsdosis eine Maus ausgesetzt werden müsste, damit möglichst viele lebende Salmonellen in den Dünndarm gelangen, aber die Mäuse nicht am LPS-Schock innerhalb der ersten Stunden einer oralen Salmonelleninfektion sterben (GALANOS u. FREUDENBERG, 1993). Diese Infektionsdosis sollte auch ausreichend sein, um eine Serokonversion der Mäuse zu erreichen. Die spezifische IgG- und IgA-Immuntantwort der Mäuse war der Nachweis für die spezifische Antigenpräsentation durch M ϕ oder DC.

Die durchgeführten Infektionsversuche zur Bestimmung der Infektionsdosis zeigten, dass der *S. Enteritidis*-Impfstamm SalmoVacSE[®] in einer sehr hohen Infektionsdosis (1×10^{10} und 1×10^{11} KbE pro Maus) eingesetzt werden konnte, mit geringer Gefahr, dass die Mäuse innerhalb von 24 Stunden sterben würden. Da die klinischen Anzeichen der Mäuse nach Infektion mit 1×10^{11} KbE Salmonellen pro Maus auf eine Schocksymptomatik hinwiesen, wurde für folgende Experimente eine Infektionsdosis von 1×10^{10} KbE pro Maus gewählt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass schon ein Inokulum von 5×10^4 KbE des Impfstamm SalmoVacSE[®] pro Maus ausreicht, um hohe antigenspezifische Antikörpertiter zu induzieren. Dies bedeutet, dass phagozytierende Zellen Salmonellenantigen aufgenommen, prozessiert und den Effektorzellen des Immunsystems präsentiert haben.

Zur histologischen Untersuchung der Vorgänge während der Salmonelleninfektion im Loop-Modell hatten die Autoren Infektionszeiten von ein bis drei Stunden gewählt (JONES *et al.*, 1994; PENHEITER *et al.*, 1997; HOPKINS *et al.*, 2000). Deren Ergebnisse bzw. die histologischen Abbildungen zeigen die Salmonellen im Bereich des Epithels bzw. direkt unterhalb der Basallamina der M-Zellen. Diese Infektionszeit scheint also nicht ausreichend zu sein, um den Salmonellen das Erreichen der subepithelialen Domregion zu ermöglichen. Für die vorliegende Arbeit interessierten jedoch besonders die Salmonellen im Bereich der PP, deshalb wurde der Untersuchungszeitpunkt zunächst mit 12 Stunden *p.i.* festgelegt. Damit sollte eine ausreichende Anzahl lebender Salmonellen die Gelegenheit erhalten, die Darmbarriere zu passieren und von phagozytierenden Zellen aufgenommen zu werden. Gleichzeitig sollte mit dem Zeitraum sichergestellt werden, dass die Phagozyten noch nicht alle internalisierten Salmonellen abgetötet und prozessiert hatten.

5.4.1 Nachweis von lebenden Salmonellen 12 Stunden nach *In-vivo*-Infektion von Mäusen in separierten Einzelzellen aus den PP

In der Fraktion der phagozytierenden Zellen, die aus den PP isoliert wurden, konnten 12 Stunden *p.i.* durch Ausplattieren lebende Salmonellen nachgewiesen werden. Die Anzahl der Zellen, in denen lebende Salmonellen nachgewiesen werden konnten, war jedoch sehr niedrig. Trotz der relativ hohen Infektionsdosis von 1×10^{10} KbE des SalmoVacSE[®]-Stammes pro Maus zeigte sich die Eigenschaft eines Impfstammes, nämlich die hohe Empfindlichkeit gegen Reaktionen des Immunsystems und die geringe Persistenz im infizierten Organismus.

Die orale Infektion mit Salmonellen kultiviert in Mangelmedium, die *in vitro* eine stark erhöhte Invasivität gezeigt hatten, brachte keine Steigerung der Anzahl infizierter Zellen in den PP. In der Literatur wird dieses Phänomen von CLARK *et al.* beschrieben (CLARK *et al.*, 1998). CLARK *et al.* erkannten, dass das Verhalten der Salmonellen während der *In-vitro*-Infektion von Zellkulturen keinen Rückschluss auf ihr Verhalten während einer *In-vivo*-Infektion zulässt.

Da die Infektion mit dem attenuierten Impfstamm nur zu einer niedrigen Anzahl infizierter Phagozyten führte, wurde in den folgenden Experimenten der schwach virulente *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 eingesetzt. Dabei handelt es sich um den nicht attenuierten Elternstamm des *S. Enteritidis*-Impfstammes SalmoVacSE[®]. Mit diesem schwach virulenten Stamm konnten 12 Stunden *p.i.* aus den Mäusen eine etwa doppelt so hohe Anzahl infizierter Zellen isoliert werden wie nach Infektion mit dem SalmoVacSE[®]-Stamm. Während die Zahl der infizierten Phagozyten und die Zahl infizierter B- und T-Zellen bei Infektion mit dem Impfstamm fast identisch war, wurde in diesem Experiment festgestellt, dass die Anzahl der infizierten B- und T-Zellen doppelt so hoch war wie die der infizierten Phagozyten. Die Lymphknoten waren auch in diesem Experiment steril, so dass eine Abwanderung der Zellen, die lebende Salmonellen tragen, und freier Salmonellen ausgeschlossen werden konnte.

Die erhöhte Virulenz des *S. Enteritidis*-Stamm 64/03 führte also dazu, dass in der Fraktion der B- und T-Zellen vermehrt infizierte Zellen auftraten. Auf Grund der Charakterisierung der Zellpopulation über die Oberflächenmoleküle kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den infizierten Zellen nicht doch um Phagozyten handelt, da sie innerhalb der Fraktion der B- und T-Zellen immerhin ca. 20 % der Zellen darstellen. In Untersuchungen an Ratten hatten LIU u. MacPHERSON festgestellt, dass nach intraintestinaler Antigenapplikation 8 Stunden *p.i.* antigentragende DC im *Ductus thoracicus* vorhanden waren. Diese Zellen hatten sie durch Fistulierung des *Ductus thoracicus* der Ratten direkt aus der Lymphe gewonnen und über Zentrifugation aufgereinigt. Dabei erreichten sie eine

Anreicherung der DC auf 60-80 %. Die größte Fraktion der kontaminierenden Zellen stellten die B-Zellen dar. Die Fähigkeit der isolierten Zellen zur Antigenpräsentation wurde über einen Test zur T-Zellstimulation nachgewiesen (LIU u. MacPHERSON, 1991).

Außer den DC waren andere Zellen der Lymphe (z.B. B-Zellen) nicht in der Lage, Antigen aus dem Darm zu präsentieren (LIU u. MacPHERSON, 1991; GUÉRY *et al.*, 1996).

HOPKINS *et al.* hatten drei Tage nach oraler Infektion von Mäusen mit 5×10^7 KBE eines attenuierten *S. Typhimurium*-Stamms pro Maus nur sehr wenige intrazelluläre Salmonellen in den Zellen der PP gefunden (3 intrazelluläre Salmonellen pro 1×10^6 isolierter Einzelzellen der PP). Dabei konnten sie jedoch durch Ausplattierung der isolierten und depletierten Zellpopulationen nachweisen, dass diese Salmonellen nur in den DC, aber nicht in den B-Zellen vorhanden waren (HOPKINS *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnten lebende Salmonellen in den separierten Zellfraktionen der PP nachgewiesen werden. Auf Grund der geringen Anzahl der Salmonellen pro Zellfraktion war es nicht möglich, die Salmonellen den Zellpopulationen, die über die Oberflächenmoleküle analysiert wurden, zuzuordnen. In zukünftigen Untersuchungen könnte über gezielte Depletion einzelner Zellpopulationen aus den isolierten Fraktionen die Lokalisation der Salmonellen geklärt werden.

5.4.2 Nachweis extra- und intrazellulärer Salmonellen in den PP und Salmonellenantigen-tragender Zellen in der Milz vier Stunden *p.i.*

KIRBY *et al.* hatten in ihren Untersuchungen festgestellt, dass sich bereits vier Stunden nach einer oralen Infektion von Mäusen mit Salmonellen die Zellpopulation in der Milz verändert (KIRBY *et al.*, 2001). Das bedeutet, dass sich der Organismus schon während dieser kurzen Zeit *p.i.* mit den Salmonellen auseinandergesetzt hat und proinflammatorische Faktoren (Zytokine) vom Darm (Infektionsort) in die Milz gelangt sind. Da die Darmwand bzw. die PP die ersten Organe sind, die die Salmonellen passieren müssen, bevor proinflammatorische Faktoren vom Darm in die Milz gelangen können, wurde die Verteilung der Salmonellen im Bereich der PP zum Zeitpunkt vier Stunden *p.i.* analysiert. Die differenzierte Ausplattierung der intra- und extrazellulären Salmonellen der PP und der Milz ergab, dass ein ebenso großer Anteil der lebenden Salmonellen in den PP intrazellulär wie extrazellulär vorlag, während in der Milz keine lebenden Salmonellen nachgewiesen werden konnten. Auch wenn die DC und M ϕ dicht unterhalb der M-Zellen anzutreffen sind (NEUTRA *et al.*, 1996; KELSALL u. STROBER 1996), sind sie nicht in der Lage, innerhalb von wenigen Stunden nach der oralen

Infektion alle eingedrungenen Erreger zu phagozytieren. Die histologischen Untersuchungen in Loop-Modell zeigen deutlich, dass bei einer Infektionsdosis von 8×10^7 KBE, die direkt in einen Darmabschnitt appliziert wird, auch drei Stunden *p.i.* extrazelluläre Salmonellen (*S. Typhimurium*) im Gewebe anzutreffen sind (JONES *et al.*, 1994; PENHEITER *et al.*, 1997). Allerdings wird bei einer so hohen Infektionsdosis, die direkt in den abgebundenen Darmabschnitt appliziert wird, die Darmbarriere überlastet, so dass die Salmonellen nicht mehr „gerichtet“ über die M-Zellen in die Darmwand gelangen, sondern sehr wahrscheinlich jede Lücke im Epithel nutzen. Dadurch besteht für die phagozytierenden Zellen kaum die Möglichkeit, die Masse der Salmonellen zu phagozytieren. Die Befunde aus dem Loop-Modell spiegeln also nur in Ansätzen die Verhältnisse während einer oralen Salmonelleninfektion wider.

Die Lymphknoten und die Milz waren vier Stunden *p.i.* immer noch steril. Es konnten aber über durchflusszytometrische Untersuchungen Salmonellenantigen-tragende Zellen in der Milz und in den PP festgestellt werden. Das bedeutet, dass schon vier Stunden *p.i.* antigenpräsentierende Zellen aus den PP Salmonellenantigen aufgenommen haben und über die afferente Lymphe in den Lymphknoten, über die efferente Lymphe in den Blutstrom und über den Blutstrom in die Milz gelangt sind. Der Anteil der Zellen, in denen über durchflusszytometrische Analyse Salmonellenantigen festgestellt worden war, betrug zwischen 0,09 % und 0,61 % der Gesamtzellpopulation. Dieser geringe Anteil positiver Zellen reichte leider nicht aus, um diese Zellen über Oberflächenmolekülanalyse zu charakterisieren.

Dagegen scheint dieser niedrige Prozentsatz Antigen-tragender Zellen jedoch auszureichen, um eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass es sich bei diesen Zellen um DC handelt (LIU u. MacPHERSON, 1995; GUÉRY *et al.*, 1996), die die effektivsten APC des Immunsystems darstellen.

5.4.3 Die Bedeutung von IL-12 während der Frühphase der oralen Salmonelleninfektion

Interleukin-12 (IL-12p75) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von M ϕ und DC nach Phagozytose eingedrungener Bakterien gebildet wird (TRINCHIERI, 1998 b; YRLID *et al.*, 2000). Sezerniertes IL-12p75 stimuliert natürliche Killerzellen zur Produktion und Sekretion von Interferon-gamma (IFN- γ) (TRINCHIERI, 1998). IL-18 aus aktivierten DC und M ϕ fördert auch die IFN- γ -Produktion, kann IL-12p75 aber nicht ersetzen (DYBING *et al.*, 1999). IFN- γ wirkt synergistisch mit dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) wiederum auf M ϕ und

führt zur verstärkten Bildung antimikrobieller Faktoren (reaktive Sauerstoffmetabolite, Stickstoffmonoxid) durch die M ϕ . Dadurch sind die aktivierten M ϕ in der Lage, die phagozytierten Bakterien effektiv abzutöten.

IL-12p40-mRNA konnte *in vitro* in M ϕ erst vier Stunden nach Stimulation nachgewiesen werden (CHONG *et al.*, 1996). Allerdings wird auch berichtet, dass IL-12 konstitutiv von M ϕ und DC gebildet wird und in gebundener Form an der Zellmembran vorliegt (FAN *et al.*, 1996; QUINONES *et al.*, 2000). Von dort wird es innerhalb weniger Minuten nach Stimulation freigesetzt (QUINONES *et al.*, 2000). Da bakterielle Faktoren *in vivo* erst nach circa acht Stunden zu messbarem, freiem IL-12p75 führen (ASTE-AMEZAGA *et al.*, 1998), könnten die Unterschiede in den Gesamtkeimzahlen der PP vier Stunden *p.i.* auf bereits vorhandenes IL-12p75 zurückzuführen sein. IL-12p75 hat auf die Phagozytose keinen Einfluss (AUGER u. ROSS, 1992), könnte aber die frühen antimikrobiellen Mechanismen beeinflussen. Wir konnten in einer anderen Studie zeigen, dass nach *i.p.*-Infektion mit Salmonellen IL-12p40 sowohl in den Tagen drei und vier *p.i.* und auch am Tag 20 *p.i.* einen positiven Effekt auf die antimikrobielle Aktivität der Phagozyten hat (LEHMANN *et al.*, 2001).

In den hier dargestellten Experimenten konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen IL-12p35^{-/-}-defizienten Mäusen und IL-12p35^{-/-}-defizienten Mäusen, die mit anti-IL-12p40-Antikörpern behandelt wurden, festgestellt werden. In beiden Gruppen war die Gesamtkeimzahl in zwei PP fast identisch (IL12p35^{-/-}: 28,1 \pm 8,9 Salmonellen, IL12p35^{-/-} anti IL12p40 behandelt: 34,0 \pm 10,3 Salmonellen). Die Gesamtkeimzahl in zwei PP der WT-Mäuse war jedoch signifikant niedriger (6,7 \pm 2,9 Salmonellen). Im oralen Infektionsmodell scheint also IL-12p75 funktionell dominant zu sein. Die Anzahl der infizierten Zellen war in allen Genotypen fast identisch. Dies bestätigt, dass IL-12p75 die Phagozytoseleistung der Zellen nicht beeinflusst, andererseits zeigt es, dass IL-12p75 tatsächlich sehr frühe antimikrobielle Mechanismen fördert.

Ob das IL-12p75 von M ϕ oder DC stammt, muss in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden.

5.4.4 Die Untersuchungen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnten RICHTER-DAHLFORS *et al.* Salmonellen in der Leber von Mäusen drei Tage *p.i.* nachweisen (RICHTER-DAHLFORS *et al.*, 1997). Die

Mäuse waren *intravenös* mit 65 KbE eines hochvirulenten *S. Typhimurium*-Stammes pro Maus infiziert worden. Während in Leberhomogenaten die Salmonellen über Ausplattierung bereits einen Tag *p.i.* nachgewiesen werden konnten, wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erst drei Tage *p.i.* Salmonellen in der Leber gefunden. Die Gesamtkeimzahl in der Leber betrug zu diesem Zeitpunkt 1×10^5 KbE.

Den Nachweis, dass Salmonellen nach oraler Infektion von Mäusen in den DC der PP überleben können, erbrachten HOPKINS *et al.* (HOPKINS *et al.*, 2000). Sie konnten im Loop-Modell und nach oraler Infektion von Mäusen vier Stunden *p.i.* die intrazelluläre Lokalisation von Salmonellen in DC nachweisen. Zur Infektion der Darmschlingen nutzten sie 1×10^{10} KbE eines GFP-transformierten *S. Typhimurium*-Stamms, während die Mäuse oral mit 1×10^{11} KbE des gleichen Stamms infiziert wurden. GFP-transformierte Salmonellen produzieren ein grün fluoreszierendes Protein, welches mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann. Die Assoziation der Salmonellen mit den DC wiesen HOPKINS *et al.* durch konfokale Mikroskopie nach. Dafür nutzten sie 11 PP aus dem Loop-Modell. Zu beachten ist dabei, dass die Infektionsdosen, die HOPKINS *et al.* verwendeten, nicht zu identischen Verhältnissen im Darm führten. Im Loop-Modell gelangen alle Salmonellen der Infektionsdosis lebend in den Dünndarm, während nach oraler Infektion nur 0,01 % der applizierten Salmonellen lebend in den Dünndarm gelangen (HOHMANN *et al.*, 1978).

BUMANN konnte nach oraler Infektion von Mäusen mit einem GFP-transformierten *S. Typhimurium*-Stamm die Salmonellen sieben Tage *p.i.* in den PP über die Fluoreszenz der Salmonellen nachweisen (BUMANN, 2001). Die Gesamtkeimzahlbestimmung in den PP sechs Stunden *p.i.* erbrachte nur sehr geringe Salmonellenzahlen (ca. 100 Salmonellen in den PP einer Maus). Erst am Tag sieben *p.i.* konnten ca. 6×10^4 Salmonellen in den PP einer Maus nachgewiesen werden.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich nur sehr wenige Salmonellen nach dem Eindringen in die Darmwand dem Angriff des Immunsystems entziehen können. Eine geringe Zahl der Bakterien kann jedoch in Phagozyten überleben. Diese Bakterien sind dann in der Lage, sich nach einer Anpassungszeit in den Zellen zu vermehren. Deshalb steigt z.B. die Gesamtkeimzahl in den PP oder in der Leber einige Tage *p.i.* um das 1.000-fache an und erst dann ist es über mikroskopische Methoden möglich, die Salmonellen sicher in den Zellen der PP nachzuweisen. Dabei handelt es sich jedoch um sekundäre Salmonellen und nicht um die primären Salmonellen der Infektionsdosis.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erfolgten vier Stunden *p.i.* an den PP der infizierten Mäuse. Damit konnten zwar geringe Mengen

Salmonellenantigen in den PP nachgewiesen werden, aber es war vier Stunden *p.i.* nicht möglich, genügend Salmonellenantigen zu finden, um eine gesicherte Kolo-kalisation mit Phagozyten (DC oder M ϕ) nachzuweisen. Es ließen sich zu diesem Zeitpunkt auch nur sehr wenig Zellen, die Salmonellenantigen trugen, in den PP über durchflusszytometrische Analysen darstellen. Die Gesamtkeimzahl in den PP einer Maus betrug vier Stunden *p.i.* ca. 40 bis 200 Salmonellen. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um primäre Salmonellen, die direkt aus dem Inokulum stammen. Der geringe Erfolg der konfokalen Untersuchungen vier Stunden *p.i.* entspricht jedoch den Befunden von RICHTER-DAHLFORS *et al.* und BUMANN, die auch nach intravenöser Infektion frühestens am dritten Tag *p.i.* über mikroskopische Methoden (sekundäre) Salmonellen in Organen der infizierten Mäuse nachweisen konnten.

6 Zusammenfassung

Nachweis intrazellulärer Salmonellen in phagozytierenden Zellen nach oraler Infektion von Mäusen

Die orale Aufnahme von Salmonellen stellt den natürlichen Infektionsweg für Mensch und Tier dar. Gelingt es den Salmonellen vom Darmlumen über das Darmepithel in den Organismus zu gelangen, können sie eine systemische Infektion hervorrufen (Septikämie, Typhus). Die Darmwand stellt die entscheidende Barriere dar, deren Abwehrfunktion bei Salmonelleninfektion im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden sollte.

Die Peyerschen Platten (PP), die in die Darmwand eingelagert sind und an den Bereich der M-Zellen angrenzen, stellen Lymphfollikel dar. In dem Grenzbereich zwischen M-Zellen und PP befinden sich viele Makrophagen und Dendritische Zellen. Diese Zellen sind als „antigen-presenting cells“ (APCs) besonders gut in der Lage, transloziertes Antigen aufzunehmen, es zu prozessieren und in Verbindung mit MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, um Effektorzellen des Immunsystems zu aktivieren.

Es wurden Nachweismethoden für Salmonellenantigen und Salmonellen etabliert. Mit Hilfe eines spezifischen Antiserums konnte Salmonellenantigen über immunhistochemische und durchflusszytometrische Methoden nachgewiesen werden. Lebende Salmonellen wurden über die Ausplattierung auf XLD-Agarplatten detektiert. Isolierte Einzelzellen aus den PP wurden über Dichtegradientenzentrifugation in die Fraktion der phagozytierenden Zellen und in die Fraktion der B- und T-Zellen separiert und analysiert.

Nach *In-vitro*-Infektion isolierter Dendritischer Zellen konnten über elektronenmikroskopische Analyse Salmonellen in den Dendritischen Zellen nachgewiesen werden.

12 Stunden nach oraler Infektion der BALB/c-WT-Mäuse wurden über Ausplattierung Salmonellen in der Fraktion der phagozytierenden Zellen sowie der B- und T-Zellen der PP nachgewiesen. Der Anteil der infizierten Zellen war jedoch sehr niedrig. 4 Stunden nach oraler Infektion der Mäuse war ein ebenso großer Anteil der Salmonellen in den PP intrazellulär wie extrazellulär vorhanden.

Salmonellenantigentragende Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst. So zeigte sich, dass bereits vier Stunden nach oraler Infektion ca. 0,09 % bis zu 0,61 % der Zellen aus Milz und den PP mit Salmonellenantigenen beladen waren. Dies ist ein äußerst

niedriger Anteil von Zellen, doch dieser niedrige Prozentsatz der antigenpräsentierenden Zellen reicht aus, um eine effektive Immunantwort zu induzieren.

Histologische Untersuchungen auf Entzündungsreaktionen ergaben vier Stunden *p.i.* keinen Hinweis auf eine Entzündung. Mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten keine Salmonellen in den PP nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Organkeimlasten der PP der Mäuse mit und ohne Interleukin 12 (IL-12) zeigte signifikante Unterschiede. Während die Gesamtkeimzahl zweier PP in den Wildtypmäusen nur 7 Salmonellen betrug, konnten in den IL-12-defizienten Mäusen 28 bzw. 34 Salmonellen nachgewiesen werden.

Das IL-12 wird als Reaktion auf einen entzündlichen Reiz gebildet, liegt aber auch in membrangebundener Form konstitutiv auf Makrophagen und Dendritischen Zellen vor. IL-12 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Bakterizidiemechanismen. Deshalb ist es möglich, dass das IL-12 in den Wildtypmäusen zu einer verbesserten Abtötung der Bakterien führte. In den IL-12-defizienten Mäusen trug die Abwesenheit von IL-12 dazu bei, dass ein höherer Anteil der eingedrungenen Bakterien am Leben blieb.

7. Summary

Detection of intracellular *Salmonellae* in phagocytic cells after oral infection of mice

The oral-faecal route is the general way for *Salmonella* to infect humans and animals. If *Salmonella* is able to reach the distal ileum and caecum, it can invade the mucosa and cause systemic diseases (septicemia, typhoid fever). The gut mucosa is the most important barrier, which defense function will be characterised in this work.

The Peyer's patches are lymphoid tissues and are located in the gut mucosa. They are colocalized with the M-cells in the gut epithelium. In this border region between epithelium and Peyer's patches reside a lot of macrophages and dendritic cells. These are antigen presenting cells and they can phagocytize antigen (bacteria), process antigen and present antigen in the lymphoid tissue to naive T-cells to activate them for a specific immune response.

We established methods to detect Salmonella antigen and live *Salmonellae*. With a Salmonella-specific antiserum we could find Salmonella antigen by immunohistological and flow cytometric methods. Live *Salmonellae* were detected by plating on selective agar plates. Single cells were isolated from Peyer's patches and separated in phagocytic cells and B and T cells and analysed by several methods.

After *in vitro* infection of isolated dendritic cells we detected *Salmonellae* in dendritic cells by electron microscopy. Therefore, *Salmonellae* are able to infect dendritic cells.

12 hours after oral infection *Salmonellae* could be detected in phagocytic cells and B and T cells isolated from Peyer's patches. The number of infected cells was very low in all cases. Four hours post infection there was about the same frequency of extracellular and intracellular *Salmonellae*.

Salmonella antigen bearing cells were detected by single cell analysis four hours post infection. The analysis showed 0,09 % to 0,61 % cells of Peyer's patches or spleen positive for *Salmonella* antigen. This is only a low number of antigen-presenting cells, but it seems to be enough to induce an effective immune response.

The bacterial burden in the Peyer's patches was different between mice with and without IL-12. While the bacterial burden of two Peyer's patches out of wild-type mice was only seven *Salmonellae*, two Peyer's patches of IL-12 knock out mice carried 28 to 34 *Salmonellae*. The number of infected cells was the same in wild-type and IL-12 knockout mice.

IL-12 is produced during inflammatory responses to pathogens, but it is also available as a membrane-bound pool on macrophages and dendritic cells. It does not influence the phagocytic mechanisms, but has a very important role in inducing bactericidal activity. Therefore, it is possible that IL-12 in wild-type mice allows for a better killing of *Salmonellae*, while the lack of IL-12 in knockout mice leads to a reduced killing of *Salmonellae*.

8 Literaturverzeichnis

- ATKINSON, P.G.P. u. C.H. BARTON (1999):
High level expression of Nramp1^{G169} in RAW264.7 cell transfectants, analysis of intracellular iron transport.
Immunology 96, 656-66
- AUGER, M.J. u. J.A. ROSS (1992):
The biology of the macrophage. In, *The Macrophage*. Vol. 1 (LEWIS, C.E. u. J.O. McGEE) Oxford University Press, New York, 1-74
- ASTE-AMEZAGA, M., X. MA, A. SARTORI u. G. TRINCHIERI (1998):
Molecular Mechanisms of the Induction of IL-12 and Its Inhibition by IL-10.
J. Immun. 160, 5936-5944
- BANCHEREAU, J. u. R.M. STEINMANN (1998):
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 392, 245-252
- BOOST, K.L. u. J.D. CLEMENTS (1995):
In Vivo Induction of Interleukin-12 mRNA Expression after oral Immunization with *Salmonella dublin* or the B Subunit of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin.
Infect. Immun. 63, 1076-1083
- BUMANN, D. (2001):
In Vivo Visualization of Bacterial Colonization, Antigen Expression, and Specific T-Cell Induktion following Oral Administration of Live Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.
Infect. Immun. 69, 4618-4626
- CAMACHO VILLARREAL, N.G., J. VENTURA-JUAREZ, F.J. CASTANEDA-IBARRA, L. RUIZ-MAYA, E. GARCIA-LATORRE u. R. CAMPOS-RODRIGUEZ (1995):
Induction of humoral immune response to *Salmonella typhimurium* in mouse Peyer's patches.
Rev. Latinoam. Microbiol. 37, 153-160
- CHONG, C., K.L. BOOST u. J.D. CLEMENTS (1996):
Differential Production of Interleukin-12 mRNA by Murine Macrophages in Response to Viable or Killed *Salmonella* ssp.
Infect. Immun. 64, 1154-1160
- CIRILLO, D.M., R.H. VALDIVIA, D.M. MONACK u. S. FALKOW (1998):
Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival.
Mol. Microbiol. 30, 175-188
- CLARK, M.A., M.A. JEPSON, N.L. SIMMONS u. B.H. HIRST (1994):
Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells.
Res. Microbiol. 145, 543-552
- CLARK, M.A., B.H. HIRST u. M.A. JEPSON (1998):
Inoculum Composition and *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Regulate M-Cell Invasion and Epithelial Destruction by *Salmonella typhimurium*.
Infect. Immun. 66, 724-731
- CONLAN, J.W. u. R.J. NORTH (1994):
Listeria monocytogenes, but Not *Salmonella typhimurium*, Elicits a CD18-Independent Mechanism of neutrophil Extravasation into Murine Peritoneal Cavity.
Infect. Immun. 62, 2702-2706

- DANIELS, J.J.D., I.B. AUTENRIETH, A. LUDWIG u. W. GOEBEL (1996):
The Gene *slyA* of *Salmonella typhimurium* Is Required for Destruction of M Cells and Intracellular Survival but Not for Invasion or Colonization of the Murine Small Intestine.
Infect. Immun. 64, 5075-5084
- DYBING, J.K., N. WALTERS u. D.W. PASCUAL (1999):
Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated *Salmonella typhimurium* infections.
Infect. Immun. 67, 6242-6248
- EKZEMPLIAROV, O.N., (1965):
[Multiplikation of *S. typhimurium* in macrophages in vitro.]
Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 42, 88-92
- FAN, X., V. SIBALIC, E. NIEDERER u. R.P. WUTHRICH (1996):
The proinflammatory cytokine interleukin-12 occurs as a cell membrane-bound form on macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 225, 1063-1067
- FIERER, J. u. D.G. GUINEY (2001):
Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection.
J. Clin. Invest. 107, 775-780
- FINLAY, B.B. u. S. FALKOW (1989):
Salmonella as an intracellular parasite.
Mol. Microbiol. 12, 1833-41
- FRIEDEL, R., I. TRAUTSCHOLD, K. GARTNER, M. HELLE-FELDMANN u. D.GAUDSUHN (1975):
Effects of blood sampling on enzyme activities in the serum of small laboratory animals. (Einfluß verschiedener Methoden zur Blutgewinnung auf Enzym-Aktivitäten im Serum kleiner Laboratoriumstiere.)
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 499-505.
- GALANOS, C. u. M. FREUDENBERG (1993):
Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity.
Immunobiology 187, 346-356
- GARCIA-DEL PORTILLO, F. u. B.B. FINLAY (1994):
Invasion and intracellular proliferation of *Salmonella* within non-phagocytic cells.
Microbiologia 10, 229-238
- GARCIA-DEL PORTILLO, F., H. JUNGNITZ, M. ROHDE u. C. GUZMÁN (2000):
Interaction of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium with Dendritic Cells Is Defined by Targeting to Compartments Lacking Lysosomal Membrane Glycoproteins.
Infect. Immun. 68, 2985-2991
- GARVIS, S.G., C.R. BEUZON u. D.W. HOLDEN (2001):
A role for the PhoP/Q regulon in inhibition of fusion between lysosomes and *Salmonella*-containing vacuoles in macrophages.
Cell. Microbiol. 11, 731-741
- GHADIALLY, F.N. (1997):
Heterolysosomes and autolysosomes. In: Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. Fourth Edition Volume 2 (F.N. GHADIALLY).
Butterworth Heinemann, Boston, Oxford, 624-629

- GILLESSEN, S., D. CARAJAVAL, P. LING, F.J. PODLANSKI, D.L. STREMLO, P.C. FAMILLETTI, U. GUBLER, D.H. PRESKY, A.S. STERN u. M.K. GATELY (1995):
Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer, a potent IL-12 antagonist.
Eur. J. Immunol. 25, 200-2006
- GOVONI, G., F. CANONNE-HERGAUX, C.G. PFEIFER, S.L. MARCUS, S.D. MILLS, D.J. HACKAM, S. GRINSTEIN, D. MALO, B.B. FINLAY u. P. GROS (1999):
Functional Expression of Nramp1 in vitro in the Murine Macrophage Line RAW 264.7.
Infect. Immun. 67, 2225-2232
- GUÈRY, J.C., F. RIA u. L. ADORINI (1996):
Dendritic Cells but Not B Cells Present Antigenic Complexes to Class II-restricted T Cells after Administration of Protein in Adjuvant.
J. Exp. Med. 183, 751-757
- GULIG, P.A., T.J. DOYLE, M.J. CLARE-SALZLER, R.L. MAIESE u. H. MATSUI (1997):
Systemic Infection of Mice by Wild-Type but Not Spv⁻ *Salmonella typhimurium* Is Enhanced by Neutralization of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha.
Infect. Immun. 65, 5191-5197
- HACKAM, D.J., O.D. ROTSTEIN, W. ZHANG, S. GRUENHEID, P. GROS u. S. GRINSTEIN (1998):
Host Resistance to Intracellular Infection, Mutation of Natural Resistance-associated Protein 1 (*Nramp1*) Impairs Phagosomal Acidification.
J. Exp. Med. 188, 351-364
- HATHCOCK, K.S., H. HIRANO, S. MURAKAMI u. R.J. HODES (1992):
CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells.
J. Immunol. 149, 2286-2294
- HOHMANN, A.W., G. SCHMIDT u. D. ROWLEY (1978):
Intestinal Colonization and Virulence of Salmonella in Mice.
Infect. Immun. 22, 763-770
- HOPKINS, S.A. u. J.P. KRAEHENBUHL (1997):
Dendritic cells of the Murine Peyer's patches Colocalize with *Salmonella typhimurium* Avirulent Mutants in the Subepithelial Dome. In, Fundamental and Clinical Immunology (P. RICCIARDI-CASTAGNOLI), Plenum Press, New York, 105-109
- HOPKINS, S.A., F. NIEDERGANG, I.E. CORTHESEY-THEULAZ u. J.P. KRAEHENBUHL (2000):
A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells.
Cell. Microbiol. 2, 59-68
- IWASAKI, A. u. B.L. KELSALL (2000):
Localization of Distinct Peyer's Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory (MIP)-3 α , MIP-3 β , and Secondary Lymphoid Organ Chemokine.
J. Exp. Med. 191, 1381-1393
- IWASAKI, A. u. B.L. KELSALL (2001):
Unique Function of CD11c⁺, CD8 α ⁺ and Double-Negative Peyer's Patch Dendritic Cells.
J. of Immunol. 166, 4884-4890

- JANEWAY, C.A. u. P. TRAVERS (1997):
Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. [Immunologie.]
2. Auflage,
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- JONES, B.D, N. GHORI u. S. FALKOW (1994):
Salmonella typhimurium Initiates Murine Infection by Penetrating and Destroying
the Specialized Epithelial M-Cells of the Peyer's patches.
J. Exp. Med. 180, 15-23
- KEHRES, D.G., M.L. ZAHARIK, B.B. FINLAY u. M.E. MAGUIRE (2000):
The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective
manganese transporters involved in the response to reactive oxygen.
Mol. Mikrobiol. 36, 1085-1100
- KELSALL, B.L. u. W. STROBER (1996):
Distinct Populations of Dendritic Cells Are Present in the Subepithelial Dome and T
Cell Regions of the Murine Peyer's Patch.
J. Exp. Med. 183, 237-247
- KIHLSTROM, E. u. L. ANDAKER (1985):
Inability of gentamicin and fosomycin to eliminate intracellular Enterobacteriaceae.
J. Antimicrob. Chemother. 6, 723-728
- KIRBY, A.C., U. YRLID, M. SVENSSON u. M.J. WICK (2001):
Differential Involvement of Dendritic Cell Subsets During Acute *Salmonella*
Infection.
J. Immunol. 166, 6802-6811
- KOHBATA, S., H. YOKOYAMA u. E. YABBUUCHI (1986):
Cythopathogenic effect of *Salmonella typhi* GIFU 10007 on M cells of murine
Peyer's patches in ligated ileal loops, an ultrastructural study.
Microbiol. Immunol. 30, 1225-1237
- KROKER, R. (1994):
Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In, Grundlagen
der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 4. Auflage (LÖSCHER, W.,
F.R. UNGEMACH u. R. KROKER).
Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg, 206-242
- LALMANACH, A.C. u. F. LANTIER (1999):
Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection.
Microb. Infect. 1, 719-726
- LIU, L.M. u. G.G. MacPHERSON (1991):
Lymph-borne (veiled) dendritic cells can acquire and present intestinally
administered antigens.
Immunol. 73, 281-286
- LEHMANN, J., S. BELLMANN, C. WERNER, R. SCHRÖDER, N. SCHÜTZE u. G.
ALBER (2001):
IL-12p40-Dependent Agonistic Effects on the Development of Protective Innate and
Adaptive Immunity Against *Salmonella* Enteritidis.
J. Immunol. 167, 5304-5315
- LOWRIE, D.B., V.R. ABER u. M.E. CARROL (1979):
Division and death rates of *Salmonella typhimurium* inside macrophages, use of
penicillin as a probe.
J. Gen. Microbiol. 110, 409-419

- LUNDBURG, U., U. VINATZER, D. BERDNIK, A. von GABIN u. M. BACCARINI (1999):
Growth Phase-Regulated Induction of *Salmonella*-Induced Macrophage Apoptosis Correlates with Transient Expression of SPI-1 Genes.
J. Bacteriol. 181, 3433-3437
- MANZ, M.G., D. TRAVER, T. MIYAMOTO, I.L. WEISSMAN u. K. AKASHI (2001):
Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors.
Blood 97, 3333-3341
- MARRIOTT, I., T.G. HAMMOND, E.K. THOMAS u. K.L. BOOST (1999):
Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c⁺ dendritic cells initiating cytokine expression.
Eur. J. Immunol. 29, 1107-1115
- MASTROENI, P., J. A. HARRISON, J.A. CHABALOGOITY u. E. HORMAECHE (1996):
Effect of Interleukin 12 Neutralization on Host Resistance and Gamma Interferon Produktion in Mouse Typhoid.
Infect. Immun. 64, 189-196
- MASTROENI, P., J.A. HARRISON, J.H. ROBINSON, S. CLARE, S. KHAN, D.J. MASKELL, G. DOUGAN u. E. HORMAECHE (1998):
Interleukin-12 Is Required for Control of the Growth of Attenuated Aromatic-Compound-Dependent *Salmonellae* in BALB/c Mice, Role of Gamma Interferon and Macrophage Activation.
Infect. Immun. 66, 4767-4776
- MASTROENI, P., J.A. CHABALGOITY, S.J. DUNSTAN, D.J. MASKELL u. G. DOUGAN (2000):
Salmonella, Immune Response and Vaccines.
Vet. J. 161, 132-164
- MATSUURA, M. u. C. GALANOS (1990):
Induction of Hypersensitivity to Endotoxin and Tumor Necrosis Factor by Sublethal Infection with *Salmonella typhimurium*.
Infect. Immun. 58, 935-937
- McLELLAN, A.D. u. E. KÄMPGEN (2000):
Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells.
Immunol. Let. 72, 101-105
- MERCER, D.W., G.S. SMITH, J.M. CROSS, D.H. RUSSELL, L. CHANG u. J. CACIOPPO (1996):
Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury, potential role of nitric oxide and lipid peroxidation.
J. Surg. Res. 63, 185-192
- METLAY, J.P., M.D. WITMER-PACK, R. AGGER, M.T. CROWLEY, D. LAWLESS u. R.M. STEINMANN (1990):
The Distinct Leukozyte Intergrins of Mouse Spleen Dendritic Cells as Identified with New Hamster Monoclonal Antibodies.
J. Exp. Med. 171, 1753-1771
- MEYER, H. (1999):
Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - Salmonellosen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 106, 344-351
- NAIKI, Y., H. NISHIMURA, T. KAWANO, Y. TANAKA, S. ITOHARA, M. TANIGUCHI u. Y. YOSHIKAI (1999):
Regulatory Role of Peritoneal NK1.1⁺αβ T Cells in IL-12 Production During *Salmonella* Infection.
J. Immunol. 163, 2057-2063

- NEUTRA, M.R., A. FREY u. J.P. KRAEHENBUHL (1996):
Epithelial M Cells, Gateway for Mucosal Infection and Immunization.
Cell **86**, 345-348
- NORTH, R.J., R. LaCOURSE, L. RYAN u. P.GROS (1999):
Consequence of *Nramp1* Deletion to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice.
Infect. Immun. **67**, 5811-5814
- OCHMAN, H. u. E.A. GROISMAN (1996):
Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp.
Infect. Immun. **64**, 5410-5412
- PENHEITER, K.L., N. MATHUR, D. GILES, T. FAHLEN u. B.D. JONES (1997):
Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches.
Mol. Microb. **24**, 697-709
- PETTIT, A.R., H. JI, D. von STECHOW, R. MÜLLER, S.R. GOLDRING, Y. CHOI, C. BENOIST u. E.M. GRAVALLESE (2001):
TRANSC/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis.
Am. J. Pathol. **159**, 1689-1699
- PIE, S., P. MATSIOTO-BERNARD, P. TRUFFA-BACHI u. C. NAUCIEL (1996):
Gamma Interferon and Interleukin-10 Gene Expression in Innately Susceptible and Resistant Mice during the Early Phase of *Salmonella typhimurium* Infection.
Infect. Immun. **64**, 849-854
- QUINONES, M., S.K. AHUJA, P.C. MELBY, L. PATE, R.L. REDDICK u. S.S. AHUJA (2000):
Preformed Membrane-associated Stores of Interleukin (IL)-12 Are a Previously Unrecognized Source of Bioactive IL-12 That Is Mobilized within Minutes of Kontakt with an Intracellular Parasite.
J. Exp. Med. **192**, 507-515
- RAMARATHINAM, L., R.A. SHABAN, D.W. NIESEL, G.R. KLIMPEL (1991):
Interferon gamma (IFN-gamma) production by gut-associated lymphoid tissue and spleen following oral *Salmonella typhimurium* challenge.
Microb. Pathog. **11**, 347-356
- RICHTER-DAHLFORS, A., A.M.J. BUCHAN u. B.B. FINLAY (1997):
Murine Salmonellosis Studied by Confocal Mikroskopy, *Salmonella typhimurium* Resides Intracellularly Inside Macrophages and Exerts a Cytotoxic Effect on Phagozytes In Vivo.
J. Exp. Med. **186**, 569-580
- ROBERT KOCH INSTITUT (Juli 2001):
Merkblatt für Ärzte "Salmonellose", Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, www.rki.de/GESUND/SALM.HTM
- ROLLE u. MAYR (2002):
Salmonella. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage (BÜTTNER, M., B. GEDECK, O.R. KAADEN, M. KRÜGER u. H.J. SELBITZ)
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 462.
- ROMANI, N., K. INABA, E. PURE, M. CROWLEY, M. WITMER-PACK u. R.M. STEINMANN (1989):
A small number of anti-CD3 molecules on dendritic cells stimulate DNA synthesis in mouse T lymphocytes.
J. Exp. Med. **169**, 1153-1168

- ROMANI, N., D. REIDER, M. HEUER, S. EBNER, E. KÄMPGEN, B. EIBL, D. NIEDERWIESER u. G. SCHULER (1996):
Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability.
J. Immunol. Methods 196, 137-151
- RUEDL, C., C. RIESER, G. BÖCK, G. WICK u. H. WOLF (1996):
Phenotypic and functional characterization of CD11c⁺ dendritic cell population in mouse Peyer's patches.
Eur. J. Immunol. 26, 1801-1806
- SALCEDO, S.P., M. NOURSADEGHI, J. COHEN u. D.W. HOLDEN (2001):
Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo.
Cell. Microbiol. 3, 1-12
- SATO, S., N. ONO, D.A. STEEBER, D.S. PISETSKY u. T.F. Tedder (1996):
CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity.
J. Immunol. 157, 4371-4378
- SELBITZ, H.J., H.J. SINELL u. A. SZIEGOLEIT (1995):
Das Salmonellen-Problem, Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen.
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- SHEVAN, E.M. (1990):
Intercellular Interactions in the Immune Response. In,
Immunophysiology (OPPENHEIM, J. u. E.M. SHEVAN) Oxford University Press, New York, Oxford
- SHORTMAN, K., D. VREMEC, J. POOLEY, J. WHAITMAN, K. LUCAS, A. KAMTH, M. O'KEEFFE, H. HOCHREIN u. L. WU (2000):
Dendritic Cells - Where the Innate and Adaptive Immune Systems Meet.
The Immunologist 8, 20-22
- SHORTMAN, K. u. C. CAUX (1997):
Dendritic cell development, multiple pathways to nature's adjuvants.
Stem Cells 15, 409-419
- SPRINGER, S., J. LEHMANN, T. LINDNER, J. THIELEBEIN, G. ALBER u. H.J. SELBITZ (2000):
A new live *Salmonella enteritidis* vaccine for chickens, experimental evidence of its safety and efficacy. [Ein neuer *Salmonella* Enteritidis-Lebendimpfstoff für Hühner, experimenteller Nachweis der Sicherheit und der Wirksamkeit.]
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 113, 246-252
- STENZEL, W. (1975):
Pathogenicity factors of gramnegative enteropathogenic bacteria and pathogenesis of intestinal diseases. [Pathogenitätsfaktoren gramnegativer Darmseuchenerreger und Pathogenese intestinaler Infektionskrankheiten.]
Arzneimittelforschung 25, 1600-1602.
- TABUCHI, M., T. YOSHIMORI, K. YAMAGUCHI, T. YOSHIDA u. F. KISHI (2000):
Human NRAMP2/DMT1, Which Mediates Iron Transport across Endosomal Membranes, Is Localized to Late Endosomes and Lysosomes in Hep-2 Cells.
J. Biolog. Chem. 275, 22220-22228
- TANG, P., V. FOUBISTER, M.G. PUCCIARELLI u. B.B. FINLAY (1993):
Methods to study bacterial invasion.
J. Micro. Meth. 18, 227-240

- TRINCHIERI, G. (1998 a):
Immunobiology of interleukin-12.
Immunol. Res. 17, 269-278
- TRINCHIERI, G. (1998 b):
Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12.
Int. Rev. Immunol. 16, 365-396
- VAZQUEZ-TORRES, A., J. JONES-CARSON, P. MASTROENI, H. ISCHIROPOULOS u. F.C. FANG (2000):
Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro.
J. Exp. Med. 192, 227-236
- VOLKMANN, A., T. ZAL u. B. STOCKINGER (1997):
Antigen-Presenting Cells in the Thymus That Can Negatively Select MHC Class II-Restricted T Cells Recognizing a Circulating Self Antigen.
J. Immunol. 158, 693-706
- WANG, J.F., Y.Q. GAO, H. LIPPTON, A. HYMAN u. J.J. SPITZER (1994):
The roles of nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-induced intestinal damage.
Shock 2, 185-191
- WEINSTEIN, D.L., B.L. O'NEIL, D.M. HONE u. E.S. METCALF (1998):
Differential early interactions between *Salmonella enterica* serovar Typhi and two other pathogenic *Salmonella* serovars with intestinal epithelial cells.
Infect. Immun. 66, 2310-2318
- WEYRAUCH, K.D. u. A. SMOLLICH (1998):
Histologiekurs für Veterinärmediziner.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.
- WIJBURG, O.L.C., C.P. SIMMONS, N. van ROOIJEN u. A. RICHARD (2000):
Duale role for macrophages *in vivo* in the pathogenesis and control of murine *Salmonella enterica* var. Typhimurium infections.
Eur. J. Immunol. 30, 944-953
- WILTROUT, R.H. u. L. VARESIO (1990):
Activation of Macrophages for Cytotoxic and Suppressor-Effector Functions. In, Immunophysiology (OPPENHEIM, J. u. E.M. SHEVAN) Oxford University press, New York, Oxford.
- WU, L., A. D'AMICO, H. HOCHREIN, M. O'KEEFE, K. SHORTMAN u. K. LUCAS (2001):
Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors.
Blood 98, 3376-3382
- YRLID, U., M. SVENSSON, C. JOHANSSON u. M.J. WICK (2000):
Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells, influence on antigen presentation and initiating an immune response.
Immunol. Medical. Microbiol. 27, 313-320

9 Anhang

Chemikalien-Liste

ABTS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
AEC-Substrat-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Azeton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Fluka, Buchs, Schweiz
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gelatine vom Schwein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glukose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hefextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hepes-NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
ISCOVE's	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kaisers Glyzeringelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Fluka, Buchs, Schweiz
Kollagenase-D	Boehringer Mannheim, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Buchs, Schweiz
NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
Pepton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI	Biochrom, Berlin, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegennormalserum	Milchziegenbetriebe in Sachsen, Deutschland
Zitronensäure	Fluka, Buchs, Schweiz

Verbrauchsmaterialien

15 ml-Röhrchen, steril	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
50 ml-Röhrchen, steril	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
6-well Gewebekulturplatten, steril	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-well Gewebekulturplatten, steril	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einmalspritzen 1 ml, 20 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ELISA-Platten, Polysorp	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Eppendorfröhrchen, 1,5 ml und 2,0 ml, steril	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen 4 ml	Falcon, Becton-Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ, USA
Kapillarröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
Kammerobjektträger, 8-well, steril	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Kanülen, 27 G	Terumo, Frankfurt a. M., Deutschland
Kryoröhrchen, 2,0 ml, steril	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 0,5-10 µl (weiß)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
100-1000 µl (blau)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
10-200 µl (gelb)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter für Spritzen	Millipore Coporation, Bedford, USA
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellsiebe, Porengröße 40 µm und 70 µm	Falcon, Becton-Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ, USA

Danksagung:

Prof. Alber danke ich für die Ausschreibung der Thematik und für die Betreuung während der „Doktorandentätigkeit“.

Ich danke ganz herzlich **Frau Roswitha Haak**, ihrer Nachfolgerin **Frau Juliane Richter** und **Frau Petra Krumpholz** für die Organisation und Bewältigung des Laboralltages.

Dr. Lehmann möchte ich ganz besonders danken für die Bereitstellung des Kaninchen-anti-Salmonellenserums. Weiterhin bedanke ich mich bei ihm für die Hilfestellung zur Durchführung und Auswertung der Infektionsexperimente und für die Einführung in die Geheimnisse der FACS-Analytik.

Herzlichen Dank an **Frank**, der die Mäuse mit betreut hat und der mir bei allen möglichen und unmöglichen Gelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei **Dr. Müller** und **Dr. Straubinger** möchte ich mich ganz herzlich für die Problemlösung am Computer, für alle Tipps und Tricks und für das wiederholte Korrekturlesen der unterschiedlichen Manuskriptentwürfe bedanken.

Vielen Dank auch an **Knut, Sarah, Melanie, Conny** und **Martin** für das Spülen, Pipettenstopfen, Sterilisieren, Autoklavieren und für alle anderen „Kleinigkeiten“, die von ihnen erledigt wurden.

Bei **Prof. Fehlhaber** möchte ich mich für die Organisation und den reibungslosen Ablauf des Graduiertenkollegs „Schlachtierbelastung und Produktsicherheit“ bedanken. Diese Arbeit hätte ohne seinen Einsatz nicht erstellt werden können.

Ich danke dem Institut für Bakteriologie und Mykologie für hilfreiche Tipps und Tricks im Umgang mit Salmonellen (**Frau Prof. Krüger, Dr. Tassilo Seidler**) und ganz besonders **Dr. Schroedl** für das „Mangelmedium“ zur Kultivierung der Salmonellen.

Dem Institut für Vetrinär-Pathologie verdanke ich unter anderem die Anfertigung der Paraffinschnitte aber auch die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate. Vielen Dank dafür an **Frau Dr. Aupperle**.

Bei **Frau Langhoff** möchte ich mich herzlich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Präparate bedanken. **Den Damen aus dem Routinelabor** danke ich für die Anfertigung der Paraffinschnitte. Für die Unterstützung während der Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate bedanke ich mich bei **Katja Steiger**.

Im Labor von **Dr. Christiane Ruedl** (Basel Institut für Immunologie) erhielt ich zweimal die Möglichkeit für mehrer Tage spezielle Techniken zu erlernen. Ich bedanke mich ganz herzlich für die Gastfreundschaft und das freundliche Entgegenkommen im Labor.

Im Labor der Bacterial Infection Group der Veterinary School der Universität Cambridge durfte ich die Möglichkeiten der konfokalen Mikroskopie nutzen. Ich bedanke mich bei **Dr. Mastroeni** für diese Möglichkeit und danke ganz besonders **Mark Sheppard** für die geleistete Hilfe.

Der größte Dank gebührt allen **Tierärzten, Tierpflegern, Tierarzhelferinnen, Bremsern, dem technischen Personal (besonders Frau Beck), allen anderen Mitarbeitern und allen Tieren und Patienten** meiner „zweiten Heimat“, der **Repro (Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik)**, die in der ganzen Zeit für mich da waren und mir immer den nötigen Rückhalt gaben. Ganz besonders danke ich dem „**Oberarzt**“ **Dr. Erices**, der stets ein offenes Ohr für mich hatte und dafür Sorge trug, dass mir die tierärztliche praktische Tätigkeit nicht vollständig abhanden kam.

Meinen Eltern vielen herzlichen Dank für das Vertrauen und die Unterstützung, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben, obwohl es doch nur „brotlose Kunst“ ist. Ich durfte mir meinen Traum verwirklichen. Danke für alles.