

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines *in vitro*-Kokultur-Modells
zur Untersuchung der Interaktion
von intestinalen Epithelzellen und Makrophagen bei Salmonellosen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ahmed Keleş

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.03.2020

Meiner Tochter

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	1
2. Einleitung	4
2.1 Die Barrierefunktion des Darmepithels.....	4
2.2 Regulierung der Barriereeigenschaften von intestinalen Epithelien	5
2.3 Einsatz von Zellkulturmodellen in der angewandten Forschung.....	7
2.4 Zielsetzung der Arbeit	8
3. Geräte und Materialien	10
3.1 Geräte und Materialien – Institut für Klinische Physiologie (IfKP).....	10
3.1.1 Geräte.....	10
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	11
3.1.3 Laborchemikalien und Agenzien	12
3.1.4 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen.....	14
3.1.5 Lösungen und Puffer.....	14
3.1.6 Antikörper.....	15
3.2 Geräte und Materialien – Institut für Immunologie (IFI)	15
3.2.1 Geräte.....	16
3.2.2 Verbrauchsmaterialien	16
3.2.3 Laborchemikalien und Agenzien	17
3.2.4 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen.....	17
3.2.5 Puffer	18
3.2.6 Antikörper.....	18
3.5 Bakterienstämme	19
3.5.1 <i>Salmonella</i> Typhimurium Wild-Typ Stamm	19
3.5.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium Pathogenitätsinsel-Knockout-Stämme.....	19
3.6 Pralnacasan	19
3.7 Software	20
4. Methoden	21
4.1 Zellbiologie	21
4.1.1 IPEC-J2 Zelllinie – Solitärkultur.....	21
4.1.2 Caco-2bbe – Solitärkultur.....	21
4.1.3 PBM-abstammende Makrophagen – Solitärkultur.....	22
4.1.4 Kokulturen.....	24
4.1.4.1 Indirektes Kontaktmodell.....	24
4.1.4.2 Direktes Kontaktmodell.....	24
4.2 Barrierephysiologie.....	25

4.2.1	Messung des transepithelialen Widerstands	25
4.2.2	Bestimmung des Fluorescein-Fluxes	26
4.3	Proteinbiochemie.....	27
4.3.1	Gesamtproteinextraktion	27
4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
4.3.4	Western Blot.....	29
4.4	Infektiologie	30
4.4.1	Vorbereitung der IPEC-J2 Solitär- und Kokulturen.....	30
4.4.2	Vorbereitungen der Caco-2bbe-Solitärkulturen.....	30
4.4.3	Vorbehandlung der IPEC-J2 Solitärkulturen mit Quercetin	31
4.4.4	Vorbehandlung der Solitärkulturen mit Pralnacasan	31
4.4.5	<i>Salmonella</i> Typhimurium – Wildtyp	31
4.4.6	<i>Salmonella</i> Typhimurium – hitzeinaktivierter Wildtyp	32
4.4.7	<i>Salmonella</i> Typhimurium – Wildtyp-Überstand	32
4.4.8	<i>Salmonella</i> Typhimurium – Pathogenitäts-Knockout-Stämme	32
4.4.9	Ermittlung der Wachstumskinetik	32
4.4.10	Infektion mit <i>Salmonella</i> Typhimurium-Varianten	33
4.5	Immunassay	33
4.6	Immunhistochemie	34
4.6.1	Fixierung	34
4.6.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	34
4.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	34
4.8	Statistische Analyse	35
4.9	Richtlinien.....	36
5.	Ergebnisse	37
5.1	Etablierung der IPEC-J2-Kokultur	37
5.1.1	Makrophagen	37
5.1.2	Kokulturmodell	42
5.1.3	Kultivierungsnährmediumwahl für die IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur	42
5.2	<i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion von Solitär- und Kokultur	45
5.2.1	Vermittlung des Barriere-defekts durch <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	49
5.3	Hemmung des durch <i>Salmonella</i> Typhimurium vermittelten Barriere-defekts	50
5.3.1	Hemmung durch Pralnacasan.....	50
5.3.2	Hemmung durch Quercetin	53

6. Diskussion	55
6.1 Oberflächenmarker differenzierter Pig-Bone-Marrow-Zellen	55
6.2 Die IPEC-J2 Zelllinie: ein geeignetes <i>in vitro</i> -Modell	57
6.3 DMEM _{PIGS} : ein geeignetes Nährmedium für die Kokultivierung.....	58
6.4 Die IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur als funktionelles System für den interzellulären Crosstalk zwischen Darmepithel und Makrophagen.....	59
6.5 IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur: Zytokinausschüttung und Barriereigenschaften unter Normbedingungen.....	59
6.6 IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur: Zytokinausschüttung und Barriereigenschaften unter <i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion	60
6.7 Vermittlung des Barrieredefekts durch <i>Salmonella</i> Typhimurium in IPEC-J2-Zellen	62
6.8 Hemmung des durch <i>Salmonella</i> Typhimurium vermittelten Barrierverlusts durch Pralnacasan	63
6.9 Hemmung des durch <i>Salmonella</i> Typhimurium vermittelten Barrierverlusts durch Quercetin.....	64
6.10 Schlussfolgerung.....	65
7. Ausblick.....	67
8. Literatur	68
9. Anhang	76
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	76
9.2 Eidesstattliche Versicherung	78
9.3 Publikationsliste.....	79
9.4 Lebenslauf.....	80
9.5 Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kokultur-Kontaktmodelle	25
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Makrophagen-Solitärkulturen mit verschiedenen Nährmedien.....	37
Abbildung 3: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD172 (PE) und CD14 (FITC)	39
Abbildung 4: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD163 (PE) und SLA II (FITC).....	40
Abbildung 5: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD16 (PE) und CD11a (FITC)	41
Abbildung 6: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen der IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur mit verschiedenen Oberflächenmarkern	44
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Infektionsmodells für die IPEC-J2-Solitär und IPEC-J2 _{indirekt} -Kokultur	45
Abbildung 8: Darstellung der Barriereeigenschaften nach <i>Salmonella</i> Typhimurium-Wildtyp-Infektion	46
Abbildung 9: Darstellung der postinfektiösen porzinen Zytokinexpression in Solitär- und Kokulturen	47
Abbildung 10: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-4 in Solitär- und Kokultur	48
Abbildung 11: Darstellung der Barriereeigenschaften nach Infektion mit <i>Salmonella</i> Typhimurium-Varianten	49
Abbildung 12: Darstellung eines Pralnacasan-Effekts für den TER nach <i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion in IPEC-J2-Zellen	51
Abbildung 13: Darstellung eines Pralnacasan-Effekts für den TER nach <i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion in Caco-2bbe-Zellen	52
Abbildung 14: Darstellung des Pralnacasan-Effekts (100 µM) auf den Fluorescein-Flux nach <i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion in Caco-2bbe-Zellen.....	52
Abbildung 15: Darstellung der Barriereeigenschaften nach Vorbehandlung mit Quercetin und Infektion mit <i>Salmonella</i> Typhimurium	53
Abbildung 16: Quantitative Darstellung von Claudin-4-Western Blot-Signalen in Solitär-Kultur nach <i>Salmonella</i> Typhimurium-Infektion.	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kultivierungsbedingungen von PBM-Makrophagen in der Etablierungsphase	24
Tabelle 2: Kokultur-Kultivierungsbedingungen.....	25
Tabelle 3: Expressionsraten von Oberflächenmarkern der differenzierten PBM-Zellen in verschiedenen Nährmedien.....	38
Tabelle 4: Darstellung der Expressionsraten verschiedener Oberflächenmarker	42

1. Abstrakt

Einleitung Salmonellosen stellen die häufigsten meldepflichtigen Infektionskrankheiten in Deutschland dar. Überträger sind hauptsächlich Nutztiere bzw. die aus ihnen hergestellten Lebensmittel, die im Menschen zu akuten Diarrhoen führen. Zur Eindämmung dieser Infektionskrankheit sind neue Prophylaktika zur Behandlung der Tiere wünschenswert. Zwar gelten *in vivo*-Experimente als der Goldstandard zur Erforschung von Medikamenten, sie sind jedoch kostenintensiv und im Sinne des Tierschutzes auf ein Mindestmaß zu reduzieren. *In vitro*-Systeme stellen deshalb für die Testung von Wirkstoffen eine gute Alternative dar. Intestinale Solitärkulturen bilden hier lediglich die Interaktion der Pathogene mit den Darmepithelzellen ab. Salmonellen besitzen die Möglichkeit, die Barriere direkt durch die Dysregulation des interzellulären TJ-Netzwerks zu kompromittieren, können diese jedoch auch indirekt durch Zytokinausschüttung stören. Produzenten proinflammatorischer Zytokine sind überwiegend die subepithelialen Immunzellen, u.a. Makrophagen. Um diese komplexen Interaktionen zwischen Epithel- und Immunzellen abzubilden, ergibt sich die Notwendigkeit zur Etablierung eines Kokultursystems.

Methoden PBM-Zellen wurden differenziert, unter Verwendung verschiedener Nährmedien kultiviert oder kokultiviert und mittels FACS-Analyse auf makrophagentypische Oberflächenmarker untersucht. Daraufhin wurden solitär- und kokultivierte IPEC-J2-Zellen hinsichtlich ihres TERs, Fluorescein-Fluxes und ihrer TJ-Proteinlokalisation und -expression mit und ohne *S. Typhimurium* bzw. deren verschiedener Bestandteile oder Mutanten untersucht. Darüber hinaus wurde Pralnacasan an IPEC-J2 und Caco-2bbe-Zellen, Quercetin an IPEC-J2-Zellen unter Betrachtung des TERs und des Fluorescein-Fluxes als potentielle Wirkstoffe gegen die *S. Typhimurium* verursachten Barrierestörungen getestet.

Ergebnisse Optimale Kultivierungsbedingungen konnten erreicht werden, indem die PBM-Zellen in IMDM_{FCS} zu Makrophagen differenziert und anschließend in DMEM_{PIGS} mit IPEC-J2-Zellen kokultiviert wurden. Nicht infizierte Solitär- und Kokulturen wiesen stabile TER-Werte und ein regelhaftes Claudin-4-Netz auf. In Solitärkulturen führte nur die Infektion mittels invasiver *S. Typhimurium*-Varianten zu einem TER-Abfall. Dabei wiesen infizierte Solitärkulturen neben eines reduzierten TERs eine Umverteilung von Claudin-4 und zum Teil erhöhte Fluorescein-Fluxe auf. Infizierte Kokulturen zeigten dagegen einen stärkeren Abfall des TERs, höhere Fluorescein-Fluxe und eine ausgeprägtere Umverteilung von Claudin-4. Zu einer partiellen Wiederherstellung des TERs und Fluorescein-Fluxes infizierter Solitärkulturen führten Pralnacasan in Caco-2bbe-Zellen und Quercetin in IPEC-J2-Zellen.

Zusammenfassung Die etablierte Kokultur ist geeignet, die Interaktion zwischen Makrophagen und Darmepithelzellen bei *S. Typhimurium*-Infektion abzubilden. Zudem weisen Pralancasan in Caco-2bbe- und Quercetin in IPEC-J2-Zellen ein protektives Potential gegen *S. Typhimurium*-Infektionen auf.

Introduction Salmonellosis represents the most common notifiable infectious disease in Germany. Carriers are mainly farm animals or the food produced from them which lead to acute diarrhea in humans. To reduce this infection new prophylactic agents are desirable for the treatment of animals. While *in vivo* experiments are considered to be the gold standard for drug discovery they are costly and need to be minimized for animal welfare purposes. *In vitro* systems therefore represent a good alternative for the testing of chemical agents. Intestinal solitary cultures here only represent the interaction of the pathogens with the intestinal epithelial cells. *Salmonella* has the potential to compromise the barrier directly through dysregulation of the intercellular TJ network but may also interfere with it indirectly through cytokine secretion. Producers of proinflammatory cytokines are predominantly the subepithelial immune cells, e.g. macrophages. In order to map these complex interactions between epithelial and immune cells, there is a need to establish a co-culture system.

Methods PBM cells were differentiated, cultured or co-cultured using different nutrient media and examined afterwards for macrophage-specific surface markers using FACS analysis. Subsequently, fluorescein fluxes, TJ protein localization and expression were studied in solitary and co-cultured IPEC-J2 cells with and without infection of *S. Typhimurium*, its components or mutants.

In addition, the chemical agents pralnacasan, examined in IPEC-J2 and Caco-2bbe cells, and quercetin, examined in IPEC-J2 cells, were tested for their protective potential against *S. Typhimurium*-induced barrier disruption.

Results optimal culture conditions could be achieved when PBM-cells were differentiated to macrophages in IMDM_{FCS} and afterwards co-cultured with IPEC-J2 cells in DMEM_{PIGS}. Not infected solitary- and co-culture showed stable TER values and a defined claudin-4 network. In solitary culture infection only with invasive *S. Typhimurium* types showed a decrease in TER. In addition to the TER decrease the infected IPEC-J2 solitary cultures showed a redistribution of claudin-4 and in some cases an increased fluorescein flux. The infected IPEC-J2 cocultures showed an increased reduction in TER, higher fluorescein flux and an even more pronounced redistribution of claudin-4 than their solitary cultures counterparts.

In infected solitary cultures a partial TER rescue and reduced fluorescein flux could be achieved using pralnacasan in Caco-2bbe cells and quercetin in IPEC-J2 cells.

Conclusions The established coculture is adequate to investigate the interaction between macrophages and intestinal epithelial cells after *S. Typhimurium* infection. Pralnacasan and quercetin showed a protective potential against *S. Typhimurium* infection in Caco-2bbe and IPEC-J2 cells, respectively.

2. Einleitung

2.1 Die Barrierefunktion des Darmepithels

Für die Aufrechterhaltung der Darmbarrierefunktion ist eine mit Schleim bedeckte Epithelschicht mit ihrem parazellulären Netzwerk aus Transmembranproteinen verantwortlich. Diese Zell-Zell-Verbindungen bestehen hauptsächlich aus drei Komponenten: den Adhärenz Junctions und den Desmosomen, die beide vor allem für den mechanischen Zusammenhalt benachbarter Zellen entscheidend sind, und den Tight Junctions (TJ), die hauptsächlich für die Regulierung des parazellulären Ionentransports zuständig sind. Diese Barriere ist im Zusammenschluss maßgeblich daran beteiligt, das lumenale Kompartiment des Darms vom Inneren des Körpers zu trennen und verhindert so, dass es zu einer nichtselektiven Passage von Flüssigkeiten und löslichen Stoffen kommt. Darüber hinaus dient sie als Hindernis für das Eindringen von potentiell gefährlichen Pathogenen in den Körper. Die apikal liegenden TJ-Proteine können strukturell in drei Gruppen unterteilt werden: zum einen in die Tetraspan-Transmembranproteine, bestehend aus Claudinen und den Tight Junction-associated MARVEL proteins (TAMPs) (Raleigh et al., 2010), die Tripelspan-Transmembranproteine und die Monospan-Transmembranproteine (Günzel and Yu, 2013). Für die Proteinfamilie der Claudine sind zurzeit bei Säugetieren 27 verschiedene Claudine beschrieben (Mineta et al., 2011). Die im Jahr 2005 neu klassifizierten TAMPs (Raleigh et al., 2010) beinhalten das 1990 entdeckte Occludin (Furuse et al., 1993), das Marvel D3 (Steed et al., 2009) und das apikal an der Schnittstelle von drei benachbarten Zellen vorzufindende Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005). Die Claudine und die TAMPs besitzen jeweils zwei extrazellulären Schleifen (extracellular loops (ECL)), ECL1 und ECL2, eine intrazelluläre Schleife sowie einen intrazellulären C- und N-Terminus. Claudine und TAMPs sind bis auf wenige Ausnahmen mittels ihres C-terminalen Endes über Adapterproteine wie z. B. ZO-1 und ZO-2 im Aktin-Gerüst der Zelle verankert (Morita et al., 1999; Guillemot et al., 2008; Günzel and Yu, 2013). Occludin scheint zwar an der Regulierung der TJ maßgeblich beteiligt, ist für die Barrierefunktion jedoch nicht obligat notwendig, da Mäuse trotz Occludin-Knockout lebensfähig sind und einen ungestörten Epithelwiderstand aufweisen (Saitou et al., 1998; Saitou et al., 2000; Antonetti et al., 2002). Ein Knockout (KO) von Claudin-1 führt indessen zu einer massiven Störung der Barrierefunktion und infolge dessen zum Tod der KO-Mäuse (Furuse et al., 2002).

Claudine nehmen funktionell eine Sonderposition ein, da ihre Transfektion und Expression selbst in Zellen, die normalerweise keine TJs ausbilden, im Kontaktbereich benachbarter Zellen zu TJ-ähnlichen Strukturen führen (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1998b). Mittels

ihrer elektrischen Ladung an der ECL1 können einige Claudine das Ausmaß des parazellulären Ionen- und Wassertransports bestimmen (Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003; Krause et al., 2008). Die Funktion der ECL2 besteht darin, eine Interaktion mit benachbarten Claudinen herzustellen (Blasig et al., 2006). Diese ist nicht nur auf Homodimere beschränkt, auch Heterodimere können ausgebildet werden, so dass funktionell eine hohe Diversität entsteht (Furuse et al., 1999; Krause et al., 2008).

Claudine werden ihrer Funktion nach in vorwiegend abdichtende Claudine, z. B. Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 (Van Itallie et al., 2001; Furuse et al., 2002; Amasheh et al., 2005; Amasheh et al., 2009; Milatz et al., 2010) und kanalbildende Claudine wie Claudin-2, -10a, -10b, -15 und -17 unterteilt (Amasheh et al., 2002; Van Itallie et al., 2006; Günzel et al., 2009; Tamura et al., 2011; Krug et al., 2012). Claudin-2 und -15 besitzen zudem bis dato als einzige Claudine die Eigenschaft eines parazellulären Wasserkanals (Rosenthal et al., 2010; Rosenthal et al., 2017a; Rosenthal et al., 2017b).

Das TJ-Netzwerk ist hochdynamisch, so besitzt Claudin-1 eine mobile Fraktion von 25% und Occludin von bis zu 89%. Die Halbwertszeit für die Neuordnung von TJ-Proteinen variiert im Bereich zwischen 70 bis 300 Sekunden (Shen et al., 2008; Raleigh et al., 2010). Diese Regulierungsprozesse finden unter anderem mittels Phosphorylierung statt (Fujibe et al., 2004; French et al., 2009), aber auch Zytokine können das TJ-Netzwerk über verschiedene Signalwege beeinflussen (Al-Sadi R. M. and Ma, 2007; Epple et al., 2009; Amasheh et al., 2010; Lapointe et al., 2010).

2.2 Regulierung der Barriereigenschaften von intestinalen Epithelien

Die parazellulären Barriereigenschaften von Epithelzellen, die die TJ-Proteine vermitteln, werden über mehrere Mechanismen reguliert. Vorrangig kommen hierbei Veränderungen der mRNA-Expressionsraten sowie posttranslationale Modifikationen der TJ-Proteine, wie z. B. Phosphorylierungsprozesse an deren C-terminalem Ende, in Betracht. Diese Phosphorylierungsprozesse werden über verschiedene Kinasen vermittelt, z. B. Myosin-leichte-Ketten-Kinase oder Rho-Kinase und gehen mit dem Ein- oder Ausbau von TJ-Proteinen aus der Zellmembran einher (Günzel and Yu, 2013).

Ein Beispiel für einen barrierestärkenden Wirkstoff ist das Flavonoid Quercetin. Dieses führt in mehreren Zelllinien zu einer Verbesserung der Barriereigenschaften, u.a. durch eine erhöhte Expression von Claudin-4 (Amasheh et al., 2008; Amasheh et al., 2012; Mercado et al., 2013; Valenzano et al., 2015). Aber auch bestimmte Bakterien, sogenannte Probiotika können einen positiven Einfluss auf die Darmbarriere ausüben. So führt das Bakterium

Escherichia coli (*E. coli*) Nissle 1917 zu einer reduzierten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen in der Darmmukosa und führt dadurch zu positiven Effekten hinsichtlich der klinischen Aktivität bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung (Kruis et al., 2004; Jacobi and Malfertheiner, 2011). Wie wir zeigen konnten, können die positiven Barriereeffekte von *E. coli* Nissle 1917 durch genetische Modifikation darüberhinaus noch gesteigert werden (Whelan et al., 2014).

Negative Effekte auf die Barriereintegrität sind indirekt durch proinflammatorische Zytokine wie z. B. durch IL-1 β , IL-6 und TNF- α beschrieben. Die Ausschüttung dieser Zytokine führt zu Veränderungen der Claudin-Expression bzw. zur Aktin-Myosin-Kontraktion und damit zur Internalisierung von Claudinen, welche über Adapterproteine mit dem Aktingerüst verbunden sind (Capaldo and Nusrat, 2009; Garcia-Hernandez et al., 2017). Die genannten Zytokine können zwar von Epithelzellen sezerniert werden, zum größten Teil werden sie jedoch von Immunzellen sezerniert, insbesondere von Makrophagen. Diese besitzen neben Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen Rezeptoren, die eine Vielzahl von Pathogenen über die sogenannten *Pathogen Recognition Receptors* (PRR) erkennen und daraufhin proinflammatorische Zytokine ausschütten (Murphy, 2012a). Diese Immunzellen stellen somit direkt nach dem Epithel die nächste Hürde für eindringende Organismen dar. Da die parazelluläre Passage ein möglicher Weg zur Infektion des Wirts darstellt, haben einige Pathogene Mechanismen entwickelt, TJ-Proteine direkt zu manipulieren. So können enteropathogene *E. coli*-Bakterien zu einer Störung der parazellulären Barriere führen, indem sie Occludin dephosphorylieren (Simonovic et al., 2000). Zudem geht diese Infektion mit einer Störung des Adapterproteins ZO-1 einher (Awad et al., 2017). Ein weiteres Beispiel ist *Clostridium perfringens*. Dieses kann mittels seines Enterotoxins, welches Claudin-3 und -4 als Rezeptoren benutzt, an die Wirtszelle andocken. Die Infektion mit *Clostridium perfringens* Typ C geht zudem mit einer Umverteilung von Claudin-1- und Occludin einher (Nava and Vidal, 2016). Auch *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) kann zu einer Störung der parazellulären Barriere führen. Zum einen kann es mehrere Claudine auf mRNA-Ebene herunterregulieren (Claudin-1, -4 und Occludin), zum anderen können auch die Adapterproteine ZO-1 und ZO-2 auf mRNA-Ebene von *S. Typhimurium* herunterreguliert werden, wodurch die Barrierefunktion beeinträchtigt werden kann (Awad et al., 2017). Ursächlich für die Barrierestörung durch *S. Typhimurium* sind hierbei die mithilfe des *Salmonella* Typ-III-Sekretionssystems der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel I (SPI I) in die Zelle sezernierten Effektorproteine SopB, SopE, SopE2 und SipA, welche GTPase-Funktionen besitzen und u.a. über Signalkaskaden zur Störung der parazellulären Barriere führen (Tafazoli et al., 2003; Boyle et al., 2006).

2.3 Einsatz von Zellkulturmodellen in der angewandten Forschung

Der Einsatz von Zellkulturmodellen in der angewandten Forschung ist aus mehreren Gründen unabdingbar. So steht am Anfang der Entwicklung eines Medikaments oftmals eine Vielzahl potentieller Wirkstoffgruppen, die es zu testen gilt. Wirkstoffe, die vielversprechend sind, müssen im Anschluss auf ihre Wirkungen und Nebenwirkungen sowie ihren Wirkmechanismus untersucht werden. Zudem schließen sich umfangreiche Tests zur Dosisfindung an. Die genannten Aspekte erfordern somit eine hohe Anzahl von möglichst vergleichbaren biologischen Organismen. Aufgrund der potentiell schädlichen Einflüsse der Testsubstanzen verbietet es sich aus ethischer Sicht, diese Versuche direkt am Tier bzw. am Menschen durchzuführen, obgleich sie für eine spätere Phase der Medikamentenentwicklung notwendig, sogar unabdingbar sind. Zellkulturen sind darüberhinaus vorteilhaft, da sie am Anfang des Forschungsvorhabens die Möglichkeit bieten, Wirkungen gezielt an einzelnen Zelltypen, in sogenannten Solitärkulturen, zu untersuchen. Potentielle Störgrößen, wie sie z. B. bei Interaktion verschiedener Zelltypen durch direkten Kontakt, Hormone oder Zytokine zustande kommen, lassen sich somit vorerst ausschalten. Da jedoch auch diese Interaktionen relevant sein können, gewinnen Systeme, in denen verschiedene Zellarten kokultiviert werden, zunehmend an Bedeutung. So können in einem nächsten Schritt gezielt weitere Zelltypen zu den Solitärkulturen hinzugefügt werden, um Wirkstoffauswirkungen in komplexeren, der Physiologie näher stehenden Systemen zu untersuchen. Kokultursysteme aus Darmzelllinien (Caco-2, HT-29/B6) und Makrophagen oder dendritischen Zellen sind mehrfach beschrieben. Unter anderem werden damit die Zytokinantwort und die Barriereintegrität unter inflammatorischen und nicht inflammatorischen Bedingungen bzw. der Einfluss von nicht pathogenen Bakterien auf Kokultursysteme untersucht (Haller et al., 2000; Leonard et al., 2010; Kampfer et al., 2017). Auch Untersuchungen hinsichtlich der Proteomregulierung nach Applikation von potentiell protektiven Nahrungsbestandteilen, wie z. B. Polyphenolen (Kaulmann et al., 2016), oder hinsichtlich der Invasionsraten von pathogenen Bakterien (Barrila et al., 2017) sind Anwendungsgebiete dieser Systeme. Die Kokulturen zeigen dabei häufig Unterschiede zu den entsprechenden Solitärkulturen auf, was die Relevanz dieser Systeme hervorhebt.

Die meisten dieser vorhandenen intestinalen Kokultursysteme haben jedoch den großen Nachteil, dass sie auf Darmzellen kanzerogenen Ursprungs oder auf künstlich immortalisierten Zelllinien beruhen (Verhoeckx et al., 2015). Dies ist problematisch, da diese Zellen Unterschiede zu ihren nichtkanzerogenen Ursprungszellen in Bezug auf

Genexpression von Transporterproteinen und metabolischen Enzymen sowie eine höhere Resistenz gegenüber zytotoxischem Stress aufweisen können (Verhoeckx et al., 2015). Eine der wenigen nichtkanzerogenen Darmzelllinien ist die IPEC-J2 Zelllinie, die ursprünglich aus dem Jejunum eines ungesäugten Ferkels gewonnen wurde (Berschneider, 1989). Bisher ist lediglich ein Kokultursystem mit immunologischem Hintergrund von IPEC-J2-Zellen mit undifferenzierten peripheren Blutmonozyten (PBMC) beschrieben, bei dem die IPEC-J2-Zellen von den PBMCs durch eine semipermeable Membran getrennt sind. Hier konnten durch eine indirekte Zugabe des Pilzmetaboliten Deoxynivalenol auf die apikale Seite der IPEC-J2-Zellen Unterschiede der PBMC-Überlebensraten und -Zytokinausschüttung sowie ein verändertes Expressionsmuster der PBMC-Oberflächenmarker, den sogenannten *Clusters of Differentiation* (CDs), beobachtet werden (Gu et al., 2016). Die IPEC-J2-Zellen wurden allerdings, wie ursprünglich charakterisiert (Schierack et al., 2006), unter Verwendung von fötalem Rinderserum (FBS) kultiviert. Für die Kultivierung mit FBS ist inzwischen jedoch gezeigt, dass sie mit unphysiologischen Barriereigenschaften und einer veränderten Zellmorphologie der IPEC-J2-Zellen einhergeht (Zakrzewski et al., 2013) und Ergebnisse so kultivierter IPEC-J2-Zellen bzw. Kokulturen zumindest infrage gestellt werden müssen.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Salmonellosen sind Gastroenteritiden, die durch nicht-typhoidale Salmonellen verursacht werden. Laut Statistik des Robert-Koch-Instituts (RKI) hat die Häufigkeit von Salmonellosen in Deutschland während der letzten 15 Jahren zwar deutlich abgenommen, sie gehören mit gut 14.000 gemeldeten Fällen im Jahr 2017 aber noch immer zu den häufigsten meldepflichtigen Infektionskrankheiten (Robert-Koch-Institut, 2018). Als Hauptreservoir der Salmonellen nennt das RKI landwirtschaftliche Nutztiere (Rind, Schwein, Geflügel) und daraus erzeugte Lebensmittel. Bei diesen Tieren verlaufen Salmonellen-Infektionen oft symptomlos, können jedoch, insbesondere bei Ferkeln, Durchfälle hervorrufen und dadurch zu einer erhöhten Sterblichkeit dieser Jungtiere führen (Schweinegesundheitsdienst, 2014; Smith et al., 2018). Daher ist die Untersuchung von Salmonellosen am Schwein von großem veterinärmedizinischem Interesse. Sowohl der Verdauungstrakt des Schweins ähnelt hinsichtlich anatomischer, physiologischer und biochemischer Eigenschaften dem des Menschen (Kararli, 1995; Guilloteau et al., 2010) als auch die Funktionsweise ihrer Makrophagen (Fairbairn et al., 2011; Kapetanovic et al., 2012). Somit kann in dieser Hinsicht das Schwein als Modellorganismus für die humanmedizinische Forschung dienen. Salmonellen besitzen

kein klassisches bakterielles Exotoxin, wie z. B. Lysine, sondern führen unter anderem über ihre Effektorproteine zur Störung der Darmbarriere (Tafazoli et al., 2003; Boyle et al., 2006). Der Einfluss sezernierter Zytokine durch Immunzellen auf die Barrierestörung ist bisher *in vitro* nicht untersucht. Die initiale Hypothese beruhte auf der Annahme, dass Makrophagen an der salmonellenvermittelten Barrierestörung maßgeblich beteiligt sind. Um diese zu untersuchen, sollte ein Kokulturmodell aus der IPEC-J2 Zelllinie und Schweinemakrophagen etabliert werden und in einem weiteren Schritt der Einfluss der durch *S. Typhimurium*-Infektion induzierten Makrophagenzytokine auf die IPEC-J2 Barriere untersucht werden. Abschließend sollten potentiell protektive Stoffe zur Wiederherstellung des Barrieredefekts auf Ihre Wirksamkeit getestet werden.

3. Geräte und Materialien

3.1 Geräte und Materialien – Institut für Klinische Physiologie (IfKP)

3.1.1 Geräte

Brutschränke begast

- B 5060 EK-02
- CB 150
- B 5060 EC-02

Heraeus, Hanau

Binder, Tüttlingen

Heraeus, Hanau

Brutschrank unbegast B6060

Heraeus, Hanau

Drainagesauger Medap P 4010

Maquet, Rastatt

Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3

Bio-Rad, München

Elektrophoretische Transferzelle Mini Trans-Blot®

Bio-Rad, München

Erlenmeyerkolben

Duran®, Wertheim/Main

Feinwaage

Sartorius, Göttingen

Flachbettelektrophoresekammer

Bio-Rad, München

Heizblock Thermostat 5320

Eppendorf, Hamburg

Impfösen

Roth, Karlsruhe

Lumineszenzbildanalysator LAS-1000

FujiFilm, Düsseldorf

Magnetrührer/Heizplatte IKA® -Combimag Reo

IKA®, München

Magnetrührfische

Merck, Darmstadt

Messelektrode STX2, manuell

World Precision Instruments, Berlin

Messelektrode STX2, manuell-automatisiert

Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF

Konfokale Laser Scanning-Mikroskope

- LSM 510 META
- LSM 780

Zeiss, Jena

Zeiss Jena

Lichtmikroskop IMT-2

Olympus, Hamburg

Mikroplattenlesegerät

- Spectra Classic
- Infinite® M200

Tecan, Crailsheim

Tecan, Crailsheim

Neubauer-Zählkammer

Brand, Wertheim

Netzgerät Power Pac 200/300

Bio-Rad, München

Ohmmeter

Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin,

Pipetten 10, 200, 1000µl	CBF
Pipettierhilfe PipetBoy	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Integra, Fernwald
- IKA®-Schüttler MTS 4	IKA, München
- WT 12/17	Biometra, Göttingen
- Inkubationsschüttler	Infors HT, Bottmingen, Schweiß
- Inkubationsschüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Stanze (für Filtermembranen)	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
Polypropylen-Röhrchen, 14 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Werkbänke	
- Steril BSB 4	Gelaide, Australien
- Laminar Air HV 2436	Heraeus, Hanau
- Holten HV 2436	Labotect, Göttingen
Ultraschallstab UP50h	Heilscher, Deutschland
UV/VIS Spektrometer Lambda 2	Perkin, Elmer, Überlingen
Vortex-Geräte	Pharmacia Biotech, Deutschland
Waage 1204 MP	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen	
- Z 200 A	Hermle, Wehingen
- Z 233 MK-2	Hermle, Wehingen
- Mini-Zentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Illinois, USA
- Beckmann Avanti™ J-25	Beckmann Coulter, Krefeld
- Sigma 3K15	Sigma, Osterode am Harz

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filterpapier (3 MM)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Iscove's Modified Dulbeccos's Medium +Glutamin/HEPES	Biowest, Frankreich
Kulturröhrchen, 12 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen, 20G, 26G	Becton Dickinson, Deutschland

Spritzen, 1 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Mikrotiterplatten transparent, Rundboden	Roth, Karlsruhe
Nunclon™ Delta Surface	Thermo Scientific, Dänemark
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Petrischalen	
- Ø 6 cm	Roth, Karlsruhe
- Ø 6 cm, beschichtet	Nunc, Karlsruhe
- Ø 9 cm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, ± gestopft 0,5 - 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Perkin Elmer, Rodgau
Reaktionsgefäße	
- 1,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
- 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
- 15, 50 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Spritzen, 1 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Stabpipetten, 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Sterilfilter, 0,2 µm	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Sterilfilter, 0,45 µm	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Wellplatten, 6, 12, 24	Nunc, Karlsruhe
Zellkulturfilter	
- Millicell®-HA, 0,45 µm, 0,6 cm ²	Merck Millipore, Darmstadt
- Millicell®-PCF, 3,0 µm, 0,6 cm ²	Merck Millipore, Darmstadt
Zellkulturflaschen, 25, 75 cm ²	Becton Dickinson, Frankreich

3.1.3 Laborchemikalien und Agenzien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Aqua bidest	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	Becton Dickinson, Frankreich
BSA (bovines Serumalbumin)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Amersham, München

Proteaseinhibitor cOmplete™, Mini, EDTA-free	Roche, Grenzach-Wyhlen
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Roche, Grenzach-Wyhlen
DMEM/F-12/HAM	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM Glutamax™ high glucose, pyruvate	Thermo Scientific, Schwerte
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nicht Essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom GmbH, Berlin
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Fluorescein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamycin 50 mg/ml	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinethan-sulfonsäure)	Fluka, Seelze
Insulin/Transferrin/Selenium (100x; ITS)	Gibco, Invitrogen, Kalifornien, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Seelze
Rinderserum (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sab® simplex	Pfizer, Deutschland
Schweineserum (adult, PIGS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PBS +/- Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, Steinheim
PFA-Lösung (Paraformaldehyd, 16%)	Science Services, München
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Cölbe
Pralnacasan	Vertex Pharmaceuticals, Bosten, USA
ProTaq Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Kopierfolien	Folex®, Köln

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziegenserum (adult; GS)	PAA, Cölbe
Quercetin	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.4 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
Pierce® BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Schwerte

3.1.5 Lösungen und Puffer

Blockierlösung (Western Blot)	5% BSA, 0,04% Natriumazid ad TBST
Blockierlösung (Immunfluoreszenz)	5% Ziegenserum 1% BSA ad PBS ^{+Ca²⁺/Mg²⁺}
EPHO-Puffer	10% West-Puffer (10x) 0,1% SDS
LB-Medium	25 g Bacto Agar ad 1 L Aqua bidest
LB-Agar	4,5 g Bacto Agar 300 ml LB-Medium
Laemmli-Probenpuffer (5x)	125 mM TRIS-Puffer, pH 6,8 500 mM DTT 50% Glycerol 10% SDS 0,001 % Bromphenolblau
RIPA-Puffer	25 mM HEPES, pH 7,6 2 mM EDTA 25 mM Natriumfluorid 1 % SDS 1 Tabl. Proteaseinhibitor (pro 10 ml)
Sammelgel	5,1% Acrylamid

	125 mM TRIS-Puffer, pH 6,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
	0,1% TEMED
TBST	20 mM TRIS
	500 mM NaCl
	0,1% Tween 20
Transferpuffer	10% West-Puffer (10x)
	10% Methanol
Trenngel	12,5% Acrylamid
	350 mM TRIS-Puffer, pH 8,8
	0,1% SDS
	0,1% APS
	0,1% TEMED
West-Puffer (10x)	1,9 M Glycin
	0,25 M TRIS
	pH 8,1 - 8,4

3.1.6 Antikörper

Spezies	anti	Zielprotein	Verd. IF	Verd. WB	Firma
Primärantikörper					
mouse	α-	Claudin-4	1:250	1:5000	Invitrogen, San Francisco, USA
mouse	α-	β-Aktin	-	1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sekundärantikörper					
goat	α-	mouse (AlexaFluor [®] 488)	1:250	-	Invitrogen, San Francisco, USA
goat	α-	mouse (Horseradish peroxidase), F(ab') ₂	-	1:5000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
Verwendete Reagenzien					
DAPI		DNA	1:1000	-	Roche, Grenzach-Wyhlen

Verd. = Verdünnungsverhältnis, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenzfärbung

3.2 Geräte und Materialien – Institut für Immunologie (IFI)

3.2.1 Geräte

Brutschrank begast HERAcell 240i	Thermo Scientific, Deutschland
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Scientific, Deutschland
Lichtmikroskop Primo Vert	Zeiss Jena
Pipetten, 10, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pietues®	Hirschmann®, Eberstadt
QuikSip™ BT-Aspirator	Brand, Wertheim
Wasserbad Lauda E100	Lauda-Bringmann, New Jersey, USA
Werkbänke	
- Sterilwerkbank Scanlaf Mars Safety 2	LaboGene, Dänemark
- Uniflow KR-130 Klasse 2	KojAir, Finnland
Vortexgerät Vortex Genie 2	NeoLab, Heidelberg
Zellzähler-Zellanalysesystem CASY TT 150	OMNI Life Science, Bremen
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

6 Well Culture Cluster	Corning, New York, USA
Cell Strainer, 70 µM	Corning, New York, USA
CASYcups Tubes	OMNI Life Science, Bremen
CAYSton	OMNI Life Science, Bremen
CASYblue	OMNI Life Science, Bremen
CASYclean	OMNI Life Science, Bremen
Cryotubes	Sarstedt, Nümbrecht
Iscove's Modified Dulbeccos' s Medium mit Glutamin/HEPES	PAN-Biotech, Deutschland
Kanülen, 20G	B. Braun, Melsungen
Mikrotiterplatten, 96 Well	Thermo Scientific, Dänemark
Dulbecco's PBS ± Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAN-Biotech, Aidenbach
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Petrischalen Ø 6, 14 cm	Greiner Bio-One, Deutschland
Pipettenspitzen (ungestopft)	
- 10 µl	Biozym, Wien
- 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße

- 1,0 ml	Roth, Karlsruhe
- 15, 50 ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Skalpelle	B. Braun, Melsungen
RPMI 1640 Medium + HEPES + NaHCO ₂	PAN-Biotech, Aidenbach
Stabpipetten Costar® Stripette® (10, 25 ml)	Corning, New York, USA
Natriumpyruvat	PAN-Biotech, Aidenbach
Zellkulturflaschen	
- 75 cm ²	Sarstedt, USA
- 25 cm ²	Greiner Bio-One, Deutschland

3.2.3 Laborchemikalien und Agenzien

Amphotericin B (250 µg/ml)	PAN-Biotech, Deutschland
DMSO	AppliChem, Darmstadt
Gentamycin	PAN-Biotech, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	AppliChem, Darmstadt
NH ₄ CL (Ammoniumchlorid)	Sigma, Steinheim
rekombinantes humanes M-CSF (10 µg/ml)	Peprotech, Hamburg
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAN-Biotech, Deutschland
Rinderserum (engl. fetal calf serum, FCS)	PAN-Biotech, Detuschland

3.2.4 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

Porcine IL-6 DuoSet ELISA	R&N Systems, USA Minneapolis
Porcine IL-12/ IL-23 p4 DuoSet ELISA	R&N Systems, USA Minneapolis
Porcine IL-10 DuoSet ELISA	R&N Systems, USA Minneapolis
Porcine IL-TNF-α DuoSet ELISA	R&N Systems, USA Minneapolis

3.2.5 Puffer

Erythrozyten-Lysepuffer
10 mM KHCO₃
150 mM NH₄Cl
0,1 mM Na₂EDTA
pH 7,5

3.2.6 Antikörper

Spezies	anti	Zielprotein	Klon	Farbstoff	Verd. IF	Firma
mouse	α-	Pig CD11a	BL1H8	FITC	1:10	AbD Serotec
mouse	α-	Pig CD14	MIL2	FITC	1:100	AbD Serotec
mouse	α-	Pig CD16	G7	PE	1:10	Thermo Scientific
mouse	α-	Pig CD163	2A10/11	PE	1:10	life technologies
mouse	α-	Pig CD172a	74-22-15A	PE	1:100	BD
mouse	α-	SLA class II DR	2E9/13	FITC	1:100	AbD Serotec
		Exklusionsmar ker für tote Zellen		eFluor 506	1:1000	eBioscience

Verd. = Verdünnungsverhältnis, IF = Immunfluoreszenzfärbung

3.5 Bakterienstämme

3.5.1 *Salmonella* Typhimurium Wild-Typ Stamm

Hierbei handelt es sich um den *Salmonella* Typhimurium-Stamm BB440 mit der Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)-Nummer 04-00870. Dieser wurde freundlicherweise von Dr. Istvan Szabo aus dem BfR zur Verfügung gestellt.

3.5.2 *Salmonella* Typhimurium Pathogenitätsinsel-Knockout-Stämme

Der *Salmonella* Typhimurium-Stamm BB440 mit der BfR-Nummer 04-00870, bei dem einzelne Genloci aus den *Salmonella*-Pathogenitätsinseln (SPI) entfernt wurden, fand in dieser Arbeit Verwendung. Die beiden genetisch modifizierten Stämme tragen die Bezeichnung Δ SPI1 und Δ SPI2. Beim Δ SPI1-Stamm wurde ein Knockout des Invasionslocus vorgenommen. Das Bakterium ist somit nicht mehr in der Lage, in Wirtszellen einzudringen. Beim Δ SPI2-Stamm wurde hingegen der intrazelluläre Proliferationslocus ausgeschaltet. Dies bewirkt, dass die intrazelluläre Proliferation der Bakterien in Makrophagen inhibiert wird.

Beide Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Karsten Tedin aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin zur Verfügung gestellt.

3.6 Pralnacasan

Der Caspase-1-Hemmer der Firma Vertex Pharmaceuticals, Boston, USA, wurde freundlicherweise von der Klinikdirektorin Prof. Dr. Britta Siegmund aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

3.7 Software

Anwendung

Vertrieb

FACS Analyse

FlowJoe 10.5.3

FlowJoe, LLC, 2013-2018

Bildbearbeitung

Fiji (Fiji Is Just Image J)

Schindelin, MPI-CBG, Dresden
freeware, <http://fiji.sc/Fiji>

ImageJ 1.52d

Rasband, NIH, Bethesda, Maryland,
USA
freeware, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Zen 2012 SP1 (black edition) (64bit)

Carl Zeiss Microscopy GmbH 1997-2013

Densitometrische Auswertung

AIDA Version 3.21.001

Raytest, Berlin

Photometrische Auswertung

Easywin Fitting, Version V6.0a

Tecan, Grödig, Österreich

Statistische Auswertung

GraphPad Prism 6.05 Trail (Windows)

1992-2014 GraphPad Software, Inc.

4. Methoden

4.1 Zellbiologie

4.1.1 IPEC-J2 Zelllinie – Solitärkultur

Die nichtkanzerogene Zelllinie IPEC-J2 (Intestinal Porcine Epithelial Cells from Jejunum) stammt ursprünglich aus dem Jejunum eines neugeborenen noch nicht gesäugten Ferkels (Berschneider, 1989). In der Etablierungsphase der Kokultur erfolgte die Kultivierung unter Verwendung von Dulbecco's modified Eagle Medium/ F12/ HAM (DMEM/F12/HAM) (Sigma) mit zwei verschiedenen Seren (fötales Kälberserum (FCS) (Sigma) oder adultes Schweinenserum (Pig-Serum, PIGS) (Sigma)) sowie einigen Zusatzstoffen, wie unten angeben. Es ergaben sich somit die folgenden beiden IPEC-J2 Nährmedien:

- **DMEM_{FCS}**: DMEM/F12/HAM, 10% FCS sowie 1% Penicillin/Streptomycin (PAA)
- **DMEM_{PIGS}**: DMEM/F12/HAM, 10% PIGS sowie 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Insulin/Transferrin/Selenium (ITS) (Gibco) und 5 µg/ml Epidermal Growth Factor (EGF) (Sigma)

Die Zellen wurden in einer Kulturflaschen (25 cm²) im begasten Brutschrank (37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) mit 6 ml Nährmedium kultiviert. Zur Vorbereitung des Anlegens einer frischen Kulturflasche bzw. für das Aussäen der Zellen auf Zellkultur-Filtern (0,4 µm, HA, Millicell) wurde zu einer konfluent bewachsenen Kulturflasche 1 ml Trypsin/EDTA (Sigma) gegeben. Die gelösten Zellen wurden im Anschluss in 6 ml des Nährmediums resuspendiert. Für neu beimpfte Kulturflaschen wurden 6 ml des Nährmediums und 1 ml der Zellsuspension verwendet. Für die Aussaat auf die Zellkulturfilter wurden 2x10⁵ Zellen/cm² (DMEM_{PIGS}) bzw. 1,8x10⁶ Zellen/cm² (DMEM_{FCS}) verwendet.

Für die IPEC-J2-Zellen, die für das direkte Kontaktmodell (Seite 25, Abbildung 1B) verwendet wurden, wurden die IPEC-J2-Zellen invers ausgesät und nach einer sechsständigen Inkubationsphase im Brutschrank wieder in ihre aufrechte Position gebracht. Für das weitere Wachstum wurden die Zellkulturen im begasten Brutschrank für mindestens 14 Tage kultiviert. Das Kulturmedium der Zellen wurden dreimalig in der Woche gewechselt. Es wurden Zellen der Passage 71 bis 79 verwendet.

4.1.2 Caco-2bbe – Solitärkultur

Die Caco-2bbe-Zelllinie ist ein Klon der Caco-2-Zelllinie, die aus den menschlichen Zellen eines Colon-Adenokarzinoms gewonnen wurde (Peterson and Mooseker, 1992).

Die Zellen wurden in einer Kulturflasche (25 cm²) im begasten Brutschrank (37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit) mit 6 ml Nährmedium (DMEM Glutamax mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES (Fluka) und 1% nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom)) kultiviert. Zur Vorbereitung für das Anlegen einer frischen Kulturflasche bzw. für das Aussäen der Zellen auf Zellkulturfiltern (3 µm, PCF, Millicell) wurden Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche (25 cm²) mit 1 ml Trypsin/EDTA (Sigma) behandelt. Die abgelösten Zellen wurden dann in 6 ml des Nährmediums resuspendiert. Im Anschluss wurden neue Kulturflaschen mit 6 ml Nährmedium gefüllt und mit 1 ml der Zellsuspension beimpft. Die Aussaat auf die Zellkulturfilter erfolgte mit einer Dichte von $6,6 \times 10^5$ Zellen/cm². Die Zellkulturfilter wurden bis zur Konfluenz nach ca. 14 Tagen im begasten Brutschrank kultiviert. Der Mediumswechsel erfolgte dreimalig pro Woche. Es wurden Zellen der Passagen 13 bis 20 verwendet.

4.1.3 PBM-abstammende Makrophagen – Solitärkultur

Die Makrophagen wurden durch einen Differenzierungsprozess aus tiefgefrorenem Schweineknochenmark (pig bone marrow, PBM) gewonnen, welches in einem vorrangegangenen Schritt aus schlachtfrischen Schweinerippen isoliert worden war. Die Gewinnung und Differenzierung erfolgte im Institut für Immunologie (IFI, Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin). Bei der PBM-Gewinnung wurden die Rippen zunächst separiert und von Muskel-, Sehnen- und Bindegewebe gereinigt, bevor sie für 3 min mittels 70%igem Alkohol äußerlich desinfiziert wurden. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der sterilen Arbeitswerkbank. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Rippen jeweils auf eisgekühltem RPMI 1640 (engl. Roswell Park Memorial Institute) Medium (PAN-Biotech) mit 5 mM EDTA (Roth) gelagert (RPMI_{EDTA}). Zur weiteren Verarbeitung wurden die einzelnen Rippen vom Periost befreit. Sowohl das proximale als auch das distale Ende der Rippen wurde jeweils verworfen. Die Diaphyse wurde in ca. 2 cm lange Stücke unterteilt und im Anschluss das PBM mit RPMI_{EDTA} mithilfe einer 20G Spritze (Braun) herausgespült. Die dabei gewonnene Zellsuspension wurde in einem Gefäß für einen sich anschließenden groben Filtrierungsprozess mittels 70 µm Filters (Corning) aufgefangen. Nach dem Filtrierungsprozess wurde die Zellsuspension mit 350xg bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (5810 R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 2-5 min inkubiert, bevor eine erneute Zugabe von 15 ml RPMI_{EDTA} sowie ein erneuter Zentrifugationsschritt nach obigem Schema durchgeführt wurde. Die PBM-Suspension wurde im Anschluss in RPMI_{EDTA} aufgenommen, die Zellzahl mittels CasyCount

(OMNI Life Science) ermittelt und die gewonnenen Zellen mit einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in 90% FCS (PAN-Biotech) und 10% DMSO (AppliChem) bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Für die Differenzierung wurde die benötigte Zellmenge bei Bedarf zügig in $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem Wasser aufgetaut, in IMDM (PAN-Biotech) mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B (PAN-Biotech) und 10% FCS (IMDM_{PSA/FCS}) aufgenommen, einmalig gewaschen (300xg, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 5810 R, Eppendorf) und das Pellet anschließend unter Zugabe von IMDM_{FCS/PSA} resuspendiert. Die Zellen wurden auf beschichtete Petrischalen (21,5 cm²) (Greiner Bio-One) mit einer Saaddichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Als Differenzierungsmedium kam IMDM_{FCS/PSA}, dem 10 ng/ml des rekombinanten humanen makrophagenstimulierenden Wachstumsfaktors (rhM-CSF) (PeproTech) zugesetzt wurden, zum Einsatz. Der Nährmedienwechsel erfolgte während der Gesamtkultivierungsdauer von sieben Tagen im begasteten Brutschrank ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) zweimal pro Woche. Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden einmal mit Kalzium-/Magnesium-freiem PBS (PAN-Biotech) gewaschen und durch Zugabe des gleichen Puffers mit 2 mM EDTA (PBS_{EDTA}) vom Boden der Petrischalen gelöst, in DMEM_{PIGS} aufgenommen und anschließend zentrifugiert (300xg, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 5810 R, Eppendorf). Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in DMEM_{PIGS} resuspendiert. Es folgte eine Bestimmung der Zellzahl mittels CasyCount und das Einstellen einer Zellkonzentration von $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Der Transport ins Institut für Klinische Physiologie erfolgte auf Eis. Zur Vorbereitung der Kokultivierung wurden die einzelnen Petrischalen (\varnothing 6 cm, Nunc) mit je 7 ml der Makrophagenzellsuspension befüllt und im begasteten Brutschrank bis zur Kokultivierung mit den IPEC-J2-Zellen für 2 h gelagert. Während der Etablierungsphase wurden IMDM_{FCS}, IMDM_{PIGS} (Zusätze der IMDM-Medien analog zu denen, der DMEM-Medien), DMEM_{PIGS} und DMEM_{FCS} versuchsweise als Kultivierungsmedium eingesetzt (siehe Seite 24, Tabelle 1 und Seite 37, Abbildung 2).

Die differenzierten Makrophagen wurden einmalig nach einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen mit freundlicher Unterstützung von Dr. Friederike Ebner und Dr. Sebastian Rausch hinsichtlich verschiedener Zelloberflächenmarker, sogenannter *Cluster of Differentiation* (CD), gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Tote Zellen wurde mittels Exklusionsmarker identifiziert. Die ausgewählten Marker beinhalteten das *Swine Leukocyte Antigen II* (SLA II) sowie CD11a, CD14, CD16, CD163 und CD173. Die anschließende Auswertung erfolgte mittels der Software Flowjo in der Version 10.5.3.

Tabelle 1: Kultivierungsbedingungen von PBM-Makrophagen in der Etablierungsphase

Kultivierungsbedingungen		Solitärkultur	Kokultur
		PBM-Makrophagen	IPEC-J2 _{indirekt}
DMEM/F12/HAM	PIGS	✓	✓
	FCS	✓	✓
IMDM	PIGS	✓	x
	FCS	✓	x

4.1.4 Kokulturen

Während der Etablierungsphase wurden verschiedene Kombinationen von Nährmedien und Kontaktmodellen getestet (schematische Darstellung: Seite 25, Tabelle 2 und Seite 25, Abbildung 1).

4.1.4.1 Indirektes Kontaktmodell

Für das indirekte Kontaktmodell wurden die IPEC-J2 Zellfilter und die Makrophagen wie unter 4.1.1 und 4.1.3 beschrieben kultiviert. Im Anschluss wurden die IPEC-J2 Zellfilter zu den ausdifferenzierten Makrophagen gesetzt. Durch die semipermeable Membran der Zellfilter entstanden somit zwei gesonderte Kompartimente, ein apikales oberhalb und ein basolaterales unterhalb der Filtermembran (Seite 25, Tabelle 2 und Seite 25, Abbildung 1A).

4.1.4.2 Direktes Kontaktmodell

Die PBM-Makrophagen, die für das direkte Kontaktmodell verwendet werden sollten, wurden nach erfolgter Ausdifferenzierung mithilfe von PBS_{EDTA} von den Wellplatten gelöst und einmalig mit IMDM_{FCS} gewaschen (300×g, 4 °C, 10 min, 5810 R, Eppendorf). Im Anschluss wurde das Pellet im jeweiligen Nährmedium resuspendiert und 1 ml der Suspension

($4,9 \times 10^4$ Zellen/cm²) apikal in die Zellkulturfilter über die invers ausgesäten IPEC-J2-Zellen gegeben (Seite 25, Tabelle 2 und Seite 25, Abbildung 1B)

Tabelle 2: Kokultur-Kultivierungsbedingungen

Kultivierungsbedingungen		Solitärkultur		Kokultur	
		IPEC-J2	IPEC-J2 _{invers}	IPEC-J2 _{indirekt}	IPEC-J2 _{invers/direkt}
DMEM/F12/HAM	PIGS	✓	✓	✓	✓
	FCS	✓	✓	✓	✓

FCS = mit FCS kultivierte IPEC-J2-Zellen, PIGS = mit PIGS kultivierte IPEC-J2-Zellen, IPEC-J2 = IPEC-J2 Solitärkultur, IPEC-J2_{invers} = IPEC-J2-Zellen invers ausgesät, IPEC-J2_{indirekt} = IPEC-J2-Zellen mit indirektem Kontakt zu den Makrophagen, IPEC-J2_{invers/indirekt} = IPEC-J2 invers ausgesät mit direktem Kontakt zu den Makrophagen

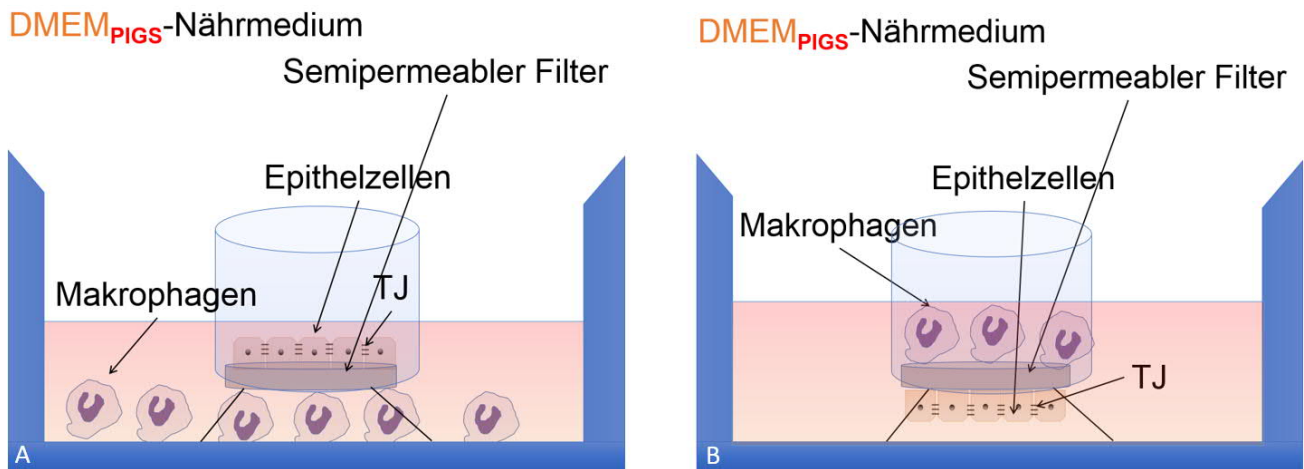


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kokultur-Kontaktmodelle

A) IPEC-J2-Zellen mit indirektem Kontakt zu den Makrophagen, B) invers ausgesäte IPEC-J2-Zellen mit direktem Kontakt zu den Makrophagen

4.2 Barrierephysiologie

4.2.1 Messung des transepithelialen Widerstands

Eine indirekte Möglichkeit, Veränderungen des parazellulären Ionenflusses zu detektieren, stellt das Messen des transepithelialen Widerstands (TER) dar (Schultz, 1972; Srinivasan et al., 2015). Der TER bildet als indirektes Maß die Barrierecharakteristika eines Epithels ab. Messtechnisch kommt eine Elektrode zum Einsatz, die je mit einem ihrer Pole sowohl

im apikalen als auch im basolateralen Kompartiment eines Zellkulturfilters eingetaucht ist. Durch Messung der Änderung der Spannung (U), bei periodischer Applikation eines Rechteckstroms (I , $\pm 10 \mu\text{A}$, 21 Hz), lässt sich mithilfe des Ohmschen Gesetzes der Gesamtwiderstand aus Epithel und Zellfilter (R^t) berechnen.

$$R^t = \frac{U}{I}$$

Nach Abzug des Zellfiltersystemwiderstands (R^{leer}), erhält man den TER des Epithels. Durch Einbeziehung der Filterfläche (A) erhält man den TER des Epithels mit der Maßeinheit $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Der so ermittelte Wert lässt Vergleiche von verschiedenen Zelllinien und Zellfiltersystemen zu.

$$TER = (R^t - R^{leer}) \cdot A$$

Zur Messung des TER wurde eine im Institut entwickelte Messapparatur († Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) mit automatischer Höhen- und Positionskontrolle verwendet. Die Temperatur des Nährmediums wurde während des Messvorgangs mithilfe einer Heizplatte auf 37 °C aufrechterhalten. Durch Eintauchen der Messelektrode in 80%igen Ethanol wurde die Messelektrode zwischen den einzelnen Messungen desinfiziert.

4.2.2 Bestimmung des Fluorescein-Fluxes

Mithilfe des mittelgroßen Farbstoffmoleküls Fluorescein (332 Da) lassen sich Veränderungen der parazellulären Permeabilität messen. Zur Bestimmung des parazellulären Fluorescein-Fluxes von Epithelzell Layern wurden die Zellkulturfilter nach einem Experiment in ein 12-Transwellsystem umgesetzt. Pro Well wurden basolateral 1 ml frisches Nährmedium (DMEM/F12/HAM + 10% PIGS) und apikal 10 μl einer Fluoresceinlösung (5 mM, Sigma) zu den Epithelzellen hinzugegeben. Direkt nach der Zugabe der Fluoresceinlösung (t_1), nach 30 min (t_2) und abschließend nach 1 h (t_3) erfolgte eine Abnahme von 300 μl des Nährmediums aus dem basolateralen Kompartiment, welches im Anschluss direkt mit frischem Nährmedium wieder aufgefüllt wurde. Um eine homogene Verteilung des Fluoresceins in der Messprobe zu erreichen, wurde mit einer Pipette das basolaterale Medium vor Abnahme vorsichtig durchmischt. Zwischen den Abnahmezeitpunkten wurden die Zellkulturfilter der

Solitär- und Kokulturen im begasten Brutschrank gelagert. Die Farbstoffintensität der gewonnenen Proben wurde anschließend per Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 525 nm mit einem Mikroplattenlesegerät (Infinite® M200, Tecan) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe einer Fluoresceineichreihe. Der Flux wurde im Anschluss unter der Verwendung folgender mathematischer Gleichungen berechnet:

Initiale Messung:

$$J = \frac{(c_2 - c_1) \cdot V_K}{(t_2 - t_1) \cdot A_E}$$

Folgemessung:

$$J = \frac{(c_3^* - c_2) \cdot V_K}{(t_3 - t_2) \cdot A_E}$$

Die Berechnung der durch die erneute Zugabe bedingten korrigierten Konzentration c_3^* , erfolgte mit folgender Gleichung:

$$c_3^* = \frac{(c_2 \cdot V_{ab}) + (c_3 \cdot V_K)}{V_K}$$

J	Fluorescein-Flux
c_1, c_2, c_3	Fluoresceinkonzentration zu den Zeitpunkten t_1, t_2 und t_3
c_3^*	korrigierte Konzentration von c_3
t_1, t_2, t_3	Abnahmezeitpunkte
V_K	basolaterales Kammervolumen
V_{ab}	abgenommenes Volumen
A_E	Epithelfläche

4.3 Proteinbiochemie

4.3.1 Gesamtproteinextraktion

Nach einem Experiment wurden die Zellfilter einmalig mit frischem $\text{PBS}^{+\text{Ca}2+/\text{Mg}2+}$ gewaschen. Im Anschluss erfolgte pro Filter die Zugabe von 100 μl des RIPA-Puffers (RIPA, engl. *radio immuno precipitation assay*), der zuvor auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Alle Folgeschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden mithilfe eines Rührspatels

(Sarstedt) von den Zellkulturfiltern gelöst. Die Puffer-Zellsuspension wurde im Anschluss in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt und für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Im Anschluss wurde die visköse Flüssigkeit mittels eines Ultraschallstabs (UP50H, Hielscher) achtmal für je 1 s beschallt und das Lysat zweimal durch eine 20G und eine 26G Kanüle gezogen, bevor es abschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

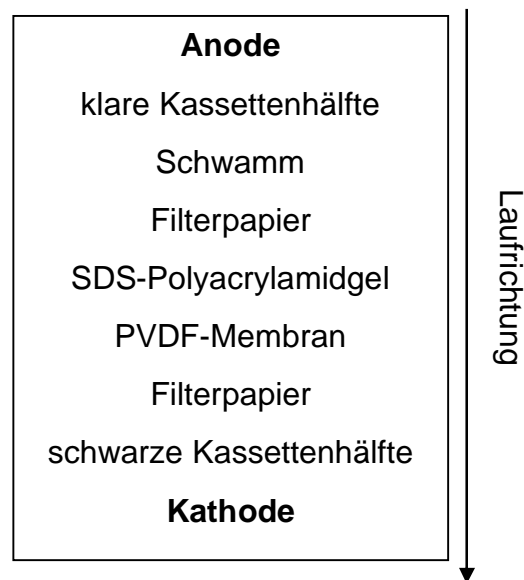
Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mithilfe der BCA (engl. *bicinchoninic acid assay*)-Methode, die nach Herstellerangaben (Pierce®, Thermo Scientific) durchgeführt wurde. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass Proteine im alkalischen Milieu mit Cu^{2+} einen Komplex bilden und dieses zu Cu^+ reduzieren. Das reduzierte Cu^+ bildet in einem weiteren Schritt mit der Bicinchoninsäure einen Komplex, der zu einem detektierbaren Farbumschlag führt. Es wurden je 10 μl der einzelnen Proben, des reinen RIPA-Puffers sowie 10 μl der Rinderserumalbumin (BSA)-Kalibrationslösungen (0, 0,2, 0,8, und 1,2 mg BSA/ml) in eine Mikrotiterplatte pipettiert und jeweils 190 μl der BCA-Gebrauchslösung pro Well hinzugegeben. Sämtliche Pipettierschritte wurden dabei in einem doppelten Ansatz durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde im Anschluss für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Farbintensitätsmessung der Proben erfolgte durch Detektion bei 562 nm mittels eines Photometers (Spectra Classic, Tecan). Die abschließende Konzentrationsberechnung erfolgte mithilfe der BSA-Eichgerade.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Möglichkeit, Proteine unabhängig von ihrer Ladung anhand ihrer Größe zu separieren ist die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli. Die Proteinmenge der einzelnen Proben betrug je 15 μg , die mit Laemmli-Puffer (4 μl /15 μg Protein) versetzt wurden. Die Proben wurden dann im Anschluss für 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden jeweils 15 μg vorbereitetes Protein in je eine der 1,5 mm dicken Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. In die beiden äußeren Geltaschen wurde jeweils 5 μl eines Proteingrößenindikators (PageRuler™, Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte dann mit dem Mini-Protean® 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad) bei einer Spannung von 100 Volt für ca. 90 min.

4.3.4 Western Blot

Zur späteren immunhistologischen Detektion mussten die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel mittels Western Blot im Nassblotverfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. Die Membran wurde zunächst mittels Inkubation in Methanol für 5 min aktiviert und im Anschluss in Transferpuffer equilibriert. Danach wurde das SDS-Polyacrylamidgel mit der Membran und dem vorab equilibrierten Filterpapier (Whatman) und den Schwämmen nach dem hier dargestellten Gel-Membran-Sandwich-Modell blasenfrei zusammengebaut.



In die Blotkammer wurden das Gel-Membran-Sandwich, ein Rührfisch und ein Kühlakku eingesetzt und die Kammer abschließend mit Transferpuffer befüllt. Der Proteintransfer erfolgte dann bei konstantem Rühren mithilfe eines Magnetrührers unter einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h.

Nach erfolgreichem Transfer wurde die PVDF-Membran für 2 h bei Raumtemperatur (RT) (alternativ über Nacht bei 4 °C) mittels 50 ml Blocklösung zur Reduktion von unspezifischen Bindungsstellen unter einem permanenten Schwenkvorgang (pSV) blockiert. Nach der Blockierung erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers unter pSV für 2 h bei RT (alternativ über Nacht bei 4°C). Die PVDF-Membran wurde danach dreimalig für 10 min mittels TBST bei RT und pSV gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des zweiten Antikörpers bei RT und pSV für 60 min und erneut ein dreimaliger Waschvorgang mit TBST bei RT und pSV für je 10 min.

Abschließend wurde die Membran in einer 1:1-Mischung der LumiLight-Lösungen 1 und 2 für 5-10 min in der Dunkelheit inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde von der Membran

soweit wie möglich abgetropft, die PVDF-Membran im Anschluss zwischen zwei Transparenzfolien platziert und die Proteinbanden mittels Lumineszenzbildanalysators (LAS-1000, FujiFilm) detektiert. Die Menge an geladenem Protein wurde überprüft, indem β -Aktin auf der vorab geteilten Blotmembran parallel detektiert wurde. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Signale erfolgte unter Verwendung der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest).

4.4 Infektiologie

4.4.1 Vorbereitung der IPEC-J2 Solitär- und Kokulturen

Am Tag des Experimentes wurden die IPEC-J2-Zellen der Solitär- und Kokulturen apikal durch mehrere Waschschriffe vom Schweineserum freigesetzt. Dazu wurde im ersten Schritt das Medium aus dem basolateralen Kompartiment der Petrischale, im zweiten Schritt das Nährmedium des apikalen Kompartiments der einzelnen Zellkulturfilter entfernt. Anschließend wurde das apikale Kompartiment (0,6 ml), danach das basolaterale Kompartiment (5 ml) mit DMEM/F12/HAM aufgefüllt. Es folgte eine erneute Abnahme des frischen Mediums, gefolgt von vier Waschschriffen des apikalen Kompartiments. Abschließend wurde das apikale Kompartiment mit 0,5 ml DMEM/F12/HAM befüllt und das basolaterale Kompartiment mit 7 ml DMEM/F12/HAM mit 10% PIGS. Die Zellen wurden bis zum Beginn des Experimentes für ca. 4 h im begasten Brutschrank zwischengelagert.

4.4.2 Vorbereitungen der Caco-2bbe-Solitärkulturen

Am Tag des Experimentes wurden die Caco-2bbe-Solitärkulturen apikal durch mehrere Waschschriffe vom FCS freigesetzt. Dazu wurde im ersten Schritt das Medium aus dem basolateralen Kompartiment der Petrischale, im zweiten Schritt das Nährmedium des apikalen Kompartiments der einzelnen Zellkulturfilter entfernt. Anschließend wurde das apikale Kompartiment (0,6 ml), danach das basolaterale Kompartiment (5 ml) mit Nährmedium (DMEM Glutamax) aufgefüllt. Es folgte eine erneute Abnahme des frischen Mediums, gefolgt von vier Waschschriffen des apikalen Kompartiments. Abschließend wurde das apikale Kompartiment mit 0,5 ml DMEM Glutamax befüllt und das basolaterale Kompartiment mit 7 ml DMEM Glutamax mit 10% FCS. Die Zellen wurden bis zum Beginn des Experimentes für ca. 4 h im begasten Brutschrank zwischengelagert.

4.4.3 Vorbehandlung der IPEC-J2 Solitärkulturen mit Quercetin

Die IPEC-J2-Zellen wurden am Vorabend des Experimentes sowohl apikal als auch basolateral mit 200 μ M Quercetin, gelöst in DMSO (Quercetin_{DMSO}), vorinkubiert. Den entsprechenden Kontrollfiltern wurde ebenfalls DMSO in der gleichen Konzentration zugesetzt. Am Tag des Experimentes erfolgten dieselben Waschschriffe wie bei den IPEC-J2 Solitär- und Kokulturfilttern (siehe 4.4.1). Im letzten Schritt des Waschvorgangs wurden den IPEC-J2-Zellen basolateral 7 ml DMEM/F12/HAM mit 10% PIGS und 200 μ M Quercetin_{DMSO} und apikal 0,5 ml DMEM/F12/HAM ohne PIGS mit 200 μ M Quercetin_{DMSO} zugegeben. Bei den Kontrollfiltern wurde analog, jedoch ohne Quercetin verfahren. Die Zwischenlagerung erfolgte wie auch bei den Solitär- und Kokulturen.

4.4.4 Vorbehandlung der Solitärkulturen mit Pralnacasan

Zunächst wurde eine nicht sterile 100 mM Pralnacasan-Lösung in DMSO hergestellt, die anschließend steril filtriert wurde (0,45 μ m Filter, Whatman, vorblockiert mit 0,1% BSA). Am Tag des Experimentes wurden die Zellen, wie unter 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben, gewaschen. Im letzten Schritt des Waschvorgangs wurden den Solitärkulturen basolateral 7 ml mit und apikal 0,5 ml ohne Serum des entsprechenden Nährmediums mit 10 bzw. 100 μ M Pralnacasan zugegeben. Bei den Kontrollfiltern wurde analog, jedoch ohne Pralnacasan verfahren. Die Zwischenlagerung erfolgte wie auch bei den Solitär- und Kokulturen.

4.4.5 *Salmonella* Typhimurium – Wildtyp

Zwei Tage vor dem jeweiligen Experiment wurde vom tiefgefrorenen *Salmonella* Typhimurium-Stamm BB440 (BfR-Nummer 04-00870) eine Probe mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Über Nacht wurde die beimpfte Agarplatte im Brutschrank gelagert. Am Folgetag wurden einzelne Klone mittels Impföse von der LB-Platte gepickt und in sterile Kulturröhrchen (Greiner Bio-One) mit je 4 ml LB-Medium gegeben, das über Nacht im Schüttler (37 °C, 210 rpm, Unimax 1010, Heidolph), inkubiert wurde. Am Tag des Experimentes wurden 10 ml der neu angezüchteten Salmonellen im Verhältnis 1:9 mit frischem LB-Medium in einen 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben überführt und im Schüttler (37 °C und 300 rpm, Infors HT) inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 250 μ l der Probe entnommen und unmittelbar zentrifugiert (6.000xg, 2 min, 4 °C, Z 233 MK-2, Hermle). Das Pellet wurde mit frischem LB-Medium im Verhältnis 1:4 resuspendiert, woraufhin die OD-Messung bei 578 nm (UV/VIS-Spektrometer Lambda 2, Perkin Elmer) erfolgte.

Bei Erreichen einer unverdünnten OD von 0,8-0,9 wurde 1 ml der Salmonellenkultur entnommen, zentrifugiert (6.000xg, 4 °C, 2 min, Z 233 MK-2, Hermle) und das Pellet mittels DMEM/F12/HAM auf die OD von 2,0 gebracht. Bis zur Infektion erfolgte die Lagerung der Salmonellensuspension auf Eis.

4.4.6 *Salmonella* Typhimurium – hitzeinaktivierter Wildtyp

Die Salmonellen des Wildtypstammes mit der OD 0,8 wurden vor der Infektion mithilfe eines Heizblocks hitzeinaktiviert (70 °C, 20 min). Die Probe wurde danach zentrifugiert (6.000xg, 4 °C, 2 min, Z 233 MK-2, Hermle) und das Pellet in DMEM/F12/HAM auf eine OD von 2,0 gebracht.

4.4.7 *Salmonella* Typhimurium – Wildtyp-Überstand

Die Salmonellen des Wildtypstammes mit der OD 2,0 wurden zentrifugiert (6.000xg, 4 °C, 2 min, Z 233 MK-2, Hermle), der Überstand im Anschluss abgenommen und steril filtriert (0,2 µm Filter, Whatman).

4.4.8 *Salmonella* Typhimurium – Pathogenitäts-Knockout-Stämme

Die Anzucht der *Salmonella*-Knockoutstämme Δ SPI1 und Δ SPI2 erfolgte analog zur der des Wildtyps (siehe 4.4.5).

4.4.9 Ermittlung der Wachstumskinetik

Für die Ermittlung der Wachstumskinetik wurden die Salmonellen wie unten beschrieben (siehe: 4.4.5) kultiviert. Die Optische Dichte (OD) wurde in zeitlich aufeinander folgenden Intervallen bei einer Wellenlänge von 578 nm in *Luria Bertani broth* (LB) gemessen. 100 µl der Bakteriensuspension (OD 0,25-2,0) wurden auf LB-Agarplatten in OD-Schritten von 0,25 ausplattiert. Die Agarplatten wurden im Anschluss bei 37 °C über Nacht im unbegasteten Brutschrank inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten. Für die Berechnung der bei den infektiologischen Experimenten verwendeten MOI (engl. *multiplicity of infection*) wurde die Bakterienzahl mittels Geradengleichung bei einer OD von 0,8 bestimmt, da sich die Bakterien hier noch in der log-Phase befinden.

4.4.10 Infektion mit *Salmonella* Typhimurium-Varianten

Für die Infektion wurden jeweils 10 µl der auf eine OD 2,0 konzentrierten *Salmonella* Typhimurium-Suspension verwendet. Diese wurde apikal in die Zellkulturfilter geben. Dabei enthielten 10 µl der Salmonellenkultur $4,84 \times 10^6$ Bakterien, die in Fall der IPEC-J2 Zelllinie auf ca. $1,2 \times 10^5$ Zellen/Filter, im Fall der Caco-2bbe-Zelllinie auf $3,96 \times 10^5$ Zellen/Filter trafen. Die MOI betrug bei den IPEC-J2-Zellen somit 40 und bei den Caco-2bbe-Zellen 12. Anschließend wurden die Solitär- und Kokulturen im begasten Brutschrank gelagert. Nach 2 h und 45 min erfolgte die Abtötung der Bakterien durch Zugabe von 100 µg/ml Gentamycin (50 mg/ml, Roth) in das apikale und basolaterale Kompartiment. Um eine gleichmäßige Verteilung des Antibiotikums zu gewährleisten, wurden die einzelnen Kompartimente vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Solitär- und Kokulturen wurden im Anschluss für weitere 2 h und 15 min im begasten Brutschrank inkubiert. Nach einer Gesamtdauer von insgesamt 5 h wurde der TER gemessen. Nach Messung des 5 h-TER-Wertes wurden exemplarisch jeweils 1 µl/Filter sowie 10 µl aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und nach Verdünnung mit 100 µl PBS^{+Ca+2/Mg+2} auf LB-Agarplatten zur Kontrolle ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden im Anschluss in einem Brutschrank bei 37 °C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit über Nacht inkubiert und am Folgetag auf lebende Kolonien untersucht.

Die Zellfilter wurden im Anschluss der TER-Messung entweder für spätere immunhistologische Färbungen, sich anschließende Western Blots oder für die Messung des parazellulären Fluorescein-Fluxes verwendet.

4.5 Immunassay

Zur Bestimmung der Zytokinausschüttung wurden jeweils 2 ml des basolateralen Mediums der Solitär- und Kokulturen zentrifugiert (13.000xg, bei 4°C, 10 min, Z 233 MK-2, Hermle). Der Überstand wurde anschließend bei -20 °C eingefroren. Im weiteren Verlauf erfolgte die Bestimmung einzelner porziner Zytokine mithilfe eines ELISA (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, DuoSet, R&D Systems). Die Interleukin-ELISA wurden laut Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Dosen einiger Reagenzien nach hausinternem Protokoll reduziert wurden. So wurde bei den Proben, dem ersten Antikörper, dem Reagenz, dem Detektionsantikörper, der Arbeitslösung, der Substratlösung und der Stopplösung jeweils nur die Hälfte der vom Hersteller angegebenen Volumina verwendet. Bei der Blocklösung wurden anstelle von 300 µl, 200 µl/Well verwendet.

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 Fixierung

Für die immunhistologische Färbung wurden die Zellfilter zweimalig mit PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen und anschließend mit einer 2%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 30 min bei RT fixiert. Im Anschluss wurden 125 mM eiskaltes Glycin ins apikale Kompartiment der Zellschicht gegeben und für 5 min inkubiert. Abschließend erfolgten erneut zwei Waschschrte mit PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺}, bevor die Solitärkulturen in PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} bei 4 °C bis zum Folgetag gelagert wurden.

4.6.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellkulturfiltermembranen wurden ausgestanzt und in eine 24-Well-Platte (Nunc) in PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} überführt. Es erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers m-Claudin-4 (1:250, Invitrogen) in 0,5%igem Triton X-100 (Sigma) in PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} für 2 h bei RT auf einem Kipp-Schüttler (IKA®). Die Zellfilter wurden im Anschluss viermalig mit PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} gewaschen, im ersten Waschschrte 1 min, dann jeweils 10 min auf dem Kipp-Schüttler. Anschließend wurden der Sekundärantikörper Alexa Fluor-488 goat-anti-mouse (1:250, Invitrogen) und DAPI (1:1000, Roche) zu den ausgestanzten Filtern in 0,5%igem Triton X-100 (Sigma) in PBS^{+Ca²⁺/Mg²⁺} gegeben und für 2 h auf einem Kipp-Schüttler und unter Lichtausschluss inkubiert. Dann wurden die Filter erneut einem dreimaligen Waschschrte nach vorangegangem Schema unterzogen und abschließend zweimalig in destilliertes Wasser getaucht. Das überschüssige Wasser wurde vorsichtig mithilfe von Zellstoff entfernt und die Filtermembran mit den Epithelzellen mit Mounting-Medium (ProTaq Mount-Fluor, Biocyc) auf einem Objektträger fixiert, bevor sie mithilfe eines Deckglases blasenfrei eingedeckt wurden. Zur Aushärtung wurden die Objektträger bei RT bis zum Folgetag in Dunkelheit gelagert.

4.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) werden zwei und dreidimensionale Schnittbilder von histologischen Präparaten mithilfe eines Laserstrahls erstellt. Dabei wird beim ersten Schritt Licht einer spezifischen Wellenlänge vom Laser punktförmig auf einzelne Bereiche des histologischen Präparats abgegeben. Die Elektronen in den Atomschalen der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern vorbehandelten histo-

logischen Präparate werden im zweiten Schritt durch das Licht dieser Wellenlänge ange-
regt, springen dadurch auf ein höheres Orbital und geben in Folge des Zurückspringens
auf ihr Ursprungorbital Licht längerer Wellenlänge ab. Im nächsten Schritt wird dieses
Licht von dem Detektor des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops aufgefangen. Ein
möglichst scharfes und kontrastreiches Bild wird dadurch erreicht, dass eine Lochblende
störendes Streulicht vom Detektor fernhält und somit fast ausschließlich das direkt zurück-
geworfene Licht registriert werden kann. Da bei dieser Technik immer nur einzelne Berei-
che des Präparates zu einem Zeitpunkt abgebildet werden können, werden die Informatio-
nen von einem PC gespeichert und mithilfe herstellerspezifischer Software zu einem voll-
ständigen Bild zusammengefügt. Durch diese Methode können die histologischen Präpa-
rate in den zwei Ebenen X und Y abgebildet werden. Da die fluoreszenzmarkierten Anti-
körper spezifisch an einzelne Proteinstrukturen der Zellen binden, können so unter ande-
rem einzelne Strukturproteine, wie sie zum Beispiel in Tight Junctions vorkommen, abge-
bildet werden. Die in dieser Dissertation gezeigten Abbildungen wurden mit zwei invers
konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen der Firma Zeiss erstellt (LSM 510 und LSM 780).
Die Objektive sind bei diesen Mikroskopen unterhalb des Präparates angebracht, wobei
die Beleuchtung bzw. Anregung der Fluorophore (Tabelle 2) von oberhalb mittels des La-
serstrahls geschieht. Zur Darstellung der angefertigten Aufnahmen wurde zum einem die
gerätespezifische Software Zen 2012 SP1 (black edition, 64bit) als auch das Programm
Fiji (ImageJ) verwendet. Die systematische Auswertung erfolgte durch die Begutachtung
von jeweils vier Sichtfeldern.

Tabelle 2: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit entsprechenden Wellenlängen

Fluoreszenzfarbstoff	$\lambda^{\text{Absorption}}$ (nm)	$\lambda^{\text{Emission}}$ (nm)
DAPI	405	420-480
AlexaFluor [®] 488	488	505-550

4.8 Statistische Analyse

Die Messwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean* (SEM)) abgebildet. Die statistische Analyse wurde bei normalverteilten Daten mittels One-way ANOVA und bei nicht normalverteilten Daten mittels Kruskal-Wallis-Test vorgenommen. Korrekturen für das multiple Testen wurden entsprechend vorgenommen. Die Normalverteilung wurde bei ausreichender Probengröße mithilfe des D'Agostino-Person

omnibus normality tests vorgenommen. In Fällen, in denen die Probengröße für dessen Berechnung nicht ausreichend war, wurde die Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests bestimmt. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$). Die Berechnung wurde mithilfe der Statistiksoftware GraphPadPrism in der Version 6.05 für Windows durchgeführt.

4.9 Richtlinien

Die Experimente wurden in Laboren der Sicherheitsstufe S1-2 im Institut für Klinische Physiologie der Charité bzw. im Institut für Immunologie der FU Berlin durchgeführt.

Arbeiten in Laboren der Sicherheitsstufe 2 wurden ausschließlich im Institut für Klinische Physiologie durchgeführt. Vor entsprechenden Arbeiten wurde ich ordnungsgemäß mit dem Umgang von gefährlichen Organismen und den hygienischen Vorschriften vertraut gemacht. Eine Genehmigung für den Umgang mit genetisch veränderten Organismen liegt dem Leiter des Instituts Herrn Prof. Dr. Jörg Schulzke vor. Für Experimente an Zellkulturen ist keine Genehmigung der Ethikkommission erforderlich. Die verwendeten Schweinerippen wurden im Zuge der vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigten Tierversuchen des Instituts für Immunologie als Nebenprodukt gewonnen. Bei der Durchführung der Experimente wurden die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten. Diese Arbeit entstand im Rahmen des Integrierten Graduiertenkollegs des Sonderforschungsbereich (SFB) SBF633: „IMMUCO – Induktion und Modulation T-zell-vermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt“.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung der IPEC-J2-Kokultur

5.1.1 Makrophagen

Zur besseren Darstellung von physiologischen Entzündungsvorgängen des Darms wurde ein Kokulturmodell entwickelt, das sowohl Epithelzellen als auch Makrophagen umfasst und es ermöglichte, deren Interaktionen zu untersuchen. Die porcinen Knochenmarkszellen, engl. pig bone marrow (PBM)-Zellen wurden, wie in den Methoden beschrieben (4.1.3), vorerst in IMDM_{FCS} zu Makrophagen differenziert. Im Anschluss daran erfolgte eine Kultivierung in Solitärkultur für fünf Tage mit einem der zu testenden Nährmedien: IMDM_{FCS} , $\text{IMDM}_{\text{PIGS}}$, DMEM_{FCS} oder $\text{DMEM}_{\text{PIGS}}$ (Abbildung 2).

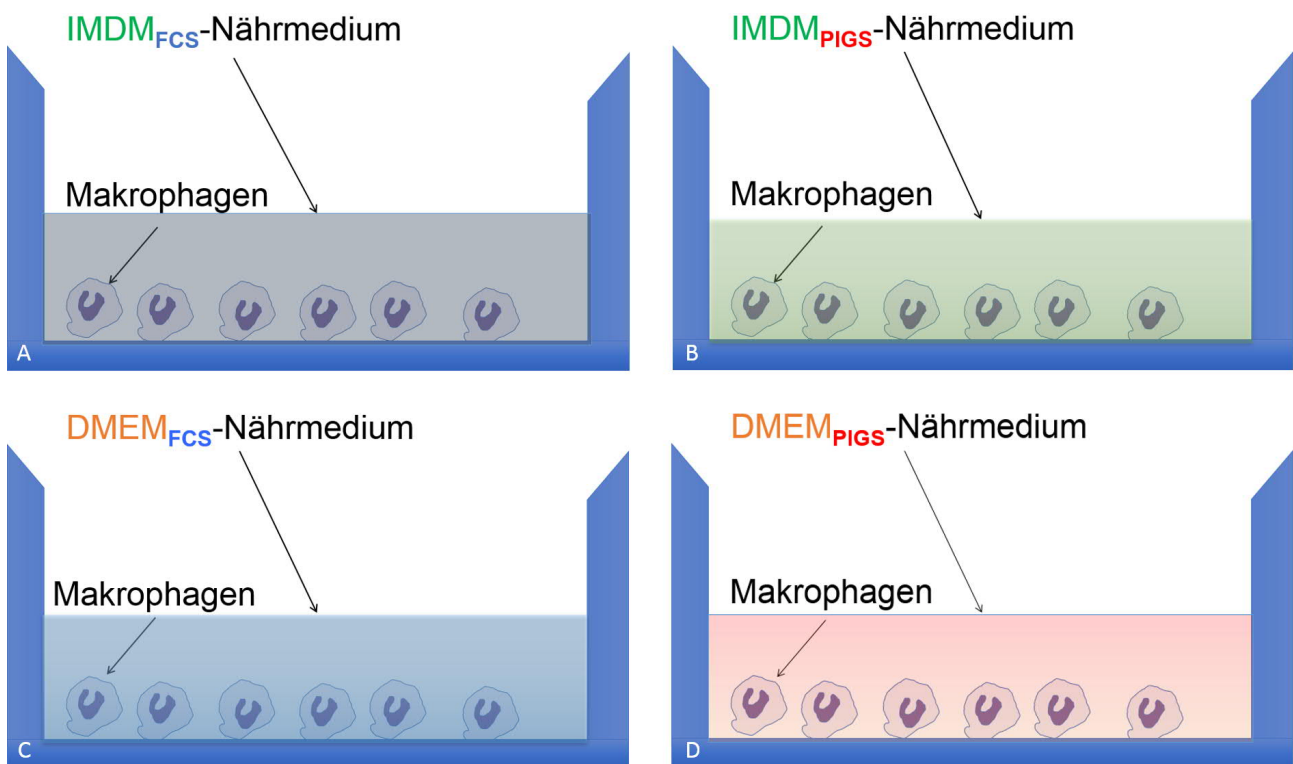


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Makrophagen-Solitärkulturen mit verschiedenen Nährmedien. A) IMDM_{FCS} , B) $\text{IMDM}_{\text{PIGS}}$, C) DMEM_{FCS} , D) $\text{DMEM}_{\text{PIGS}}$

Danach wurden die differenzierten PBM-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von makrophagentypischen Oberflächenmolekülen und Aktivierungsmarkern untersucht. Ein Großteil der ausdifferenzierten Zellpopulation, mit der für Makrophagen typischen Größe und Granularität (definiert über Forward- bzw. Side Scatter (FSC/SSC)), wies in allen Nährmedien die für Makrophagen und Monozyten typischen Oberflächenmarker CD172 auf

(Seite 39, Abbildung 3, Spalte 3). CD172 wurde auf 61% der PBM-Zellen mit $IMDM_{FCS}$ exprimiert. Mit $IMDM_{PIGS}$ kultivierte Zellen wiesen die höchste Expressionsrate mit 86% auf. Unter $DMEM_{FCS}$ betrug die CD172-Expressionsrate 47% und unter $DMEM_{PIGS}$ 62% (Seite 39, Abbildung 3, Spalte 3). Ähnliche Verhältnisse ergaben sich unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen für die CD14-Expression (Seite 39, Abbildung 3, vierte Spalte). Für den Oberflächenmarker CD163 zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster. So wiesen 76% der PBM-Zellen unter $IMDM_{FCS}$ -Kultivierung diesen Oberflächenmarker auf. Die höchste Expressionsrate mit 79% zeigten erneut $IMDM_{PIGS}$ -kultivierte PBM-Zellen auf. Die PBM-Zellen unter $DMEM_{FCS}$ -Kultivierung zeigten mit 33% niedrigere Expressionsraten als die mit $DMEM_{PIGS}$ -kultivierten PBM-Zellen, die zu 50% den Oberflächenmarker CD163 aufwiesen (Seite 40, Abbildung 4, Spalte 3).

Der für antigenpräsentierende Zellen typische Oberflächenmarker MHC II (im Schwein als SLA II bezeichnet) wies die stärkste Expression in den $IMDM$ -Medien auf: in $IMDM_{FCS}$ 75% und in $IMDM_{PIGS}$ 80%. Die entsprechenden $DMEM$ -Konditionen zeigten dagegen relativ geringe Expressionsraten von 33% in $DMEM_{FCS}$ und 48% in $DMEM_{PIGS}$ (Seite 40, Abbildung 4, Spalte 4).

Die beiden Oberflächenmarker CD16 und CD11a, beide eher typisch für Monozyten, wurden in $IMDM_{FCS}$ auf 53% (CD16) und 54% (CD11a) der PBM-Zellpopulation exprimiert. Bei $IMDM_{PIGS}$ wiesen jeweils 75% der Zellen CD16 und CD11a als Oberflächenmarker auf. Die Expressionsraten in den $DMEM$ -Nährmedien betragen bei $DMEM_{FCS}$ 52% für CD16 und 53% für CD11a. In $DMEM_{PIGS}$ waren 71% CD16- bzw. 65% CD11a-positiv (Seite 41, Abbildung 5, Spalten 3 und 4). Die Werte sind zur besseren Übersicht tabellarisch in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Expressionsraten von Oberflächenmarkern der differenzierten PBM-Zellen in verschiedenen Nährmedien.

Expressionsraten in % der ausdifferenzierten PBM-Zellen

Konditionen	CD172	CD163	CD14	CD16	CD11a	SLA II
$IMDM_{FCS}$	61	76	59	53	54	75
$IMDM_{PIGS}$	86	79	86	75	75	80
$DMEM_{FCS}$	47	33	47	52	53	33
$DMEM_{PIGS}$	62	50	50	71	65	48

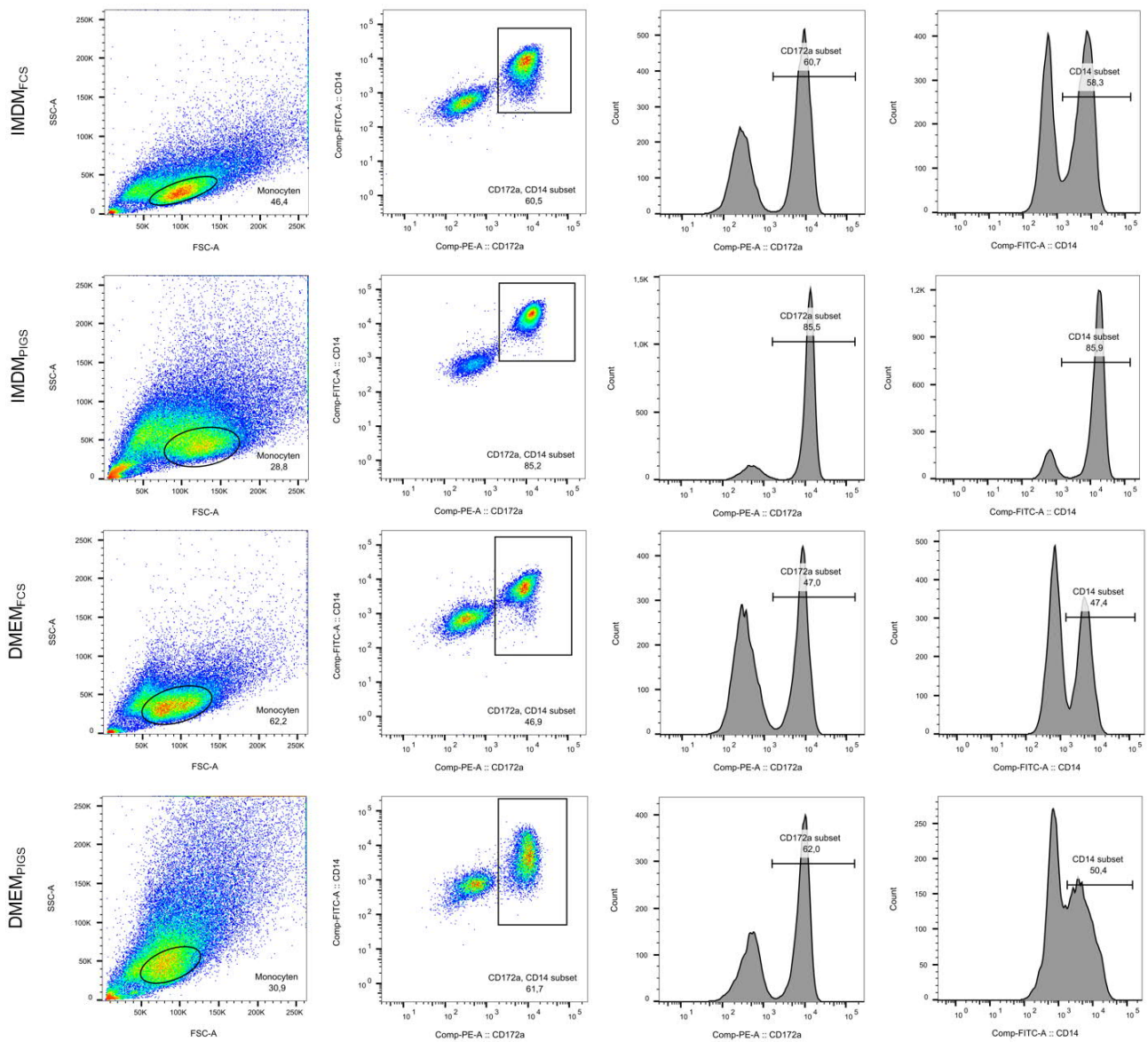


Abbildung 3: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD172 (PE) und CD14 (FITC). Gegenüberstellung der Markerexpression lebender proziner Konchenmarkzellen nach erfolgter Makrophagendifferenzierung und funftägiger Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien. Spalte 1: Darstellung der Makrophagen-Solitärkulturen in Forward- und Sideward Scatter (FCS bzw. SSC). Spalte 2: CD172a und CD14 Expression der über FSC/SSC vorselektierten Zellpopulation. Spalten 3/4: Histogrammauswertung der CD172a bzw. CD14 Expression durch die FSC/SSC-selektierte Zellpopulation. Zeile 1: $IMDM_{FCS}$, Zeile 2: $IMDM_{PIGS}$, Zeile 3: $DMEM_{FCS}$, Zeile 4: $DMEM_{PIGS}$

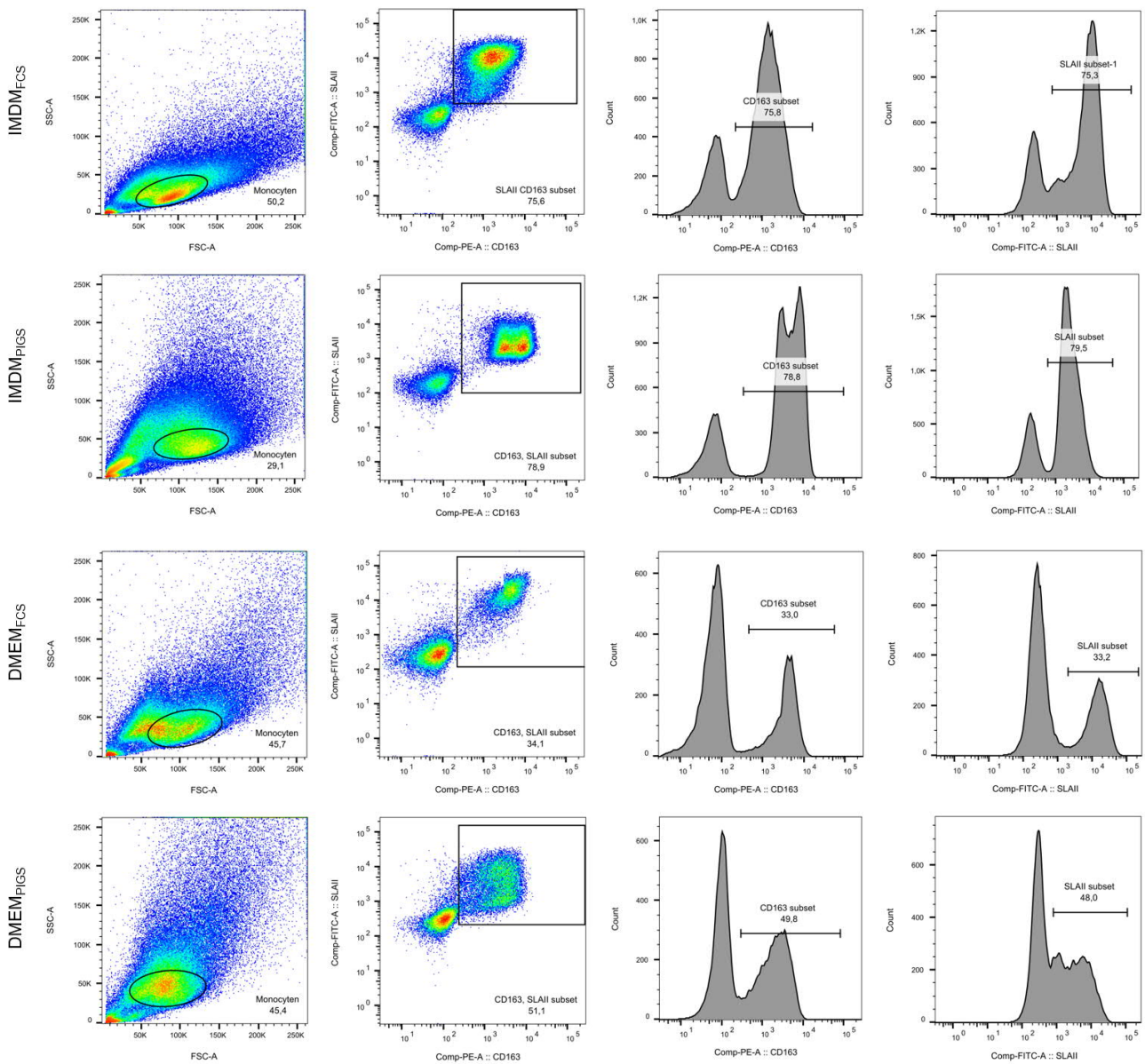


Abbildung 4: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD163 (PE) und SLA II (FITC). Gegenüberstellung der Markerexpression lebender proziner Konchenmarkszellen nach erfolgter Makrophagendifferenzierung und funftägiger Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien. Spalte 1: Darstellung der Makrophagen-Solitärkulturen in Forward und Sideward Scatter (FCS bzw. SSC). Spalte 2: CD163 und SLAII Expression der über FSC/SSC vorselektierten Zellpopulation. Spalten 3/4: Histogrammauswertung der CD163 bzw. SLA II Expression durch die FSC/SSC-selektierte Zellpopulation. Zeile 1: IMDM_{FCS}, Zeile 2: IMDM_{PIGS}, Zeile 3: DMEM_{FCS}, Zeile 4: DMEM_{PIGS}

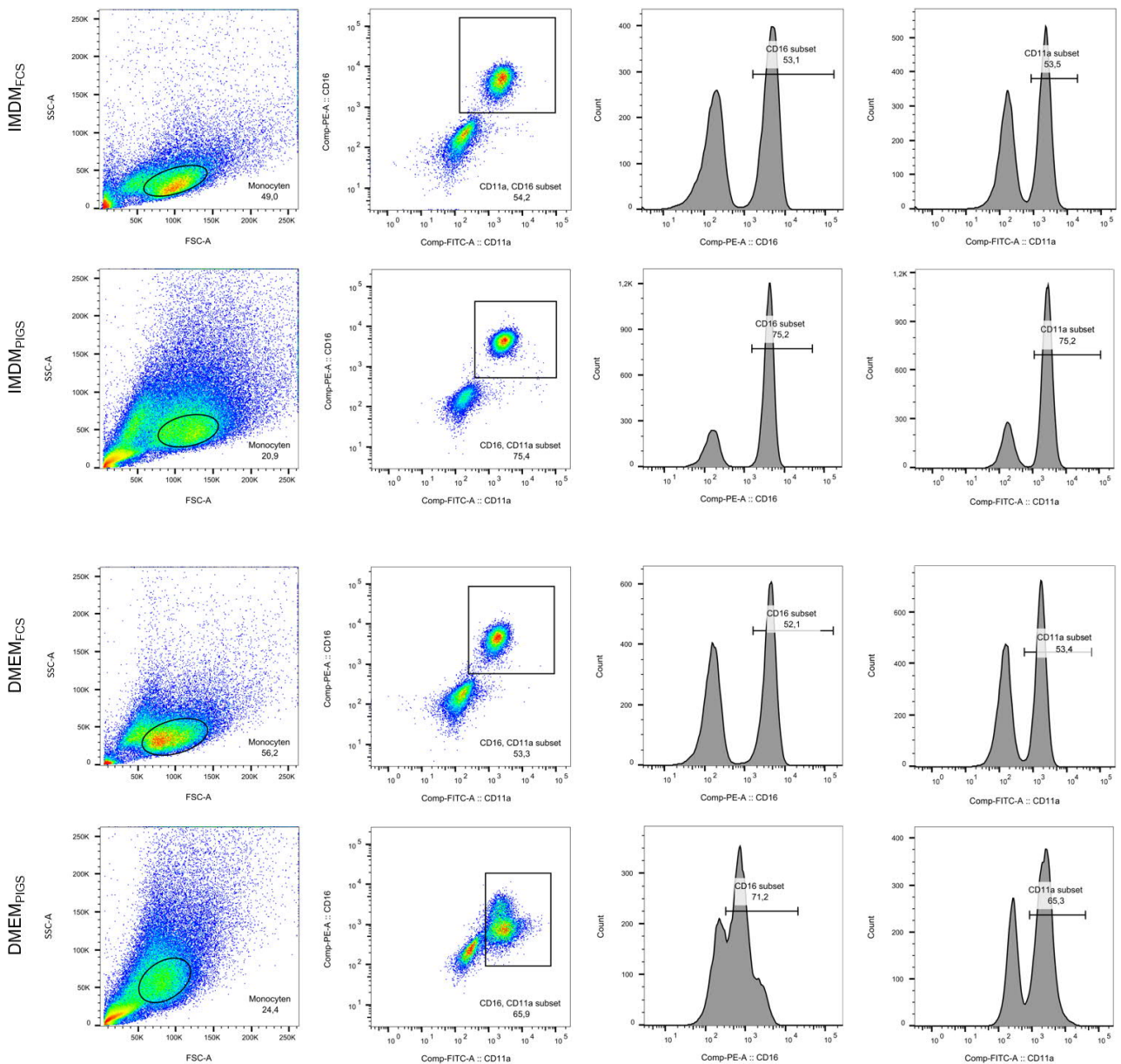


Abbildung 5: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen-Solitärkulturen – Oberflächenmarker CD16 (PE) und CD11a (FITC). Gegenüberstellung der Markerexpression lebender proziner Konchenmarkzellen nach erfolgter Makrophagendifferenzierung und funftägiger Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien. Spalte 1: Darstellung der Makrophagen-Solitärkulturen in Forward und Sideward Scatter (FCS bzw. SSC). Spalte 2: CD16 und CD11a Expression der über FSC/SSC vorselektierten Zellpopulation. Spalten 3/4: Histogrammauswertung der CD16 bzw. CD11a Expression durch die FSC/SSC-selektierte Zellpopulation. Zeile 1: $IMDM_{FCS}$, Zeile 2: $IMDM_{PIGS}$, Zeile 3: $DMEM_{FCS}$, Zeile 4: $DMEM_{PIGS}$

Da die generierten Makrophagen in den Folgeexperimenten für die Kokultur mit IPEC-J2-Epithelzellen verwendet werden sollten und letztere in DMEM kultiviert werden, wurde entschieden, die Makrophagenkultivierung für weitere Experimente nach abgeschlossener Differenzierung in DMEM vorzunehmen. In Folgeexperimenten wurden also die IPEC-J2 Epithelzellen und Makrophagen mit $DMEM_{PIGS}$ bzw. mit $DMEM_{FCS}$ kokultiviert.

5.1.2 Kokulturmodell

Zum Einsatz kamen initial zwei Varianten von Kontaktmodellen, jeweils mit $DMEM_{FCS}$ und $DMEM_{PIGS}$, bei denen die IPEC-J2-Zellen indirekten bzw. bedingt direkten Kontakt via der semipermeablen Membran zu den Makrophagen haben (Seite 25, Abbildung 1). Da bei den beiden Kontaktmodellen mit invers ausgesäten IPEC-J2-Zellen die Epithelzellen nicht oder erst verspätet konfluent wuchsen, wurde im weiteren Verlauf aufgrund besserer Reproduzierbarkeit der Daten die IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur gewählt.

5.1.3 Kultivierungsnährmediumwahl für die IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur

Die fünf Tage im IPEC-J2_{indirekt}-Kontaktmodell mit $DMEM_{FCS}$ bzw. $DMEM_{PIGS}$ kultivierten Makrophagen wurden mittels Durchflusszytometrie erneut auf makrophagentypische Oberflächenmarker untersucht, um mögliche Veränderungen der Expressionsraten nach Kokultivierung festzustellen. In $DMEM_{FCS}$ wurden die Oberflächenmarker CD172, CD163 und SLA II jeweils zu 45%, 41% und 44% exprimiert. Die eher unspezifischen Panmyeloid-Oberflächenmarker CD14, CD16 und CD11a wurden jeweils zu 43%, 70% und 74% exprimiert. Die mit $DMEM_{PIGS}$ kultivierten Makrophagen trugen zu 87% den Marker für CD172, zu 65% den für CD163 und zu 81% den Marker für SLA II. Bei den eher unspezifischen Panmyeloid-Oberflächenmarkern CD14, CD16 und CD11a wurden auf 86% der Zellen CD14, auf 86% CD16 und auf 89% CD11a exprimiert (Seite 44, Abbildung 6). Für eine bessere Übersicht, sind die Ergebnisse in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Darstellung der Expressionsraten verschiedener Oberflächenmarker.

Expressionsraten in % bei der IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur

Konditionen	CD172	CD163	CD14	CD16	CD11a	SLA II
$DMEM_{FCS}$ /indirekt	45	41	43	70	74	44
$DMEM_{PIGS}$ /indirekt	87	65	86	86	89	81

Die bereits früher gezeigten Vorteile von DMEM_{PIGS} für die IPEC-J2 Solitärkultur, die durch dessen Verwendung hinsichtlich morphologischer und funktioneller Aspekte eher denen des Schweinedarmepithels entspricht als unter Kultivierung mit DMEM_{FCS} (Zakrzewski et al., 2013), zeigte sich ebenfalls für die Kokultivierung als vorteilhaft. Die Makrophagen, die unter DMEM_{PIGS} kokultiviert wurden, zeigten höhere Expressionsraten für Oberflächenmarker, die typischerweise auf Makrophagen vorkommen (CD172, CD163 und SLA II), als Makrophagen, die unter DMEM_{FCS} kultiviert wurden. Als Zellkulturmedium für die IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur wurde daher DMEM_{PIGS} gewählt.

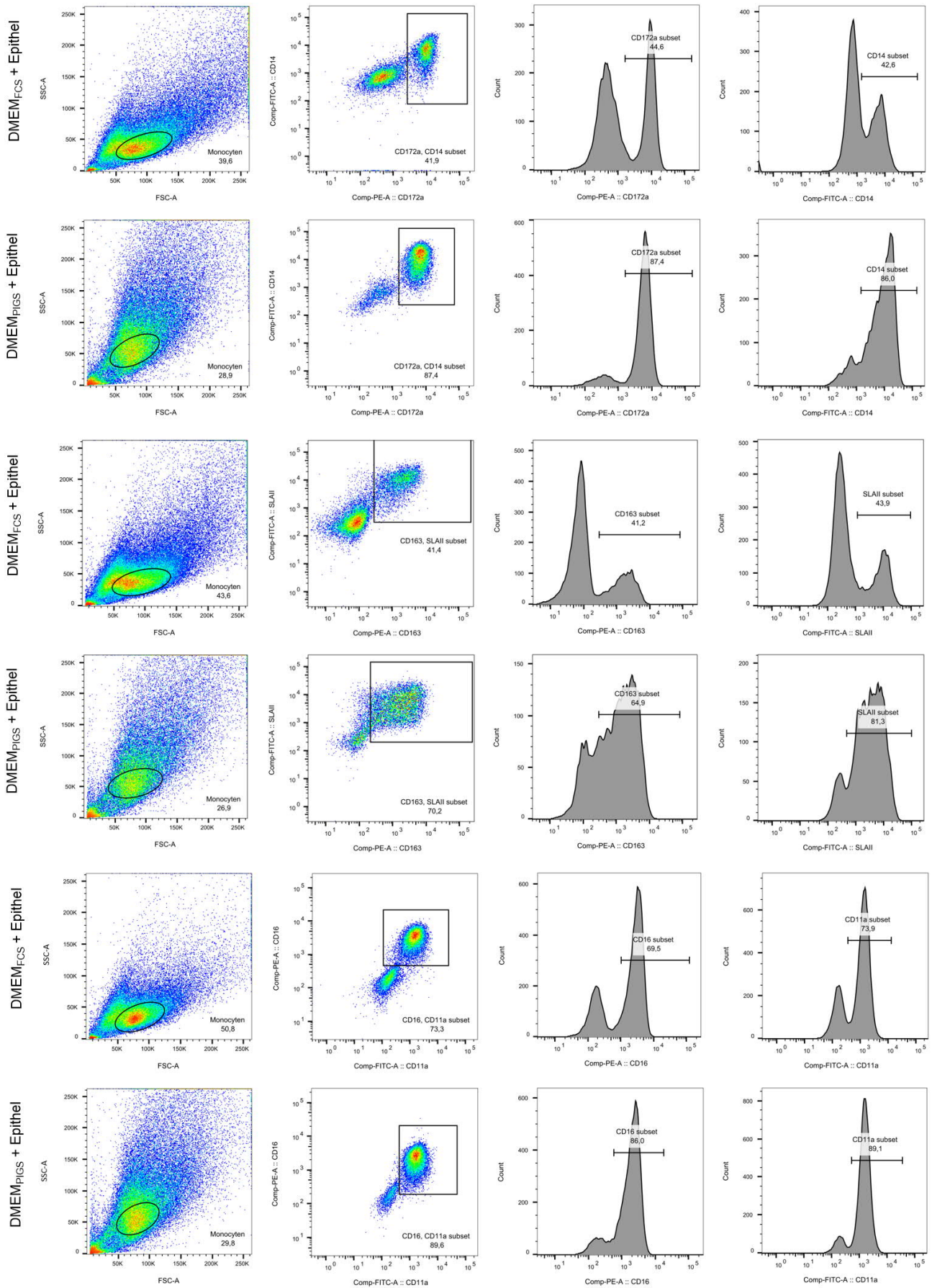


Abbildung 6: FACS-Analyse von lebenden Makrophagen der IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur mit verschiedenen Oberflächenmarkern. Spalte 1: Darstellung lebender kokultivierter Makrophagen in Forward und Sidewards Scatter, Spalte 2: Darstellung vorselektierter Zellpopulationen, Spalte 3:

Histogramm der Zellpopulation mit PE-markierten Antikörpern, Spalte 4: Histogramm der Zellpopulation mit FITC-markierten Antikörpern, Zeile 1: DMEM_{FCS}, CD172 (PE) und CD14 (FITC), Zeile 2: DMEM_{PICS}, CD172 (PE) und CD14 (FITC), Zeile 3: DMEM_{FCS}, CD163 (PE) und SLA II (FITC), Zeile 4: DMEM_{PICS}, CD163 (PE) und SLA II (FITC), Zeile 5: DMEM_{FCS}, CD16 (PE) und CD11a (FITC), Zeile 6: DMEM_{PICS}, CD16 (PE) und CD11a (FITC)

5.2 *Salmonella* Typhimurium-Infektion von Solitär- und Kokultur

Um den Einfluss von Makrophagen auf die Epithelintegrität bei einer Infektion zu untersuchen, wurden die IPEC-J2 Solitär- und IPEC-J2_{indirekt}-Makrophagen-Kokulturen mit dem Wildtypstamm von *Salmonella* Typhimurium infiziert (schematische Darstellung: Abbildung 7). Fünf Stunden nach Infektion zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich des Epithelwiderstands. Dabei fiel der TER der infizierten IPEC-J2 Solitärkultur ($148 \pm 8 \Omega \times \text{cm}^2$, n=41) im Vergleich zur Solitärkultur-Kontrolle ($341 \pm 60 \Omega \times \text{cm}^2$, n=29) ab ($p < 0,0001$) (Seite 46, Abbildung 8 links). Bei der infizierten IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur ($110 \pm 7 \Omega \times \text{cm}^2$, n=34) zeigte sich, bezogen auf die Kokultur-Kontrolle ($307 \pm 37 \Omega \times \text{cm}^2$, n=29), ebenfalls ein deutlicher Abfall des TERs ($p < 0,0001$) (Seite 46, Abbildung 8 links). Zudem zeigte sich ein Unterschied zwischen der infizierten Solitärkultur und der infizierten Kokultur ($p < 0,05$). Um festzustellen, ob der TER-Abfall durch eine Zunahme des parazellulären Fluxes zustande kam, wurde der parazelluläre Fluorescein-Flux bestimmt. Nur die infizierte IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur ($2,14 \pm 0,57 \text{ nmol/h/cm}^2$, n=4) wies eine Erhöhung des Fluorescein-Fluxes, verglichen mit der Kokultur-Kontrolle ($0,21 \pm 0,02 \text{ nmol/h/cm}^2$, n=4, $p < 0,01$), auf. Bei der infizierten Solitärkultur ($0,60 \pm 0,14 \text{ nmol/h/cm}^2$, n=4) war der Fluorescein-Flux, im Vergleich zur Solitärkultur-Kontrolle ($0,25 \pm 0,02 \text{ nmol/h/cm}^2$, n=4), nicht signifikant verschieden (Seite 46, Abbildung 8 rechts).

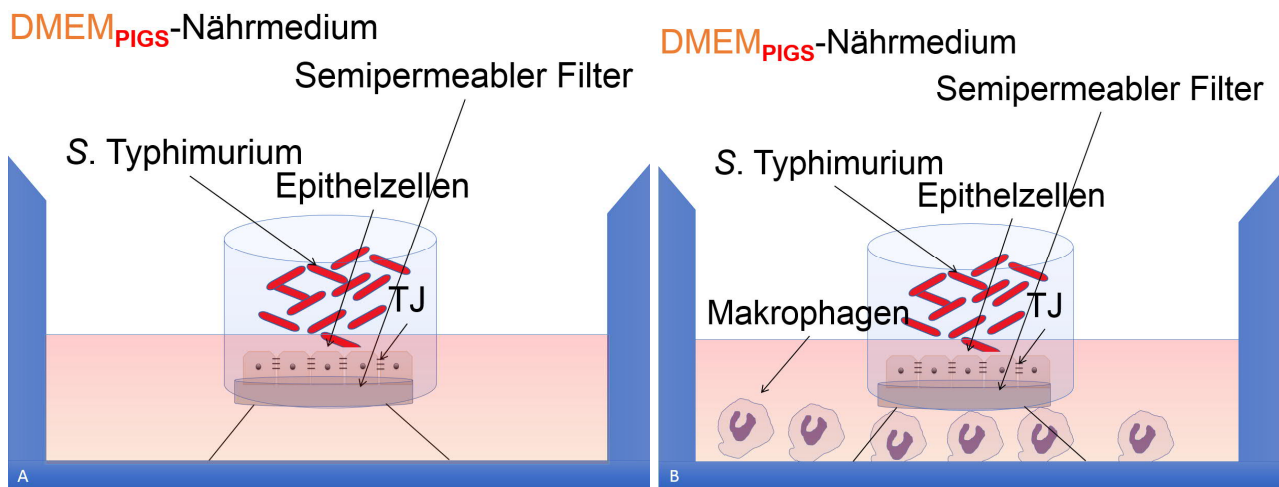


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Infektionsmodells für die IPEC-J2-Solitär und IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur: A) Infektionsmodell der IPEC-J2-Solitärkultur, B) Infektionsmodell der IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur.

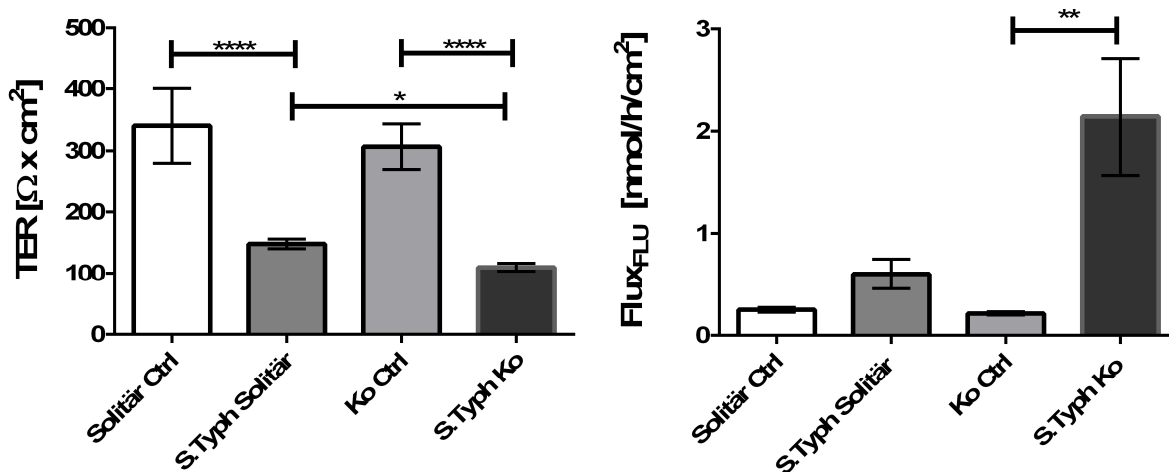


Abbildung 8: Darstellung der Barriereeigenschaften nach *Salmonella Typhimurium*-Wildtyp-Infektion. Links: Darstellung des TERs 5 h postinfektiös bei Solitär- bzw. Kokultur, rechts: Darstellung des parazellulären Fluorescein-Fluxes 5 h postinfektiös bei Solitär- bzw. Kokultur, Solitär Ctrl = Solitärkultur-Kontrolle, Ko Ctrl = Kokultur-Kontrolle, S. Typh Solitär /Ko = mit *Salmonella Typhimurium* infizierte Solitär- bzw. Kokultur. Gezeigt sind MW \pm SEM.

Um zu überprüfen, ob der verstärkte Widerstandsabfall in der Kokultur durch die von den Makrophagen sezernierten Interleukine zustande kommen könnte, wurden die postinfektiös gewonnenen Überstände der Solitär- und Kokultur untersucht, also das Medium des basolateralen Kompartiments, welches die Makrophagen jedoch selbst keine Salmonellen enthielt. Dabei wurden die proinflammatorischen Interleukine 6, 12 und TNF- α (pIL-6, pIL-12, pTNF- α) sowie das durch unter anderem durch TNF- α induzierte antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 (pIL-10) untersucht.

Interleukin-6 (Seite 47, Abbildung 9, oben links) konnte lediglich in der infizierten Kokultur ($3,3 \pm 1,2$ pg/ml, n=7) nachgewiesen werden, womit sie sich sowohl von der infizierten Solitärkultur (0 ± 0 pg/ml, n=7, $p < 0,01$) als auch von der entsprechenden Kontrolle (0 ± 0 pg/ml, n=6, $p < 0,01$) unterschied. Beim TNF- α zeigte der Überstand der infizierten Solitärkultur ($21,2 \pm 4,9$ pg/ml, n=7) signifikant niedrigere Werte als der Überstand der entsprechenden infizierten Kokultur (3662 ± 875 pg/ml, n=7, $p < 0,05$). Die Kokultur-Kontrolle (875 ± 558 pg/ml, n=6) unterschied sich weder signifikant von der Solitärkultur-Kontrolle ($12,7 \pm 5,2$ pg/ml, n=6) noch von der infizierten Kokultur. (Seite 47, Abbildung 9, oben rechts). Das antiinflammatorische Interleukin-10 (Seite 47, Abbildung 9, unten links) konnte nur in den Kokulturen nachgewiesen werden und wies einen Unterschied zwischen der infizierten Solitärkultur (0 ± 0 pg/ml, n=7) und der infizierten Kokultur ($92,6 \pm 33,8$ pg/ml, n=7, $p < 0,01$) auf. Der Unterschied zwischen Kokultur-Kontrolle ($20,6 \pm 12,2$ pg/ml, n=6) und infizierter Kokultur war nicht signifikant (Seite 47, Abbildung 9 unten links). Ein signifikanter Unter-

schied bei der IL-12-Sekretion (Solitär-Kontrolle ($32,7 \pm 8,2$ pg/ml, n=6), infizierte Solitärkultur ($45,3 \pm 8,9$ pg/ml, n=7), Kokultur-Kontrolle ($34,7 \pm 8,7$ pg/ml, n=6), infizierte Kokultur ($36,9 \pm 8,1$ pg/ml, n=7)) zwischen den einzelnen Konditionen konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 9, unten rechts).

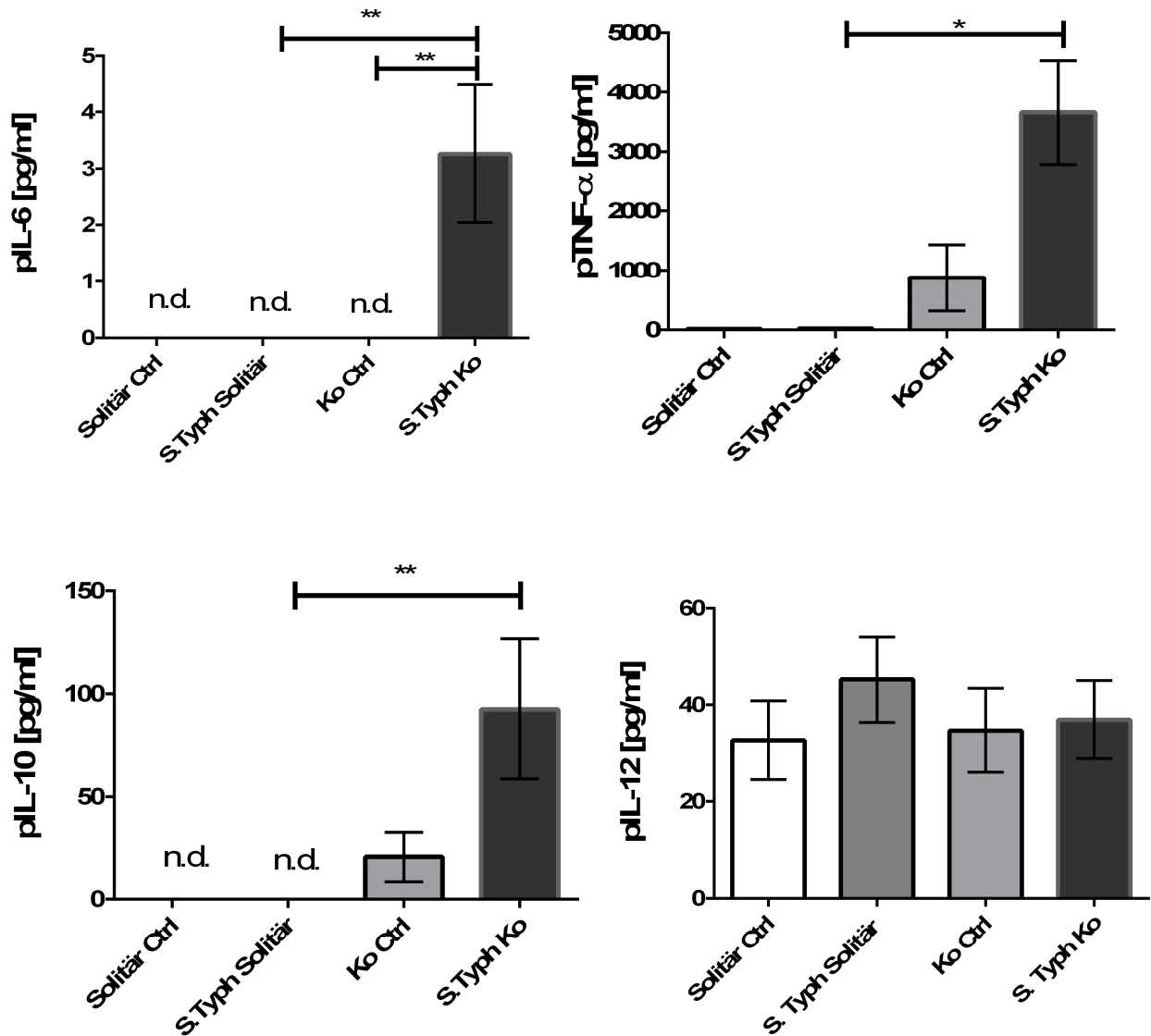


Abbildung 9: Darstellung der postinfektiösen porcinen Zytokinexpression in Solitär- und Kokulturen. Oben links: pIL-6 = porcines Interleukin-6, oben rechts: pTNF- α = porciner Tumornekrosefaktor α , unten links: pIL-10 = porcines Interleukin-10, unten rechts: pIL-12 = porcines Interleukin-12, Solitär Ctrl = Solitärkultur-Kontrolle, Ko Ctrl = Kokultur-Kontrolle, Solitär/Ko S. Typh. = mit *Salmonella* Typhimurium infizierte Solitär- bzw. Kokulturen. Gezeigt sind MW \pm SEM.

Für mehrere TJ-Proteine sind bereits Lokalisationsveränderungen durch eine *S. Typhimurium*-Infektion gezeigt worden. In einer Arbeit an Hühnern wurde allerdings nur eine veränderte Claudin-4-mRNA-Expression beschrieben. Es wurde deshalb die Hypothese überprüft, ob dies auch zu einer Lokalisationsveränderung von Claudin-4 führt. Da der Barriereverlust durch *Salmonella*-Infektion in der IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur stärker als in der IPEC-J2

Solitärkultur war, wurde der Focus sowohl auf die IPEC-J2 Solitär- als auch auf die IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur gelegt.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich sowohl in der Solitär- (Abbildung 10A) als auch in der Kokultur (Abbildung 10C) ein intaktes Claudin-4 Netz. In den infizierten Proben der Solitär- (Abbildung 10B) und Kokultur (Abbildung 10D) zeigte sich dagegen bereichsweise eine beeinträchtigte Claudin-4-Verteilung. Dieser Effekt war in der Kokultur (Abbildung 10D) stärker als in der Solitärkultur (Abbildung 10B) ausgeprägt.

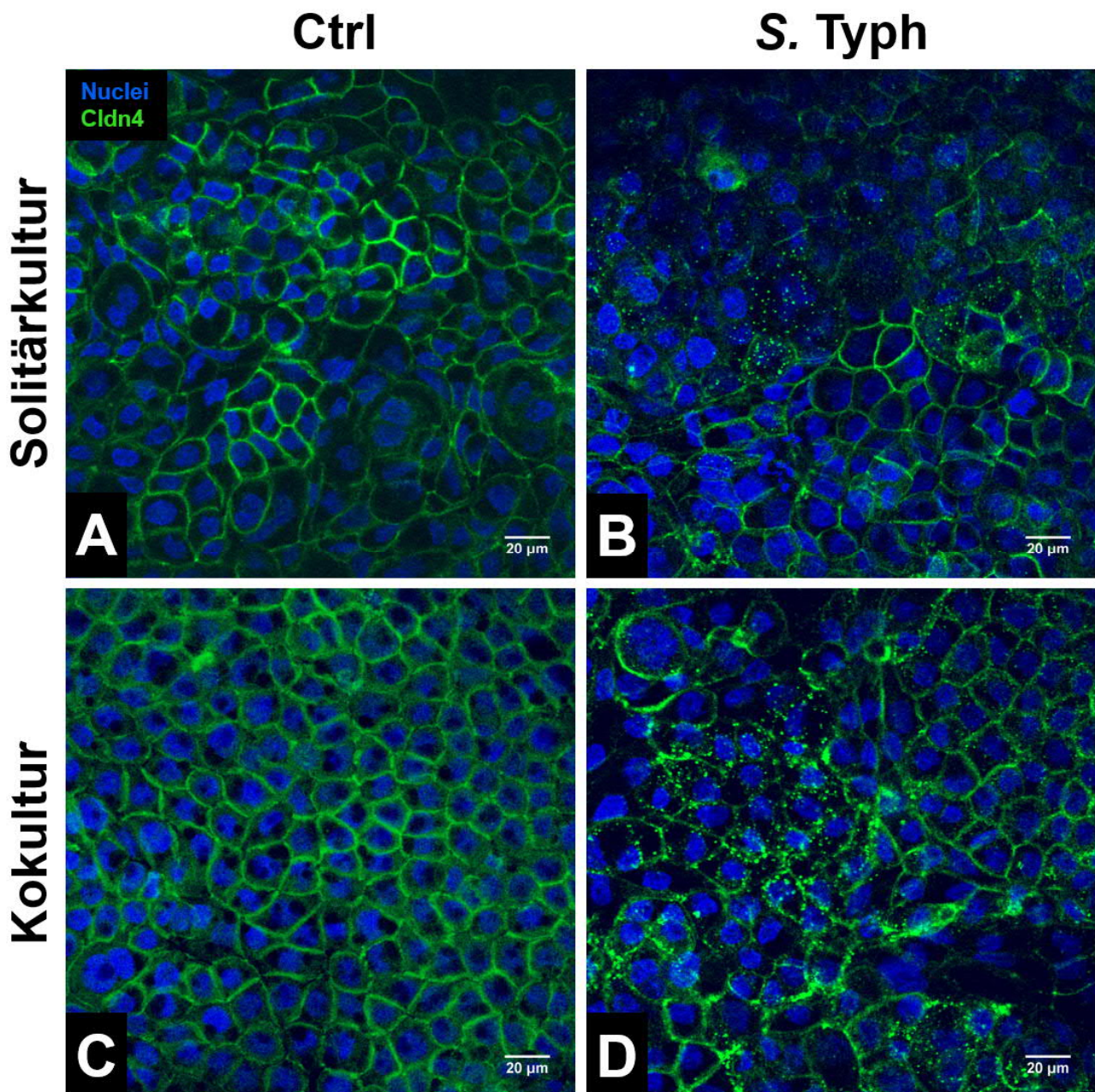


Abbildung 10: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-4 in Solitär- und Kokultur. Claudin-4 (grün), Nuclei (blau), Ctrl = Kontrolle, S. Typh. = *Salmonella* Typhimurium-infiziert

5.2.1 Vermittlung des Barrieredefekts durch *Salmonella* Typhimurium

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, den durch den *Salmonella* Typhimurium Wildtyp beobachteten Barrieredefekt zu hemmen, um Rückschlüsse auf den Pathomechanismus ziehen zu können. Hierfür wurde untersucht, inwiefern unterschiedliche Komponenten und Funktionen des Bakteriums auf die IPEC-J2 Zelllinie einwirken.

Untersucht wurden zwei gentechnisch veränderte *Salmonella* Typhimurium-Stämme: Einem Stamm fehlte die Pathogenitätsinsel SPI1 (*S. Typh.* Δ SPI1), welche für die Invasion der Salmonellen verantwortlich ist, dem anderen Stamm fehlte die Pathogenitätsinsel SPI2 (*S. Typh.* Δ SPI2), die für die intrazelluläre Proliferation der Bakterien verantwortlich ist. Außerdem wurde der Überstand sowie ein hitzeinaktivierter Wildtyp untersucht. Während die Δ SPI1-Mutante ($447 \pm 160 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=9$), der Wildtypüberstand ($367 \pm 102 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=8$) sowie der hitzeinaktivierte Wildtypstamm ($419 \pm 100 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=8$) keinen Unterschied zur nicht infizierten Solitärkultur aufwiesen, zeigte die Δ SPI2-Mutante ($101 \pm 14 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=17$) einen Abfall des TERs, verglichen mit der Solitärkultur-Kontrolle ($284 \pm 43 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=19$, $p < 0,001$) (Abbildung 11, links).

Fluorescein-Fluxmessungen an den mit den verschiedenen *Salmonella* Typhimurium-Varianten infizierten Solitärkulturen ergaben einen TER-konkordanten Datensatz. Während die Δ SPI2-Mutante ($5,26 \pm 0,36 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$, $p < 0,05$) einen Anstieg des Fluorescein-Fluxes im Vergleich zur Kontrolle ($0,31 \pm 0,01 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$) zeigte, wiesen die Δ SPI1-Mutante ($3,01 \pm 0,17 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$), der hitzeinaktivierte Wildtypstamm ($0,24 \pm 0,03 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$) und der Wildtypüberstand ($0,30 \pm 0,05 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$) keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf (Abbildung 11, rechts).

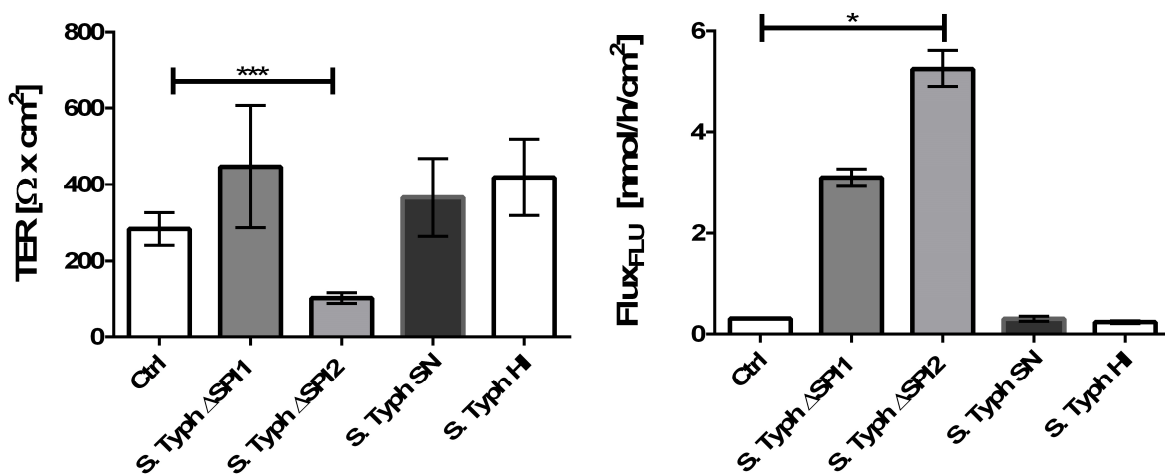


Abbildung 11: Darstellung der Barriereeigenschaften nach Infektion mit *Salmonella* Typhimurium-Varianten. Links: Darstellung des TERs 5 h postinfektios durch verschiedene *Salmonella* Typhimurium-Varianten in Solitärkultur. Rechts: Fluorescein-Flux 5 h postinfektios durch verschiedene *Salmonella* Typhimurium-Varianten in Solitärkultur. Ctrl = Solitärkultur-Kontrolle, *S. Typh.* Δ SPI1 =

Knockout des Invasionslocus von *Salmonella* Typhimurium, *S. Typh.* Δ SPI2 = Knockout des Proliferationslocus von *Salmonella* Typhimurium, *S. Typh.* SN = Überstand des *Salmonella* Typhimurium-Wildtyps, *S. Typh.* HI = hitzeinaktivierter *Salmonella* Typhimurium-Wildtypstamm. Gezeigt sind MW \pm SEM.

5.3 Hemmung des durch *Salmonella* Typhimurium vermittelten Barriere-defekts

5.3.1 Hemmung durch Pralnacasan

Voraussetzung für den beobachteten Barriereverlust durch *Salmonella* Typhimurium-Infektion in IPEC-J2-Zellen ist die Invasionsfähigkeit der Bakterien. Die intrazelluläre Wahrnehmung von Bakterien durch Epithelzellen wird über NOD-like Rezeptoren vermittelt, die bei ihrer Aktivierung über einen Proteinkomplex, das Inflammasom, zur Aktivierung von Caspase-1 führen. Die aktivierte Caspase-1 ist dann in der Lage, Vorläuferzytokine (IL-18, IL-1 β) in ihre aktive Form zu überführen, welche eine Entzündung unterhalten bzw. über nachgeschaltete Kaskaden bis zum Zelltod führen können. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Abfall des TERs und die Erhöhung des Fluorescein-Fluxes über diese Kaskade vermittelt werden, wurde ein Caspase-1-Inhibitor, Pralnacasan, in aufsteigenden Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M eingesetzt.

Verglichen mit der DMSO-Kontrolle (**10 μ M**: 257 ± 15 n=6; **100 μ M**: 279 ± 22 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6) fiel der TER der infizierten DMSO-Gruppe ab (**10 μ M**: 163 ± 26 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6; $p < 0,01$; **100 μ M**: 148 ± 8 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6, $p < 0,0001$). Während der TER der Pralnacasan-Kontrolle (**10 μ M**: 239 ± 17 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6, **100 μ M**: 243 ± 15 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6) keinen Unterschied zu dem der DMSO-Kontrolle aufwies, fiel der TER der infizierten Pralnacasan-Gruppe (**10 μ M**: 137 ± 9 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6, $p < 0,01$; **100 μ M**: 148 ± 9 $\Omega \times \text{cm}^2$, n=6, $p < 0,001$) im Vergleich zur Pralnacasan-Kontrolle ab (Seite 51, Abbildung 12, links und rechts). Ein Unterschied zwischen den infizierten Proben bestand nicht.

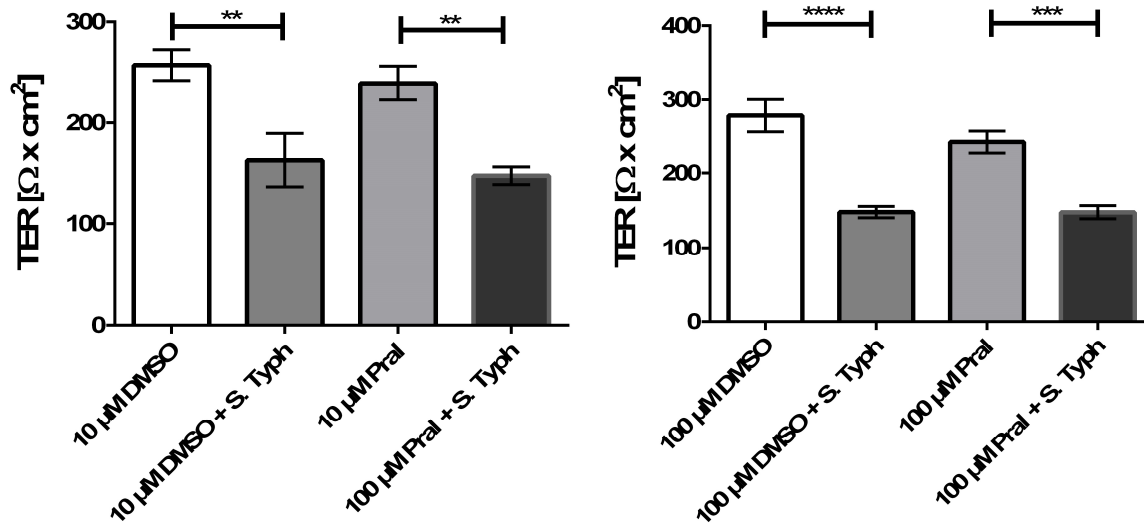


Abbildung 12: Darstellung eines Pralnacasan-Effekts für den TER nach *Salmonella Typhimurium*-Infektion in IPEC-J2-Zellen. Links: 10 μM Pralnacasan, rechts: 100 μM Pralnacasan. DMSO = DMSO-behandelt, DMSO + *S. Typh.* = DMSO-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert, Pral = Pralnacasan-behandelt. Pral + *S. Typh.* = Pralnacasan-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert. Gezeigt sind MW ± SEM.

Um der Frage nachzugehen, ob Pralnacasan humanspezifisch wirkt, wurde es in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2bbe getestet, die ebenfalls mit *Salmonella Typhimurium* infiziert wurde. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle (**10 μM**: 398 ± 51 Ωxcm², n=8; **100 μM**: 404 ± 37 Ωxcm², n=16) fiel der TER der infizierten DMSO-Gruppe ab (**10 μM**: 130 ± 28 Ωxcm², n=8, p<0,01; **100 μM**: 107 ± 10 Ωxcm², n=16, p<0,0001). Während der TER der Pralnacasan-Kontrolle (**10 μM**: 399 ± 36 Ωxcm², n=8, **100 μM**: 410 ± 36 Ωxcm², n=16) keinen Unterschied zu dem der DMSO-Kontrolle aufwies, fiel der TER der infizierten Pralnacasan-Gruppe zwar in beiden Konzentrationsgruppen ab (**10 μM**: 140 ± 14 Ωxcm², n=16, p<0,01, **100 μM**: 249 ± 26 Ωxcm², n=16, p<0,001), die infizierte 100 μM Pralnacasan-Gruppe (249 ± 26 Ωxcm², n=16) zeigte jedoch einen signifikant geringeren TER-Abfall im Vergleich zur infizierten 100 μM DMSO-Gruppe (107 ± 10 Ωxcm², n=16), p<0,01) (Seite 52, Abbildung 13 links und rechts).

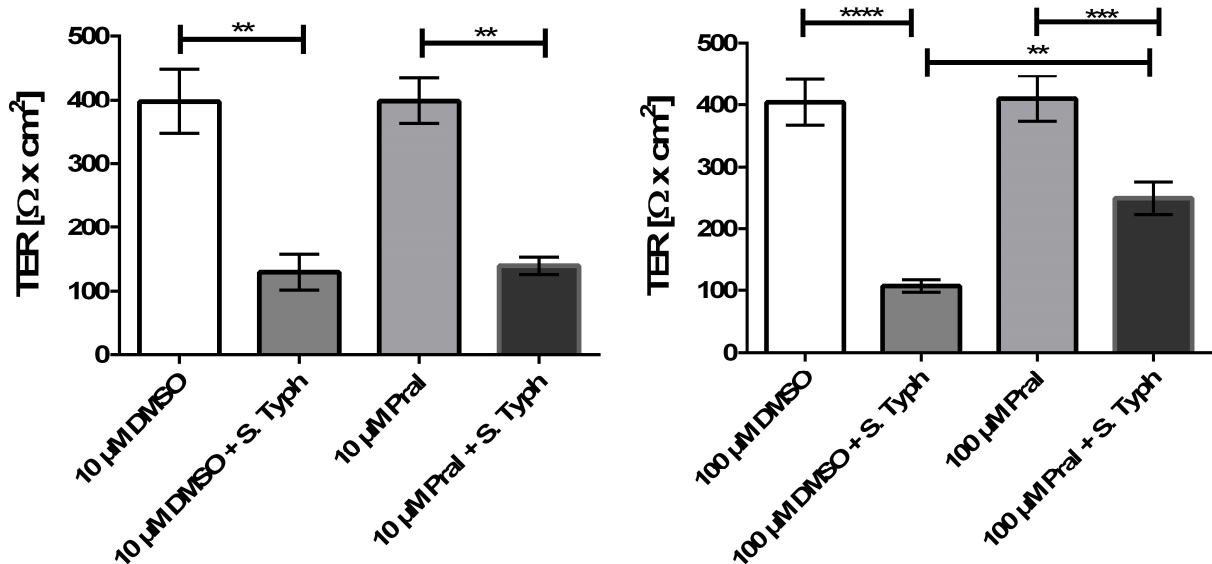


Abbildung 13: Darstellung eines Pralnacasan-Effekts für den TER nach *Salmonella Typhimurium*-Infektion in Caco-2bbe-Zellen. Links: 10 μM Pralnacasan, rechts: 100 μM Pralnacasan, DMSO = DMSO-behandelt, DMSO + S. Typh. = DMSO-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert, Pral = Pralnacasan-behandelt. Pral + S. Typh. = Pralnacasan-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert. Gezeigt sind MW ± SEM.

Für die infizierte 100 μM Pralnacasan-Gruppe ($0,30 \pm 0,10$ nmol/h/cm², n=8) konnte gezeigt werden, dass auch der Fluorescein-Flux zur Pralnacasan-Kontrolle ($0,05 \pm 0,02$ nmol/h/cm², n=8) nicht verschieden ist. Die infizierte DMSO-Gruppe ($0,75 \pm 0,11$ nmol/h/cm², n=8) wies dagegen einen erhöhten Fluorescein-Flux, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, auf (p<0,01). Die DMSO-Kontrolle ($0,17 \pm 0,14$ nmol/h/cm², n=8) wies ebenfalls keinen Unterschied zur 100 μM Pralnacasan-Kontrolle auf (Abbildung 14).

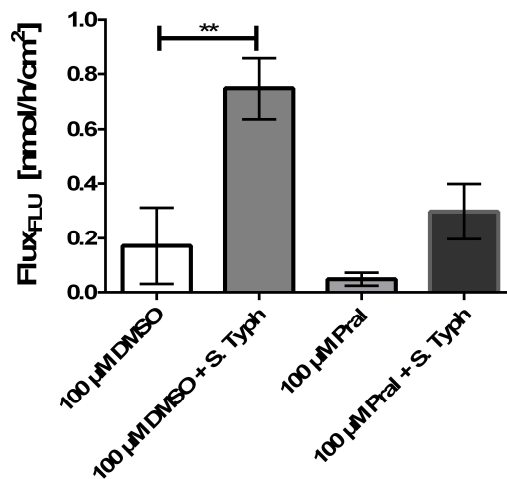


Abbildung 14: Darstellung des Pralnacasan-Effekts (100 μM) auf den Fluorescein-Flux nach *Salmonella Typhimurium*-Infektion in Caco-2bbe-Zellen. DMSO = DMSO-behandelt, DMSO + S. Typh. = DMSO-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert, Pral = Pralnacasan-behandelt. Pral + S. Typh. = Pralnacasan-behandelt und *Salmonella Typhimurium*-infiziert. Gezeigt sind MW ± SEM.

5.3.2 Hemmung durch Quercetin

Da mittels Pralnacasan eine Hemmung des TER-Abfalls in der IPEC-J2 Zelllinie nicht möglich war, wurde nach alternativen Möglichkeiten gesucht, diesen zu hemmen. Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass der *Salmonella*-bedingte TER-Abfall parazellulär vermittelt wird. Für Quercetin, ein Polyphenol, konnte gezeigt, dass es in der Caco-2bbe-Zelllinie in der Lage ist, Claudin-4 hochzuregulieren und somit den parazellulären Weg abzudichten (Amasheh et al., 2008). Während die *Salmonella* Typhimurium-infizierte Gruppe ($155 \pm 39 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=13$), verglichen mit der DMSO-Kontrolle ($669 \pm 181 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=8$), einen Widerstandsabfall verursachte ($p < 0,01$), konnte dieser Effekt durch die Vorbehandlung mit Quercetin ($510 \pm 178 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=9$) aufgehoben werden, wobei die Quercetin-Kontrolle ($441 \pm 93 \Omega \times \text{cm}^2$, $n=7$) nicht verschieden zur DMSO-Kontrolle war (Abbildung 15 links). Zwischen der Quercetin-Kontrolle und der infizierten mit Quercetin vorbehandelten Probe war ebenfalls kein Unterschied zu beobachten. Um zu überprüfen, ob der parazelluläre Weg durch Quercetin in der IPEC-J2 Zelllinie abgedichtet wird, wurde der Fluorescein-Flux bestimmt. Die mit dem *Salmonella*-Wildtyp infizierten Proben ($4,45 \pm 0,91 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=9$) zeigten einen Anstieg des Fluorescein-Fluxes ($p < 0,05$), verglichen mit der DMSO-Kontrolle ($0,22 \pm 0,05 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=4$). Die mit dem Wildtyp infizierten mit Quercetin vorbehandelten Proben ($0,76 \pm 0,20 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=5$) zeigten keinen unterschiedlichen Fluorescein-Flux, verglichen mit der Quercetin-Kontrolle. Die Quercetin-Kontrolle ($0,20 \pm 0,04 \text{ nmol/h/cm}^2$, $n=5$) wies keinen Unterschied zur DMSO-Kontrolle auf (Abbildung 15 rechts).

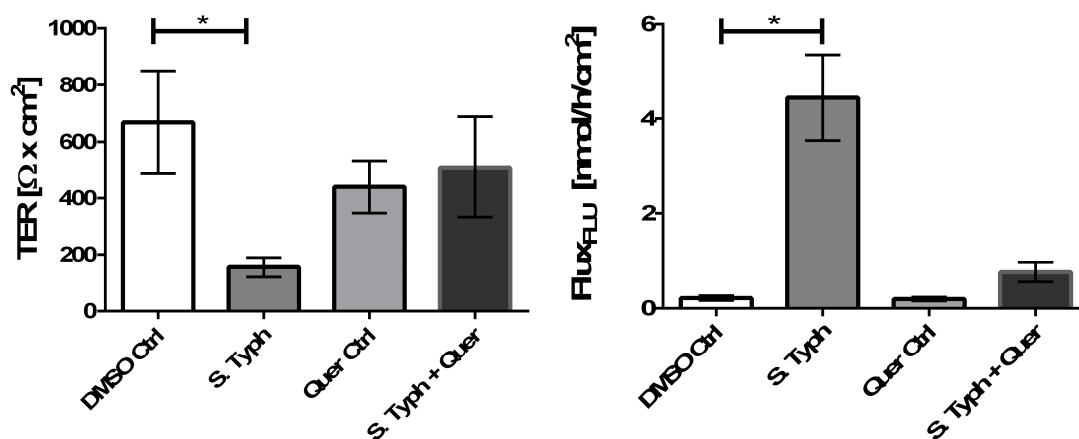


Abbildung 15: Darstellung der Barriereigenschaften nach Vorbehandlung mit Quercetin und Infektion mit *Salmonella* Typhimurium Links: TER, rechts: Fluorescein-Flux; DMSO Ctrl = DMSO-Kontrolle, S. Typh. = *Salmonella* Typhimurium-infiziert, Quer + S. Typh. = Quercetin-vorbehandelt und *Salmonella* Typhimurium-infiziert, Quer Ctrl = Quercetin-Kontrolle. Gezeigt sind MW \pm SEM.

Da gezeigt werden konnte, dass Quercetin in der Lage war, die funktionelle Barrierestörung der *Salmonella* Typhimurium-Infektion zu hemmen, wurde nun das molekulare Korrelat Claudin-4 untersucht. Um zu überprüfen, ob der durch Quercetin beobachtete barriestabilisierende Effekt in den mit *Salmonella* Typhimurium infizierten Proben durch eine Claudin-4-Hochregulation oder -Umverteilung zustande kam, wurde die Quantität von Claudin-4 in der IPEC-J2 Solitärkultur untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression des Claudin-4 sowohl unter *Salmonella* Typhimurium-Infektion ($100 \pm 8\%$, $n=3$) als auch in der mit Quercetin vorbehandelten infizierten Probe ($85 \pm 18\%$, $n=3$) unverändert zur DMSO-Kontrolle ($100 \pm 0\%$, $n=3$) bzw. im Vergleich zu Quercetin-Kontrolle war. Die Quercetin-Kontrolle ($106 \pm 16\%$, $n=3$) wies ebenfalls keinen Unterschied zur DMSO-Kontrolle auf (Abbildung 16). Dies bedeutet, dass die in Caco-2 Zellen beobachtete Claudin-4-Hochregulation nach Applikation von Quercetin bei IPEC-J2-Zellen nicht zu beobachten war.

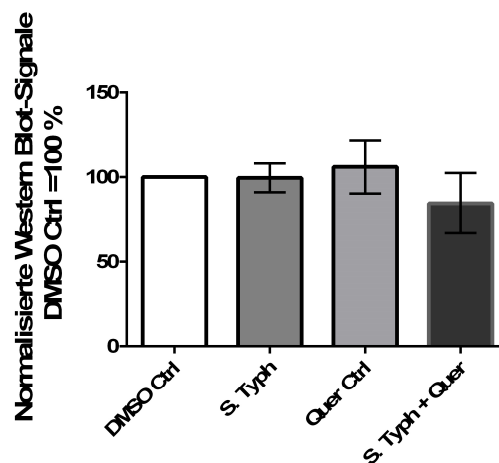


Abbildung 16: Quantitative Darstellung von Claudin-4-Western Blot-Signalen in Solitär-Kultur nach *Salmonella* Typhimurium-Infektion. DMSO Ctrl = DMSO-Kontrolle, S. Typh. = *Salmonella* Typhimurium-infiziert, Quer + S. Typh. = Quercetin-vorbehandelt und *Salmonella* Typhimurium-infiziert, Quer Ctrl = Quercetin-Kontrolle. Gezeigt sind MW \pm SEM.

6. Diskussion

6.1 Oberflächenmarker differenzierter Pig-Bone-Marrow-Zellen

Mit einer einwöchigen Kultivierung mittels Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, synonym colony-stimulating factor 1 (CSF1)) können sowohl aus Monozyten aus Schweineblut als auch aus nativem Schweinknochenmark Zellen gewonnen werden, die phänotypisch und in Bezug auf ihre Phagozytoseaktivität denen von Makrophagen entsprechen. Diese Zellen weisen typische Oberflächenmarker wie den Fcγ-Rezeptor oder den LPS-Ko-Rezeptor CD14 und den Panmyeloidmarker CD172 auf (Mayer, 1983; Genovesi et al., 1989; Kapetanovic et al., 2012). Ein großer Vorteil der Makrophagengewinnung aus Knochenmark, besteht in der großen Zellausbeute, die aus einem einzigen Tier gewonnen werden kann (Kapetanovic et al., 2012). Somit hilft dies, dazu beizutragen, den Tierverbrauch in der Forschung zu reduzieren, welches dem zweiten Punkt des erstmals 1959 von Russell und Burch postulierten Konzepts: „*Replacement, Reduction and Refinement*“ entspricht (Tannenbaum and Bennett, 2015). Ein weiterer Vorteil der sich hierbei ergibt besteht darin, dass so auch mehrere Experimente mit Makrophagen desselben Tieres möglich sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten differenzierten PBM-Zellen wiesen unter Verwendung aller getesteter Kultivierungsmedien Zellen auf, die mittels FACS-Analyse anhand ihrer Größe und Granularität sowie der Oberflächenmarkerexpression Monozyten bzw. Makrophagen zugeordnet werden konnten. (Piriou-Guzylack and Salmon, 2008; Ezquerra et al., 2009; Dawson and Lunney, 2018). Da einzelne Oberflächenmarker in der Regel auf verschiedenen Zellpopulationen vorzufinden sind und myeloide Vorläuferzellen des Knochenmarks sich zu zahlreichen anderen Leukozyten, u.a. dendritische Zellen, Granulozyten und Monozyten, differenzieren können, ist eine Betrachtung der exprimierten Oberflächenmarker in bestimmten Kombinationen entscheidend. Für Schweinemakrophagen gibt es mehrere postulierte Kombinationen von Oberflächenmarkern. Zum einen wird ein CD163⁺/CD14^{low}/CD203a (SWC9⁺)-Phänotyp beschrieben (Chamorro et al., 2000). Eine weitere Arbeit zeigt, dass Zellen mit CD163⁺/CD14^{low}/SLA II^{high}, die zudem CD16⁺, CD11⁺ und SWC1^{low} exprimieren, phänotypische Eigenschaften von Makrophagen besitzen (Sanchez et al., 1999). Auch die Kombination CD163⁺/CD16⁺/CD172⁺ wird für Schweinemakrophagen beschrieben (Fairbairn et al., 2011). CD163, ein Scavenger-Rezeptor, kommt hierbei eine Sonderstellung zu, da seine Expressionsdichte zufolge der meisten Arbeiten während der Ausdifferenzierung von Gewebemakrophagen aus Monozyten zunimmt. Knochenmarkzellen dagegen exprimieren diesen Marker nicht (Sanchez et al., 1999). CD163 kommt zwar ebenfalls auf dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen vor,

wird jedoch auf Monozyten (Bullido et al., 1997) und dendritischen Zellen (Chamorro et al., 2004) nur in geringem Umfang exprimiert. Letztere haben zudem nur eine geringe Expressionsrate von CD16 (Chamorro et al., 2004). Granulozyten besitzen zwar den Panmyeloidmarker CD172 und CD11a, jedoch weisen sie keine SLA II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche auf (Magyar et al., 1995). Des Weiteren lassen sie sich aufgrund ihrer hohen Granularität im FACS im Sidewards Scatter anhand ihrer höheren Streuung von Monozyten/Makrophagen unterscheiden. Aus der Zusammenschau der Studien ergibt sich für Schweinemakrophagen somit ein $CD163^+/CD16^+/CD14^{Low}/SLAII^{high}/CD172^+/CD11a^+$ -Phänotyp. Wie anfangs angeführt konnten in dieser Arbeit unter Verwendung aller Kultivierungsmedien Zellen entsprechender Größe und Granularität detektiert und entsprechende Oberflächenmarker nachgewiesen werden, die auf Makrophagen exprimiert werden. Den beschriebenen CD-Phänotyp für Schweinemakrophagen ($CD163^+/CD16^+/CD14^{Low}/SLAII^{high}/CD172^+/CD11a^+$) zeigten jedoch vor allem PBM-Zellen, die in $IMDM_{FCS}$ kultiviert wurden, weshalb es auch als Differenzierungsmedium für alle Folgeexperimente beibehalten wurde. Wollte man ausschließlich Untersuchungen an Makrophagen-Solitärkulturen durchführen, wäre sicherlich die Verwendung von $IMDM_{FCS}$ optimal. Ist indessen eine Kultivierung mit $DMEM$ wünschenswert, stellt $DMEM_{PIGS}$, verglichen mit $DMEM_{FCS}$, die bessere Alternative dar, da es unter $DMEM_{PIGS}$ ebenfalls zu relativ hohen Expressionsraten der für Schweinemakrophagen typischen Oberflächenmoleküle CD163, CD16 und SLA II kommt, auch wenn im gleichen Zuge auch eine vermehrte Expression der unspezifischen Marker CD11a und CD14 unter $DMEM_{PIGS}$ Kultivierung zu beobachten war. Mit den hier analysierten FACS-Daten konnte gezeigt werden, dass eine Differenzierung von PBM-Zellen zu Makrophagen durch eine einwöchige Kultivierung unter Verwendung von $IMDM_{FCS}$ möglich ist und, dass eine anschließende Kultivierung mit $IMDM_{FCS}$ Zellen hervorbringt, die mit ihrem CD-Phänotyp ($CD163^+/CD16^+/CD14^{Low}/SLAII^{high}/CD172^+/CD11a^+$) Schweinemakrophagen entsprechen. Zudem wiesen auch Makrophagen, die mit $DMEM_{PIGS}$ kultiviert wurden relativ hohe Expressionsraten makrophagentypischer Zelloberflächenmoleküle auf, weshalb es sich als alternatives Medium ebenfalls zur Kultivierung eignet.

6.2 Die IPEC-J2 Zelllinie: ein geeignetes *in vitro*-Modell

Der Großteil in der Forschung verwendeter Darmzelllinien (Caco-2, HT-29, T84) stammt aus dem Colon und geht auf transformierte Turmozellen zurück. Auch wenn für viele dieser Zellen gezeigt werden konnte, dass sie Eigenschaften von differenzierten Epithelzellen aufweisen, können mit ihrem onkogenen Ursprung auch Veränderung im Bereich der Glykokalyx, Proteinexpression sowie Zytokin- und Hormonempfindlichkeit einhergehen (Langerholc et al., 2011; Bourguine et al., 2012). Die mit diesen Zellmodellen gewonnenen Ergebnisse lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation zu. Die IPEC-J2 Zelllinie entstammt hingegen gesundem jejunalem Gewebe. Darüber hinaus weist der gastrointestinale Trakt des Schweines in Hinsicht auf anatomische, physiologische und biochemische Merkmale viele Parallelen zu dem des Menschen auf (Kararli, 1995; Guilloteau et al., 2010). Für die Kultivierung der IPEC-J2-Zellen mit Schweineserum, anstelle des sonst verwendeten fötalen Kälberserums (FCS), sprechen mehre Gründe. Zuerst beruht die Verwendung von Schweineserum auf der Grundüberlegung, dass es für die *in vitro*-Kultivierung unabdingbar ist, möglichst ähnliche Bedingungen wie *in vivo* zu schaffen. So ist seit langer Zeit bekannt, dass es grundlegende Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung von Seren unterschiedlicher Spezies gibt (Stoll and Spector, 1984). Auch konnte gezeigt werden, dass Seren fremder Spezies zu einer veränderten Genexpression in Epithelzellen führen können (Chen et al., 2017). Für die IPEC-J2 Zelllinie wurde darüber hinaus bereits gezeigt, dass eine Kultivierung mit FCS mit abnormal hohen Widerstandswerten und einer verbreiterten Zellmorphologie einhergeht. Eine Kultivierung mit Schweineserum hingegen führt zu einer verschmälerten Zellmorphologie sowie zu einer Reduktion der abnormal hohen Widerstandswerte. Die mit Schweineserum kultivierten IPEC-J2-Zellen weisen somit Eigenschaften auf, die gewonnenen *ex vivo*-Proben sehr nahe kommen (Zakrzewski et al., 2013). Die prinzipielle Eignung der IPEC-J2 Zelllinie, Interaktionen zwischen Epithelzellen und pathogenen Bakterien zu untersuchen, wurde bereits gezeigt. So ist *S. Typhimurium* in der Lage, in IPEC-J2-Zellen einzudringen und führt im Zuge dessen zur Expression bzw. Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine, darunter IL-1 α , -6, -7, -8 und TNF- α (Schierack et al., 2006).

In der aktuellen Arbeit konnte für IPEC-J2-Zellen unter Verwendung von PIGS ebenfalls gezeigt werden, dass sich diese Zelllinie zur Untersuchung *S. Typhimurium*-vermittelter Effekte eignet. Zum einem konnte dargestellt werden, dass es durch die Infektion zu einem TER-Abfall kam und zum anderen wurde gezeigt, dass nur invasive Varianten in der Lage

waren, eine Barrierestörung zu induzieren. Somit eignen sich IPEC-J2-Zellen auch unter der Verwendung von PIGS zur Untersuchung von infektiologischen Vorgängen.

6.3 DMEM_{PIGS}: ein geeignetes Nährmedium für die Kokultivierung

Für die Kokultivierung der differenzierten PBM-Makrophagen mit den IPEC-J2-Zellen ergab sich die Schwierigkeit, dass beide Zellarten im selben Nährmedium kultiviert werden mussten. Da die Kultivierung von IPEC-J2-Zellen ursprünglich mit DMEM-HAM-F12 durchgeführt (Berschneider, 1989) und auch in weiteren beschriebenen Charakterisierungsarbeiten u.a. von Schierack et al. (2006) und Zakrzewski et al. (2013) verwendet wurde, war eine Beibehaltung dieses Nährmediums für die IPEC-J2-Zellen erstrebenswert. In Bezug auf den zu verwendenden Tierserumzusatz hatte sich schon bei der getesteten PBM-Kultivierung abgezeichnet, dass die PBM-Makrophagen unter DMEM_{PIGS} höhere Expressionsraten für die getesteten Oberflächenmarker aufwiesen als unter DMEM_{FCS}. Ähnliche Beobachtungen konnten McCullough et al. (1999) machen, indem sie zeigten, dass der Zusatz von 30% Schweineserum zu porzinen Knochenmarks- bzw. hämatopoetischen Zellen zu einer Hochregulierung von CD203a (SWC9), einem weiteren Marker für Schweinmakrophagen (Ezquerro et al., 2009; Dawson and Lunney, 2018) sowie zu einem CD14^{low} SWC1-Phänotyp führte. Variationen des zugesetzten Schweineserums zwischen 10-50% führten zu derselben Beobachtung. Zellen, die hingegen mit 30% FCS kultiviert wurden, zeigten eine geringere Expressionsrate von CD203a (SWC9) auf und blieben über einen Kultivierungszeitraum von sieben Tagen überwiegend SWC1⁺ (McCullough et al., 1999). In einer weiteren Arbeit wird gezeigt, dass durch die Zugabe von 30% Schweineserum vermehrt CD163⁻-Zellen in den CD163⁺-Phänotyp übergehen. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg von CD203a (SWC9), CD16 und SLA II sowie einer geringeren Expression von CD14 und SWC1 (Sanchez et al., 1999). Auch bei den in dieser Arbeit differenzierten PBM-Makrophagen, die für die IPEC-J2_{indirekt}-Kokulturen verwendet wurden, zeigten sich deutlich höhere Expressionsraten für die einzelnen Oberflächenmarker in den Kokulturen, die mit DMEM_{PIGS} anstelle von DMEM_{FCS} kultiviert wurden. Die postulierten und die eigenen Ergebnisse zeigen einen überwiegend positiven Einfluss vom Schweinserum auf die differenzierten PBM-Makrophagen. Da auch die IPEC-J2-Zellen von dem Schweinserum profitieren (Zakrzewski et al., 2013) wurde DMEM_{PIGS} für die Kultivierung der IPEC-J2_{indirekt}-Kokulturen verwendet.

6.4 Die IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur als funktionelles System für den interzellulären Crosstalk zwischen Darmepithel und Makrophagen

Für die Interaktion zwischen Epithelzellen und Makrophagen sind prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen ist eine direkte Kommunikation zwischen zwei unmittelbar in Kontakt stehenden Zellen möglich, zum anderen ein indirekter Informationsaustausch über lösliche Substanzen wie z. B. Zytokine. Die Kombination von direkter und indirekter Kommunikation ist in dem IPEC-J2_{invers/direkt} Kontaktmodell vereint. Ein Modell zur ausschließlichen Untersuchung der indirekten Kommunikation stellt das IPEC-J2_{indirekt} Kontaktmodell dar. Ähnliche Kokulturen mit direktem oder indirektem Kontakt, jedoch unter Verwendung von onkogene Zelllinien, sind bereits beschrieben (Hirose et al., 2000; Harimoto et al., 2002; Kampf et al., 2017).

Da invers ausgesäte IPEC-J2-Zellen eine starke Varianz im TER aufwiesen, einem der Hauptmessparameter dieser Arbeit zur Untersuchung des interzellulären Crosstalks zwischen Darmepithel und Makrophagen, und dies mit einer schlechten Reproduzierbarkeit einherging, waren sie für weitere Experimente ungeeignet. Zusätzlich lag das Hauptaugenmerk der Arbeit darin, die Barriereeigenschaften des Darmepithels unter dem Gesichtspunkt von pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen von Makrophagen zu untersuchen, um den Einfluss von Immunzellen auf Darmepithelzellen zu untersuchen. Somit war das IPEC-J2_{indirekt} Kontaktmodell für die Untersuchung des interzellulären Crosstalks zwischen beiden Zellarten besser geeignet als das direkte Kontaktmodell.

6.5 IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur: Zytokinausschüttung und Barriereeigenschaften unter Normbedingungen

In Hinblick auf die Zytokinausschüttung zeigte sich unter Normalbedingungen (nicht infiziert), dass keine Unterschiede hinsichtlich der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- α zwischen Solitär- und Kokultur vorhanden waren.

Geringe basale Expressionsraten von IL-12 und TNF- α sind bereits für die IPEC-J2 Zelllinie in Solitärkultur beschrieben (Mariani et al., 2009) und es konnte auch eine basale Sekretion dieser beiden Interleukine unter Verwendung von PIGS in dieser Arbeit detektiert werden. IL-6 konnte indessen weder in der nicht infizierten Solitär- noch in der entsprechenden Kokultur nachgewiesen werden. Dies widerspricht den bisher postulierten Ergebnissen zu IL-6 in der IPEC-J2 Zelllinie, da auch hier eine basale Expressionsrate vorbeschrieben ist (Mariani et al., 2009). Des Weiteren konnte von Devriendt et al. (Devriendt et al., 2010) zwar

eine basale Sekretion von IL-6 in IPEC-J2 gezeigt werden, die Autoren konnten jedoch weder eine basale noch eine durch verschiedene *E. coli*-Stämme bzw. deren Bestandteile vermittelte TNF- α Sekretion feststellen. Das Fehlen von TNF- α steht zum einem im Gegensatz zu der basalen Expressionsrate von TNF- α in IPEC-J2 (Mariani et al., 2009) und zum Anderen zu der hier beobachteten basalen TNF- α -Sekretion. Für die IPEC-J2 artverwandte IPI-2I-Zelllinie ist beschrieben, dass eine Kultivierung mit FCS im Vergleich zu einer serumfreien Kultivierung zu einer verringerten Expressionsrate von IL-6 führt (Mariani et al., 2009). Da in den oben genannten Arbeiten die IPEC-J2-Zellen mit FCS kultiviert wurden, sind Unterschiede für die Expressionsraten und sezernierten Interleukine durchaus aufgrund der alternativen Kultivierung mittels PIGS möglich.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 konnte unter Normalbedingungen nur in der Kokultur nachgewiesen werden. Dies entspricht den publizierten Daten, dass eine Expression von IL-10 in IPEC-J2-Zellen nicht nachgewiesen werden kann (Schierack et al., 2006; Mariani et al., 2009) sowie der Tatsache, dass Makrophagen eine der Hauptquellen von IL-10 sind (Sabat et al., 2010; Sanin et al., 2015a; Sanin et al., 2015b). Somit dient die IL-10 Sekretion als Indikator für die erfolgreiche Kokultivierung.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die kokultivierten IPEC-J2-Zellen TER-Werte im dreistelligen Bereich aufwiesen, die denen von IPEC-J2 Solitärkulturen entsprachen sowie denen von Zakrzewski et al. (2013) für das verbesserte IPEC-J2 Modell entsprechen. Ebenso zeigten die Fluoresceinfluxe keinen Unterschied zwischen den nicht infizierten Solitär- und Kokulturen auf. Eine Färbung des Tight-Junction Proteins Claudin-4 zeigte sowohl in Solitär- als auch in der Kokultur eine unveränderte regelhafte, netzartige Struktur.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Kokultivierung der IPEC-J2-Zellen mit den PBM-Makrophagen unter Normalbedingungen keinen Einfluss auf die Barriereeigenschaften der IPEC-J2-Zellen hatte.

6.6 IPEC-J2_{indirekt}-Kokultur: Zytokinausschüttung und Barriereeigenschaften unter *Salmonella* Typhimurium-Infektion

Die Infektion der IPEC-J2-Zellen mit *S. Typhimurium* führte sowohl in Solitär- als auch in Kokultur zu einem Abfall des TERs. Ähnliche TER-Abfälle durch *S. Typhimurium* in Solitärkulturen sind bereits für andere Zelllinien beschrieben (Tafazoli et al., 2003; Kohler et al., 2007). In der IPEC-J2_{indirekt}-Makrophagen-Kokultur fiel dieser Abfall zudem deutlicher aus als in der entsprechenden Solitärkultur. Die Fluorescein-Fluxe zeigten zudem, dass der TER-Abfall mit einem teilweise erhöhten parazellulären Fluorescein-Flux in der infizierten

Solitärkulturen und mit einem dreifach erhöhten Fluorescein-Flux in der infizierten Kokultur, im Vergleich zur infizierten Solitärkultur, einherging. Dies lässt den Schluss zu, dass der beobachtete TER-Abfall vorwiegend parazellulären Ursprungs war. Tatsächlich ist eine durch *S. Typhimurium* vermittelte Störung der Netzstruktur für die TJ-Proteine Occludin und Claudin-1 sowie für das TJ-assoziierte Protein ZO-1 und zusätzlich für E-Cadherin beschrieben (Tafazoli et al., 2003; Kohler et al., 2007). In *S. Typhimurium*-infizierten Hühnern konnte auch eine herunterregulierte mRNA-Expression für das abdichtende TJ-Protein Claudin-4 gezeigt werden (Shao et al., 2013). Die Hypothese, dass damit auch Veränderungen in der Claudin-4-Netzstruktur einhergehen könnten, konnte in dieser Arbeit erstmalig bestätigt werden. Diese Veränderungen konnten sowohl in der Solitär- als auch in der Kokultur dargestellt werden, wobei sie in der Kokultur stärker ausgeprägt waren, was auf einen zusätzlichen Effekt der ausgeschütteten Zytokine der Kokultur schließen lässt. In der Tat führte die apikale Zugabe von *S. Typhimurium* zu den kokultivierten IPEC-J2-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α . Ein Anstieg blieb für die beiden Interleukine in den infizierten Solitärkulturen indessen aus. Beide Interleukine (IL-6 und TNF- α) werden vornehmlich von Makrophagen nach Kontakt mit Pathogenen oder deren Bestandteilen und der damit einhergehenden Aktivierung von Muster-erkennenden Rezeptoren (PRRs) sezerniert (Murphy, 2012a). Dass der ebenfalls durch PRR-Aktivierung der Makrophagen zu erwartende IL-12-Anstieg (Murphy, 2012a) ausblieb, lässt sich damit erklären, dass die Expression der verschiedenen IL-12-Untereinheiten (u.a. p19, p40 und p35) durch TLR-4-Aktivierung mittels *Salmonella* in Makrophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten von statten geht. So konnte eine verspätete Hochregulierung der Expression der IL-12-p40-Untereinheit in knochenmarksabstammenden Makrophagen der Maus nachgewiesen werden (Schuetze et al., 2005). Da eine verspätete Hochregulierung der Genexpression folglich mit einer verspäteten Sekretion einhergeht, lässt sich somit ein Ausbleiben des IL-12-Anstiegs in der infizierten Kokultur erklären. Der beobachtete Anstieg von IL-10 in den infizierten Kokulturen geht konform mit vorbeschriebenen Daten, die zeigen, dass die Makrophagenaktivierung durch *LPS*/TLR-4 zu einer erhöhten IL-10-Expression führt. IL-10 wirkt dabei u.a. auch im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus autokrin auf die TNF- α -Produktion der Makrophagen und verhindert damit eine überschießende Immunantwort (Sabat et al., 2010).

Für mehrere Zelllinien ist beschrieben, dass der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α mit einem Anstieg der parazellulären Permeabilität einhergeht (Capaldo and Nusrat, 2009). Dies lässt die Annahme zu, dass der in der IPEC-J2_{indirekt} Kokultur verstärkte

Barrieredefekt, verglichen mit der IPEC-J2 Solitärkultur, auf die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine der Makrophagen zurückzuführen ist.

Da Salmonellen eine Größe von 0,7-1 x 2-5 µm besitzen (Holt, 1993) ist ein direkter Übertritt der Salmonellen vom apikalen Kompartiment in das basolaterale Kompartiment durch die verwendeten HA-Filter mit 0,4 µm Porengröße nicht möglich, so dass ein direkter Kontakt zwischen Salmonellen und Makrophagen ausgeschlossen werden kann. Die erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine muss daher auf einem interzellulären Crosstalk zwischen IPEC-J2-Zellen und Makrophagen oder auf einzelnen bakteriellen Fragmenten, die den Filtern passieren konnten, beruhen. Dies setzt jedoch einen bereits induzierten Barrieredefekt bei den IPEC-J2-Zellen durch die Bakterien voraus.

6.7 Vermittlung des Barrieredefekts durch *Salmonella* Typhimurium in IPEC-J2-Zellen

Für MDCK- und Caco-2 Zellen ist gezeigt, dass ein TER-Abfall durch eine drei- bis vierstündige *Salmonella* Typhimurium-Infektion unter Verwendung einer MOI von 50 nur bei invasiven Varianten des Pathogens zu beobachten ist (Tafazoli et al., 2003; Boyle et al., 2006). In einer weiteren Arbeit mit MDCK-Zellen, bei der eine um das achtfach höhere MOI bei einer kürzeren Infektionsdauer zum Einsatz kommt, ließ sich ein TER-Abfall auch für eine nichtinvasive Mutante von *S. Typhimurium* beobachten (Kohler et al., 2007). Untersuchungen zu einzelnen mit *S. Typhimurium*-Mutanten infizierten IPEC-J2-Zellen gibt es bislang noch nicht. Da es sich bei beiden vorhergenannten Zelllinien um kanzerogene Zelllinien handelt und zudem in MDCK-Zellen in einer Arbeit auch die nicht invasive Variante zu einer Beeinträchtigung der Barriereeigenschaften geführt hat, stellte sich die Frage, wie der beobachtete Barriereverlust in den IPEC-J2-Zellen vermittelt wird.

Durch die Infektion mit zwei verschiedenen Mutanten sowie verschiedenen Bakterienbestandteilen konnte gezeigt werden, dass ein Barriereverlust in den IPEC-J2-Zellen nur mit einer invasiven Mutante (Δ SPI2) oder mit dem Wildtyp zustande kam.

Die nicht invasive Mutante (Δ SPI1) sowie der *S. Typhimurium*-Überstand bzw. hitzeinaktivierte Salmonellen waren indessen nicht in der Lage, die Barriere in den IPEC-J2-Zellen zu stören. Da bekannt ist, dass *S. Typhimurium* mithilfe des auf dem Δ SPI1 kodierten Typ III-Sekretionsapparats Proteine in die Zielzelle sezerniert, die anschließend über Aktivierung von mehreren GTPasen zu einer Umverteilung des Zytoskeletts führen und ebenfalls mit Störungen in der TJ-Region (Occludin und ZO-1) einhergehen (Tafazoli et al., 2003; Boyle

et al., 2006; Kohler et al., 2007), ist davon auszugehen, dass der bei mäßiger MOI in MDCK- und Caco-Zellen beobachtete Mechanismus in IPEC-J2-Zellen analog vonstattengeht.

6.8 Hemmung des durch *Salmonella* Typhimurium vermittelten Barrierelosts durch Pralnacasan

Die Störung der Barriereintegrität durch *S. Typhimurium* wird hauptsächlich von den Effektorproteinen SopE, SopB, SopE2 und SipA der *Salmonella*-Pathogenitätsinsel 1 des Typ-3-Sekretionssystems vermittelt. Diese Effektorproteine aktivieren GTPasen der Rho-Familie und führen darüber zur Störung der Barrierefunktion (Tafazoli et al., 2003; Boyle et al., 2006). Dennoch führt die Zugabe eines Geranylgeranyltransferase 1-Inhibitors, der indirekt GTPasen hemmt, nur zu einer partiellen Wiederherstellung des TERs (Tafazoli et al., 2003; Boyle et al., 2006). Somit scheint es noch weitere *S. Typhimurium*-vermittelte Mechanismen zu geben, die zur Störung der Barrierefunktion beitragen. Neben TNF- α , INF- γ und IL-6 ist auch für IL-1 β gezeigt, dass es zu Barrierestörungen führt (Al-Sadi R. M. and Ma, 2007; Beard et al., 2014). Erhöhte Konzentrationen von IL-1 β sind zudem vermehrt in der Darmmukosa von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vorzufinden und korrelieren mit ihrem endoskopischen Befund (Ishiguro, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass *S. Typhimurium* in HeLa-Zellen sowie im Mausmodell über das Effektorprotein SopE zu einer Aktivierung von Caspase-1 führt und damit eine vermehrte Produktion von IL-1 β und IL-18 einhergeht. Zudem ist bekannt, dass die Aktivierung von Caspase-1 in der Maus notwendig ist, um dort eine Entzündung des Dickdarms hervorzurufen (Müller et al., 2009). Die Gabe des Caspase-1-Hemmers Pralnacasan ging in einer Dextran-Sulfat-Natrium-induzierten Kolitis der Maus, mit einer deutlichen klinischen Verbesserung und einer reduzierten IL-18-Expression einher (Loher et al., 2004; Bauer et al., 2010).

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pralnacasan (Bauer et al., 2010) in der Lage war, in Caco-2bbe-Zellen den durch *S. Typhimurium* vermittelten Barrieredefekt partiell wieder aufzuheben. In IPEC-J2-Zellen konnte dieser Effekt bei den infizierten, mit Pralnacasan vorbehandelten Proben indessen nicht nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen, die in Betracht kommen sind eine speziesspezifische Wirkung des Pralnacasan oder das Ausbleiben der Aktivierung des Pralnacasan durch Plasmaesterasen (Rudolphi et al., 2003) bei IPEC-J2-Zellen. Eine weitere Ursache könnte in einer fehlenden bzw. niedrigen Expression bzw. Sekretion von IL-1 β oder IL-18 liegen. Beide Interleukine binden und aktivieren den IL-1-Rezeptor (Hoshino et al., 1999). Für die Caco-2-Zelllinie bzw. deren Subklon ist eine IL-18-Sekretion und eine IL-1 β -Expression gezeigt (Knodler et al., 2010; Huang,

2016). In den IPEC-J2-Zellen konnte unter Kultivierung mittels FBS zwar eine IL-18-Expression, jedoch keine IL-1 β -Expression festgestellt werden (Schierack et al., 2006; Mariani et al., 2009). In einem Pilotversuch konnte auch eine IL-18-Expression unter Verwendung von DMEM_{PIGS} in infizierten IPEC-J2-Zellen festgestellt werden. Es wäre somit durchaus denkbar, dass die durch IL-1 β zusätzlich zu den GTPasen, vermittelte Störung der Barriere lediglich in der Caco-2-Zelllinie vorhanden war, durch die Gabe von Pralnacasan erfasst werden konnte und daher nur in diesem Zellsystem eine Verbesserung des TERs durch die Blockierung von Caspase-1 ersichtlich wurde. Ein weiterer Aspekt, der nicht außer Acht gelassen werden darf ist, dass die aktivierte Caspase-1 über die Freisetzung von Gasdermin-D zu Pryoptose führt (Bierschenk et al., 2017), einer speziellen Form des Zelltods, welcher der Apoptose ähnelt und somit ebenfalls mit einer TER-Reduktion einhergeht. Da in IPEC-J2-Zellen kein Effekt von Pralnacasan festzustellen war, spielt der Weg der Pryoptose hier entweder keine Rolle für den Barriereefferkt oder die gewählte Pralnacasandosis war zu gering, um die Pryoptose zu hemmen. In Caco-Zellen hingegen ließ sich durch die Zugabe von Pralnacasan eine partielle Wiederherstellung des TERs beobachten. Hier kommt die Hemmung der Pryoptose genauso wie die Hemmung von IL-1 β als Ursache in Betracht. Abschließend ist daher anzumerken, dass erst weitere Experimente Aufschluss darüber geben können, ob der in Caco-2-Zellen beobachtete protektive Effekt auf die Barriere auf die Hemmung von IL-18 und oder IL-1 β oder auf einem anderen Mechanismus beruht.

6.9 Hemmung des durch *Salmonella Typhimurium* vermittelten Barriereverlusts durch Quercetin

Durch eine Vorinkubation der IPEC-J2-Zellen mit dem Polyphenol Quercetin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der von *S. Typhimurium* verursachte Barriedefekt zu hemmen war. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass der *S. Typhimurium*-vermittelte Barriedefekt mit deutlichen Veränderungen des Claudin-4-Netztes einherging, der zudem verstärkt in der Kokultur zu beobachten war. Für mit Quercetin vorbehandelte Caco-2-Zellen ist ein Barriere-stärkender Effekt beschrieben, welcher mit einer gesteigerten immunhistologischen Intensität von Claudin-4 in der Tight Junction-Region einhergeht (Amasheh et al., 2008). Widersprüchlich sind die Daten zu der Proteinexpression von Claudin-4: So wurde einerseits eine erhöhte Proteinexpression in Caco-2-Zellen gezeigt (Amasheh et al., 2008), andererseits konnte in HT29/B6-Zellen, im Dickdarm von Ratten sowie in Tubuluszellen der Niere dieser Nachweis nicht geführt werden, obwohl es dort durch Quercetinzugabe ebenfalls zu einer Verbesserung der Barriereigenschaften kommt (Amasheh et al., 2012;

Mercado et al., 2013). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass es zu keiner veränderten Claudin-4-Proteinexpression kam, weder durch Quercetingabe, noch durch die *S. Typhimurium*-Infektion, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der Barriere-defekt bzw. die Wiederherstellung der Barriere durch Quercetin nicht auf einer vermehrten Proteinexpression, sondern zumindest partiell auf einer Umverteilung von Claudin-4 beruht. Ein weiterer für Quercetin erst kürzlich berichteter Effekt ist, dass es ebenfalls in der Lage ist, die Aktivierung von zytosolischen PRRs, sogenannten NOD-like Rezeptoren, zu hemmen. So konnte Quercetin in Caco-2-Zellen den NOD-like Rezeptor NLRP3 hemmen (Xue et al., 2017), der u.a. durch zellulären Stress wie reaktive Sauerstoffspezies und Kaliuminflux, aber auch durch *S. Typhimurium* direkt aktiviert wird (Bierschenk et al., 2017). Bei Aktivierung von NLRP3 bildet ein NLRP3-Dimer zusammen mit einem Adapterprotein das Inflammasom aus, welches ebenfalls, somit unabhängig von dem *S. Typhimurium*-Effektorprotein SopE, Caspase-1 in ihre aktive Form überführt. Hierdurch werden die Interleukine IL-18 und IL-1 β in ihre aktive Form überführt und sind dann in der Lage, die Barriere durch eine veränderte TJ-Regulierung zu beeinträchtigen. In einer Magenepithelzelllinie wurde zusätzlich ein direkter Zusammenhang zwischen IL-1 β -Applikation und einer gestörten Claudin-4-Netzstruktur, ähnlich zu der in dieser Arbeit gezeigten, aufgezeigt (Lapointe et al., 2010). Es besteht die Möglichkeit, dass die IPEC-J2-Zellen unter PIGS-Kultivierung in der Lage sind, IL-1 β zu produzieren bzw., dass die gewählte Quercetindosis, im Gegensatz zur gewählten Pralnacasandosis, in der Lage war, Caspase-1 in IPEC-J2 zu blockieren. Ein synergistisches Wirken von direkter Barriestärkung und einem reduzierten Einfluss der proinflammatorischen Zytokine durch die Quercetingabe sind zudem denkbar.

6.10 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Kokultivierung von IPEC-J2-Zellen und PBM-Makrophagen möglich ist und sich diese weder nachteilig in Hinblick auf die Barriereintegrität noch auf die Lokalisation des beispielhaft betrachteten TJ-Proteins Claudin-4 in den Darmepithelzellen auswirkt. Die Funktionalität dieses Kokultursystems konnte im Zusammenhang mit der *S. Typhimurium*-Infektion aufgezeigt werden, die zu einem einzigartigen Zytokinsekretionsmuster und im Vergleich zur Solitärkultur zu einem stärkeren Verlust der Barriereintegrität in kokultivierten Zellen führte. Die initiale Hypothese, dass Makrophagen maßgeblich an dem *S. Typhimurium*-vermittelten Barriere-defekt beteiligt sind, konnte teilweise bestätigt werden. So zeigte die infizierte Kokultur einen stärkeren Barriere-defekt als die entsprechende Solitärkultur auf.

In dieser Arbeit konnte somit erfolgreich eine Kokultur etabliert werden, welche sich zur Untersuchung für den interzellulären Crosstalk zwischen Darmepithel und Makrophagen eignet. Darüber hinaus konnte mit dem Flavonoid Quercetin eine Substanz mit protektivem Potential gefunden werden, die die Folge einer *S. Typhimurium*-Infektion in Bezug auf die Barrierestörung abmilderte.

7. Ausblick

Das in dieser Arbeit etablierte Kokultursystem ermöglicht es, die indirekte Kommunikation zwischen Epithelzellen und Makrophagen abzubilden. Untersuchungen von Wirkstoffen oder Pathogenen, die über Zytokine indirekt auf den jeweils anderen Zelltyp wirken, sind somit möglich. *In vivo* gelangt eine Vielzahl von Wirkstoffen neben dem bereits beschriebenen transzellulären bzw. parazellulären Weg noch über einen weiteren Weg in den Organismus. Sogenannte *Microfold Cells* (MC) stellen spezielle Epithelzellen dar und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie schleusen gezielt Partikel vom Darmlumen ins Körperinnere. Aber auch einige Pathogene wie *S. Typhimurium* sind in der Lage, über diese Zellen den Organismus zu infiltrieren (Murphy, 2012b). Die durchgeschleusten Substanzen und pathogenen Bestandteile kommen über diesen Mechanismus direkt mit den subepithelial liegenden Immunzellen, z. B. Makrophagen, in Kontakt. Eine Möglichkeit, dass hier etablierte Kokulturmodell weiter zu verbessern und somit weiter an die *in vivo*-Situation anzugleichen, bestünde in der Integration dieser MCs in das vorhandene Kokultursystem. Damit würde die Kokultur in Form einer Tripelkultur um diesen physiologischen Weg erweitert und würde somit auch neben der indirekten Interaktion über Zytokine eine direkte Interaktion von apikal zugegebenen Substanzen auf die Makrophagen ermöglichen.

Für das Flavonoid Quercetin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es *in vitro* wirkungsvoll war, die *S. Typhimurium*-induzierte Barrierestörung zu verhindern. In einem nächsten Schritt wäre es daher von Interesse zu untersuchen, ob eine prophylaktische Zufütterung von Quercetin im Schwein ebenso effektiv ist, diese Ergebnisse zu reproduzieren. Quercetin kommt in einer Vielzahl von Pflanzen und Früchten vor, besonders hohe Konzentrationen lassen sich im Rucola (66 mg/100 g) (Higdon, 2005) oder in den Blättern von Rettich (70 mg/100 g) finden (Bhagwat et al., 2013), aber auch in Apfelschalen (19 mg/100 g) und Zwiebeln (39 mg/100 g) (Bhagwat et al., 2013) sind relevante Mengen enthalten. Apfelschalen, die in Form von Apfeltrester als Abfallprodukt bei der Herstellung von Apfelsaft anfallen, könnten sich somit durchaus als Futterzusatz in der Schweinemast eignen. Amasheh et al. mutmaßten, dass sich mit der Aufnahme von ca. 500 mg Quercetin im Menschen mukosale Konzentrationen im Bereich von 200 µmol/L realisieren lassen (Amasheh et al., 2008). Eine systematische Zufütterung von quercetinhaltigen Zusätzen könnte somit zu einer Reduktion symptomatischer *S. Typhimurium*-Infektionen und damit einhergehend zu einer Reduktion der Sterblichkeit bzw. der infektionsbedingten verlängerten Mastzeit im Schwein führen. Darüber hinaus könnte man so eine verringerte Rate an lebensmittelbedingten Infektionen des Menschen erreichen.

8. Literatur

- AL-SADI R. M. & MA, T. Y. 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol*, 178, 4641-9.
- AMASHEH, M., FROMM, A., KRUG, S. M., AMASHEH, S., ANDRES, S., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2010. TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling. *J Cell Sci*, 123, 4145-55.
- AMASHEH, M., LUETTIG, J., AMASHEH, S., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2012. Effects of quercetin studied in colonic HT-29/B6 cells and rat intestine in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 1258, 100-7.
- AMASHEH, M., SCHLICHTER, S., AMASHEH, S., MANKERTZ, J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2008. Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr*, 138, 1067-73.
- AMASHEH, S., MEIRI, N., GITTER, A. H., SCHÖNEBERG, T., MANKERTZ, J., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 115, 4969-4976.
- AMASHEH, S., MILATZ, S., KRUG, S. M., BERGS, M., AMASHEH, M., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2009. Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 378, 45-50.
- AMASHEH, S., SCHMIDT, T., MAHN, M., FLORIAN, P., MANKERTZ, J., TAVALALI, S., GITTER, A. H., SCHULZKE, J.-D. & FROMM, M. 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell and Tissue Research*, 321, 89-96.
- ANTONETTI, D. A., WOLPERT, E. B., DEMAIO, L., HARHAJ, N. S. & SCADUTO, R. C., JR. 2002. Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem*, 80, 667-77.
- AWAD, W. A., HESS, C. & HESS, M. 2017. Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens. *Toxins (Basel)*, 9.
- BARRILA, J., YANG, J., CRABBE, A., SARKER, S. F., LIU, Y., OTT, C. M., NELMAN-GONZALEZ, M. A., CLEMETT, S. J., NYDAM, S. D., FORSYTH, R. J., DAVIS, R. R., CRUCIAN, B. E., QUIRIARTE, H., ROLAND, K. L., BRENNEMAN, K., SAMS, C., LOSCHER, C. & NICKERSON, C. A. 2017. Three-dimensional organotypic co-culture model of intestinal epithelial cells and macrophages to study Salmonella enterica colonization patterns. *NPJ Microgravity*, 3, 10.
- BAUER, C., DUEWELL, P., MAYER, C., LEHR, H. A., FITZGERALD, K. A., DAUER, M., TSCHOPP, J., ENDRES, S., LATZ, E. & SCHNURR, M. 2010. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*, 59, 1192-9.
- BEARD, R. S., JR., HAINES, R. J., WU, K. Y., REYNOLDS, J. J., DAVIS, S. M., ELLIOTT, J. E., MALININ, N. L., CHATTERJEE, V., CHA, B. J., WU, M. H. & YUAN, S. Y. 2014. Non-muscle Mlck is required for beta-catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1beta-mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *J Cell Sci*, 127, 1840-53.
- BERSCHNEIDER, H. M. 1989. Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl. *9th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*.

- BHAGWAT, S., HAYTOWITZ, D. B. & HOLDEN, J. M. 2013. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. release 3.1. May 2014 ed.: US Department of Agriculture.
- BIERSCHENK, D., BOUCHER, D. & SCHRODER, K. 2017. Salmonella-induced inflammasome activation in humans. *Mol Immunol*, 86, 38-43.
- BLASIG, I. E., WINKLER, L., LASSOWSKI, B., MUELLER, S. L., ZULEGER, N., KRAUSE, E., KRAUSE, G., GAST, K., KOLBE, M. & PIONTEK, J. 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63, 505-14.
- BOURGINE, J., BILLAUT-LADEN, I., HAPPELLON, M., LO-GUIDICE, J. M., MAUNOURY, V., IMBENOTTE, M. & BROLY, F. 2012. Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines. *Drug Metab Dispos*, 40, 694-705.
- BOYLE, E. C., BROWN, N. F. & FINLAY, B. B. 2006. Salmonella enterica serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol*, 8, 1946-57.
- BULLIDO, R., GOMEZ DEL MORAL, M., ALONSO, F., EZQUERRA, A., ZAPATA, A., SANCHEZ, C., ORTUNO, E., ALVAREZ, B. & DOMINGUEZ, J. 1997. Monoclonal antibodies specific for porcine monocytes/macrophages: macrophage heterogeneity in the pig evidenced by the expression of surface antigens. *Tissue Antigens*, 49, 403-13.
- CAPALDO, C. T. & NUSRAT, A. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 864-71.
- CHAMORRO, S., REVILLA, C., ALVAREZ, B., LOPEZ-FUERTE, L., EZQUERRA, A. & DOMINGUEZ, J. 2000. Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology*, 202, 82-93.
- CHAMORRO, S., REVILLA, C., GOMEZ, N., ALVAREZ, B., ALONSO, F., EZQUERRA, A. & DOMINGUEZ, J. 2004. In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology*, 209, 57-65.
- CHEN, P., GAO, H., LU, Y., NIE, H., LIU, Z., ZHAO, Y., FAN, N., ZOU, Q., DAI, Y., TANG, A., HARA, H., CAI, Z., COOPER, D. K. C., LAI, L. & MOU, L. 2017. Altered expression of eNOS, prostacyclin synthase, prostaglandin G/H synthase, and thromboxane synthase in porcine aortic endothelial cells after exposure to human serum-relevance to xenotransplantation. *Cell Biol Int*, 41, 798-808.
- COLEGIO, O. R., C., V. I., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1346–C1354.
- COLEGIO, O. R., VAN ITALLIE, C. M., MCCREA, H. J., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C142–C147.
- DAWSON, H. D. & LUNNEY, J. K. 2018. Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update. *Res Vet Sci*, 118, 199-246.
- DEVRIENDT, B., STUYVEN, E., VERDONCK, F., GODDEERIS, B. M. & COX, E. 2010. Enterotoxigenic Escherichia coli (K88) induce proinflammatory responses in porcine intestinal epithelial cells. *Dev Comp Immunol*, 34, 1175-82.
- EPPLE, H. J., SCHNEIDER, T., TROEGER, H., KUNKEL, D., ALLERS, K., MOOS, V., AMASHEH, M., LODDENKEMPER, C., FROMM, M., ZEITZ, M. & SCHULZKE, J. D. 2009. Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients. *Gut*, 58, 220-7.

- EZQUERRA, A., REVILLA, C., ALVAREZ, B., PEREZ, C., ALONSO, F. & DOMINGUEZ, J. 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. *Dev Comp Immunol*, 33, 284-98.
- FAIRBAIRN, L., KAPETANOVIC, R., SESTER, D. P. & HUME, D. A. 2011. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol*, 89, 855-71.
- FRENCH, A. D., FIORI, J. L., CAMILLI, T. C., LEOTLELA, P. D., O'CONNELL, M. P., FRANK, B. P., SUBARAN, S., INDIG, F. E., TAUB, D. D. & WEERARATNA, A. T. 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*, 6, 93-101.
- FUJIBE, M., CHIBA, H., KOJIMA, T., SOMA, T., WADA, T., YAMASHITA, T. & SAWADA, N. 2004. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res*, 295, 36-47.
- FURUSE, M., FUJITA, K., HIIRAGI, T., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141, 1539-1550.
- FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A., SUGITANI, Y., NODA, T., KUBO, A. & TSUKITA, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156, 1099-111.
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YOUNEMURA, S., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.*, 123, 1777-1788.
- FURUSE, M., SASAKI, H., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 141, 1539-1550.
- FURUSE, M., SASAKI, H. & TSUKITA, S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*, 147, 891-903.
- GARCIA-HERNANDEZ, V., QUIROS, M. & NUSRAT, A. 2017. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1397, 66-79.
- GENOVESI, E. V., KNUDSEN, R. C., GERSTNER, D. J., CARD, D. M., MARTINS, C. L. V., QUINTERO, J. C. & WHYARD, T. C. 1989. In vitro induction of swine peripheral blood monocyte proliferation by the fibroblast-derived murine hematopoietic growth factor CSF-1. *Vet Immunol Immunopathol*, 23, 223-44.
- GU, M. J., SONG, S. K., LEE, I. K., KO, S., HAN, S. E., BAE, S., JI, S. Y., PARK, B. C., SONG, K. D., LEE, H. K., HAN, S. H. & YUN, C. H. 2016. Barrier protection via Toll-like receptor 2 signaling in porcine intestinal epithelial cells damaged by deoxynivalnol. *Vet Res*, 47, 25.
- GUILLEMOT, L., PASCHOUD, S., PULIMENO, P., FOGLIA, A. & CITI, S. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 601-13.
- GUILLOTEAU, P., ZABIELSKI, R., HAMMON, H. M. & METGES, C. C. 2010. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutr Res Rev*, 23, 4-22.
- GÜNZEL, D., STUIVER, M., KAUSALYA, P. J., HAISCH, L., KRUG, S. M., ROSENTHAL, R., MEIJ, I. C., HUNZIKER, W., FROMM, M. & MULLER, D. 2009. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*, 122, 1507-17.
- GÜNZEL, D. & YU, A. S. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93, 525-69.

- HALLER, D., BODE, C., HAMMES, W. P., PFEIFER, A. M. A., SCHIFFRIN, E. J. & BLUM, S. 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*, 47, 79-87.
- HARIMOTO, M., YAMATO, M., HIROSE, M., TAKAHASHI, C., ISOI, Y., KIKUCHI, A. & OKANO, T. 2002. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res*, 62, 464-70.
- HIGDON, J. 2005. *Flavonoids* [Online]. Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis, OR. November 2015. Available: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids> [Accessed 05.12.2018].
- HIROSE, M., YAMATO, M., KWON, O. H., HARIMOTO, M., KUSHIDA, A., SHIMIZU, T., KIKUCHI, A. & OKANO, T. 2000. Temperature-Responsive surface for novel co-culture systems of hepatocytes with endothelial cells: 2-D patterned and double layered co-cultures. *Yonsei Med J*, 41, 803-13.
- HOLT, J. G. 1993. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Verlag: Lippincott Williams and Wilkins.
- HOSHINO, K., TSUTSUI, H., KAWAI, T., TAKEDA, K., NAKANISHI, K., TAKEDA, Y. & AKIRA, S. 1999. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol*, 162, 5041-4.
- HUANG, F. C. 2016. Vitamin D differentially regulates Salmonella-induced intestine epithelial autophagy and interleukin-1beta expression. *World J Gastroenterol*, 22, 10353-10363.
- IKENOUCHI, J., FURUSE, M., FURUSE, K., SASAKI, H., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171, 939-45.
- ISHIGURO, Y. 1999. Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*, 34, 66-74.
- JACOBI, C. A. & MALFERTHEINER, P. 2011. Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig Dis*, 29, 600-7.
- KAMPFER, A. A. M., URBAN, P., GIORIA, S., KANASE, N., STONE, V. & KINSNER-OVASKAINEN, A. 2017. Development of an in vitro co-culture model to mimic the human intestine in healthy and diseased state. *Toxicol In Vitro*, 45, 31-43.
- KAPETANOVIC, R., FAIRBAIRN, L., BERALDI, D., SESTER, D. P., ARCHIBALD, A. L., TUGGLE, C. K. & HUME, D. A. 2012. Pig bone marrow-derived macrophages resemble human macrophages in their response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 188, 3382-94.
- KARARLI, T. T. 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos*, 16, 351-80.
- KAULMANN, A., PLANCHON, S., RENAUT, J., SCHNEIDER, Y. J., HOFFMANN, L. & BOHN, T. 2016. Proteomic response of inflammatory stimulated intestinal epithelial cells to in vitro digested plums and cabbages rich in carotenoids and polyphenols. *Food Funct*, 7, 4388-4399.
- KNODLER, L. A., VALLANCE, B. A., CELLI, J., WINFREE, S., HANSEN, B., MONTERO, M. & STEELE-MORTIMER, O. 2010. Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17733-8.
- KOHLER, H., SAKAGUCHI, T., HURLEY, B. P., KASE, B. J., REINECKER, H. C. & MCCORMICK, B. A. 2007. Salmonella enterica serovar Typhimurium regulates

- intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G178-87.
- KRAUSE, G., WINKLER, L., MUELLER, S. L., HASELOFF, R. F., PIONTEK, J. & BLASIG, I. E. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 631-45.
- KRUG, S. M., GÜNZEL, D., CONRAD, M. P., ROSENTHAL, R., FROMM, A., AMASHEH, S., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2012. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2765-78.
- KRUIS, W., FRIC, P., POKROTNIEKS, J., LUKAS, M., FIXA, B., KASCAK, M., KAMM, M. A., WEISMUELLER, J., BEGLINGER, C., STOLTE, M., WOLFF, C. & SCHULZE, J. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 53, 1617-23.
- LANGERHOLC, T., MARAGKOUidakis, P. A., WOLLGAST, J., GRADISNIK, L. & CENCIC, A. 2011. Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S11-S20.
- LAPORTE, T. K., O'CONNOR, P. M., JONES, N. L., MENARD, D. & BURET, A. G. 2010. Interleukin-1 receptor phosphorylation activates Rho kinase to disrupt human gastric tight junctional claudin-4 during *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol*, 12, 692-703.
- LEONARD, F., COLLNOT, E. M. & LEHR, C. M. 2010. A three-dimensional coculture of enterocytes, monocytes and dendritic cells to model inflamed intestinal mucosa in vitro. *Mol Pharm*, 7, 2103-19.
- LOHER, F., BAUER, C., LANDAUER, N., SCHMALL, K., SIEGMUND, B., LEHR, H. A., DAUER, M., SCHOENHARTING, M., ENDRES, S. & EIGLER, A. 2004. The interleukin-1 beta-converting enzyme inhibitor pralnacasan reduces dextran sulfate sodium-induced murine colitis and T helper 1 T-cell activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 583-90.
- MAGYAR, A., MIHALIK, R. & OLAH, I. 1995. The surface phenotype of swine blood and tissue eosinophil granulocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 47, 273-81.
- MARIANI, V., PALERMO, S., FIORENTINI, S., LANUBILE, A. & GIUFFRA, E. 2009. Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol*, 131, 278-84.
- MAYER, P. 1983. The growth of swine bone marrow cells in the presence of heterologous colony stimulating factor: characterization of the developing cell population. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 6, 171-87.
- MCCULLOUGH, K. C., BASTA, S., KNOTIG, S., GERBER, H., SCHAFFNER, R., KIM, Y. B., SAALMULLER, A. & SUMMERFIELD, A. 1999. Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology*, 98, 203-12.
- MERCADO, J., VALENZANO, M. C., JEFFERS, C., SEDLAK, J., CUGLIARI, M. K., PAPANIKOLAOU, E., CLOUSE, J., MIAO, J., WERTAN, N. E. & MULLIN, J. M. 2013. Enhancement of tight junctional barrier function by micronutrients: compound-specific effects on permeability and claudin composition. *PLoS One*, 8, e78775.
- MILATZ, S., KRUG, S. M., ROSENTHAL, R., GÜNZEL, D., MULLER, D., SCHULZKE, J. D., AMASHEH, S. & FROMM, M. 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 2048-57.
- MINETA, K., YAMAMOTO, Y., YAMAZAKI, Y., TANAKA, H., TADA, Y., SAITO, K., TAMURA, A., IGARASHI, M., ENDO, T., TAKEUCHI, K. & TSUKITA, S. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585, 606-12.

- MORITA, K., FURUSE, M., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 511–516.
- MÜLLER, A. J., HOFFMANN, C., GALLE, M., VAN DEN BROEKE, A., HEIKENWALDER, M., FALTER, L., MISSELWITZ, B., KREMER, M., BEYAERT, R. & HARDT, W. D. 2009. The *S. Typhimurium* effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation. *Cell Host Microbe*, 6, 125-36.
- MURPHY, K. 2012a. *Janeway's Immunobiology, 8th Edition*, S. 99-101.
- MURPHY, K. 2012b. *Janeway's Immunobiology, 8th Edition*, S. 489-491.
- NAVA, P. & VIDAL, J. E. 2016. The CpAL system regulates changes of the trans-epithelial resistance of human enterocytes during *Clostridium perfringens* type C infection. *Anaerobe*, 39, 143-9.
- PETERSON, M. D. & MOOSEKER, M. S. 1992. Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2. *J Cell Sci*, 102 (Pt 3), 581-600.
- PIRIOU-GUZYLACK, L. & SALMON, H. 2008. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res*, 39, 54.
- RALEIGH, D. R., MARCHIANDO, A. M., ZHANG, Y., SHEN, L., SASAKI, H., WANG, Y., LONG, M. & TURNER, J. R. 2010. Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tri-cellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* 21, 1200–1213.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2018. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2017.
- ROSENTHAL, R., GÜNZEL, D., KRUG, S. M., SCHULZKE, J. D., FROMM, M. & YU, A. S. 2017a. Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore. *Acta Physiol (Oxf)*, 219, 521-536.
- ROSENTHAL, R., GÜNZEL, D., THEUNE, D., CZICHOS, C., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2017b. Water channels and barriers formed by claudins. *Ann N Y Acad Sci*, 1397, 100-109.
- ROSENTHAL, R., MILATZ, S., KRUG, S. M., OELRICH, B., SCHULZKE, J. D., AMASHEH, S., GÜNZEL, D. & FROMM, M. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*, 123, 1913-21.
- RUDOLPHI, K., GERWIN, N., VERZIJL, N., VAN DER KRAAN, P. & VAN DEN BERG, W. 2003. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1beta converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 11, 738-46.
- SABAT, R., GRUTZ, G., WARSZAWSKA, K., KIRSCH, S., WITTE, E., WOLK, K. & GEGINAT, J. 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 331-44.
- SAITOU, M., FUJIMOTO, K., DOI, Y., ITOH, M., FUJIMOTO, T., FURUSE, M., TAKANO, H., NODA, T. & TSUKITA, S. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, 141, 397-408.
- SAITOU, M., FURUSE, M., SASAKI, H., SCHULZKE, J. D., FROMM, M., TAKANO, H., NODA, T. & TSUKITA, S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 11, 4131-42.
- SANCHEZ, C., DOMENECH, N., VAZQUEZ, J., ALONSO, F., EZQUERRA, A. & DOMINGUEZ, J. 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol*, 162, 5230-7.
- SANIN, D. E., PRENDERGAST, C. T., BOURKE, C. D. & MOUNTFORD, A. P. 2015a. Helminth Infection and Commensal Microbiota Drive Early IL-10 Production in the

- Skin by CD4+ T Cells That Are Functionally Suppressive. *PLoS Pathog*, 11, e1004841.
- SANIN, D. E., PRENDERGAST, C. T. & MOUNTFORD, A. P. 2015b. IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *J Immunol*, 195, 1218-32.
- SCHIERACK, P., NORDHOFF, M., POLLMANN, M., WEYRAUCH, K. D., AMASHEH, S., LODEMANN, U., JORES, J., TACHU, B., KLETA, S., BLIKSLAGER, A., TEDIN, K. & WIELER, L. H. 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol*, 125, 293-305.
- SCHUETZE, N., SCHOENEBERGER, S., MUELLER, U., FREUDENBERG, M. A., ALBER, G. & STRAUBINGER, R. K. 2005. IL-12 family members: differential kinetics of their TLR4-mediated induction by *Salmonella enteritidis* and the impact of IL-10 in bone marrow-derived macrophages. *Int Immunol*, 17, 649-59.
- SCHULTZ, S. G. 1972. Electrical Potential Differences and Electromotive Forces in Epithelial Tissues. *the journal of general Physiology* 59, 794-798.
- SCHWEINEGESUNDHEITSDIENST. 2014. Salmonellen beim Schwein. Beratungsempfehlungen der Schweinegesundheitsdienste. 4. Auflage.
- SHAO, Y., GUO, Y. & WANG, Z. 2013. beta-1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Poult Sci*, 92, 1764-73.
- SHEN, L., WEBER, C. R. & TURNER, J. R. 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol*, 181, 683-95.
- SIMONOVIC, I., ROSENBERG, J., KOUTSOURIS, A. & HECHT, G. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol*, 2, 305-15.
- SMITH, R. P., ANDRES, V., CHENEY, T. E., MARTELLI, F., GOSLING, R., MARIER, E., RABIE, A., GILSON, D. & DAVIES, R. H. 2018. How do pig farms maintain low *Salmonella* prevalence: a case-control study. *Epidemiol Infect*, 146, 1909-1915.
- SRINIVASAN, B., KOLLI, A. R., ESCH, M. B., ABACI, H. E., SHULER, M. L. & HICKMAN, J. J. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, 20, 107-26.
- STEED, E., RODRIGUES, N. T., BALDA, M. S. & MATTER, K. 2009. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biology*, 10, 95.
- STOLL, L. L. & SPECTOR, A. A. 1984. Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro*, 20, 732-8.
- TAFAZOLI, F., MAGNUSSON, K. E. & ZHENG, L. 2003. Disruption of epithelial barrier integrity by *Salmonella enterica* serovar typhimurium requires geranylgeranylated proteins. *Infect Immun*, 71, 872-81.
- TAMURA, A., HAYASHI, H., IMASATO, M., YAMAZAKI, Y., HAGIWARA, A., WADA, M., NODA, T., WATANABE, M., SUZUKI, Y. & TSUKITA, S. 2011. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*, 140, 913-23.
- TANNENBAUM, J. & BENNETT, B. T. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 54, 120-32.
- VALENZANO, M. C., DIGUILIO, K., MERCADO, J., TETER, M., TO, J., FERRARO, B., MIXSON, B., MANLEY, I., BAKER, V., MOORE, B. A., WERTHEIMER, J. & MULLIN, J. M. 2015. Remodeling of Tight Junctions and Enhancement of Barrier Integrity of the CACO-2 Intestinal Epithelial Cell Layer by Micronutrients. *PLoS One*, 10, e0133926.

- VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107, 1319–1327.
- VAN ITALLIE, C. M., ROGAN, S., YU, A., VIDAL, L. S., HOLMES, J. & ANDERSON, J. M. 2006. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, F1288-99.
- VERHOECKX, K., COTTER, P., LOPEZ-EXPOSITO, I., KLEIVELAND, C., TOR, L., MACKIE, A., REQUENA, T., SWIATECKA, D. & WICHERS, H. 2015. *The Impact of Food Bioactives on Health*, Springer.
- WHELAN, R. A., RAUSCH, S., EBNER, F., GÜNZEL, D., RICHTER, J. F., HERING, N. A., SCHULZKE, J. D., KÜHL, A. A., KELES, A., JANCZYK, P., NOCKLER, K., WIELER, L. H. & HARTMANN, S. 2014. A transgenic probiotic secreting a parasite immunomodulator for site-directed treatment of gut inflammation. *Mol Ther*, 22, 1730-40.
- XUE, Y., DU, M. & ZHU, M. J. 2017. Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by Escherichia coli O157:H7. *Free Radic Biol Med*, 108, 760-769.
- ZAKRZEWSKI, S. S., RICHTER, J. F., KRUG, S. M., JEBAUTZKE, B., LEE, I. F., RIEGER, J., SACHTLEBEN, M., BONDZIO, A., SCHULZKE, J. D., FROMM, M. & GUNZEL, D. 2013. Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium. *PLoS One*, 8, e79643.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

AIDA	engl. <i>Advanced Image Data Analyzer</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid assay</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Rinderserumalbumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>
Caco2bbe	engl. <i>colorectal adenocarcinoma cells with brush border enzymes</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CSF1	engl. <i>colony-stimulating factor 1</i>
Ctrl	Kontrolle
DTT	Dithiotreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	engl. extracellular loops
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPHO	Elektrophorese
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	fötale Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FITC	engl. <i>fluorescein isothiocyanate</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IfI	Institut für Immunologie
IfKP	Institut für Klinische Physiologie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPEC-J2	engl. <i>Intestinal Porcine Eptihelial Cells from Jejunum</i>
ITS	Insulin/Transferrin/Selenium
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KO	engl. Knockout
LB	engl. <i>Luria Bertani broth</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MC	engl. <i>Microfold Cells</i>

MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i>
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBM	engl. <i>pig bone marrow</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIGS	adultes Schweineserum, engl. <i>pig serum</i>
pIL	porzines Interleukin
PRR	Muster-erkennender Rezeptor, engl. <i>pathogen recognition receptor</i>
pSV	permanenter Schwenkvorgang
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rhM-CSF	rekombinanter humaner makrophagenstimulierender Faktor, engl. <i>recombinant human macrophages colony-stimulating factor</i>
RIPA	engl. <i>radio immuno precipitation assay</i>
R ^{leer}	Zellfiltersystemwiderstand
RT	Raumtemperatur
R ^t	Gesamtwiderstand aus Epithel und Zellfilter
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>
S. Typh.	mit <i>Salmonella Typhimurium</i> infizierte Probe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFB	Sonderforschungsbereich
SLA II	engl. <i>Swine Leukocyte Antigen II</i>
SPI1	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel 1
SPI2	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel 2
SWC1	engl. <i>Swine workshop cluster 1</i>
SWC9	engl. <i>Swine workshop cluster 9</i>
TBST	engl. <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TER	transepithelialer Widerstand
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TJ	engl. <i>tight junction</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Δ SPI1	<i>Salmonella Typhimurium</i> mit knockout der Pathogenitätsinsel 1
Δ SPI2	<i>Salmonella Typhimurium</i> mit knockout der Pathogenitätsinsel 2

9.2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ahmed Keles, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung eines in vitro-Kokultur-Modells zur Untersuchung der Interaktion von intestinalen Epithelzellen und Makrophagen bei Salmonellosen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9.3 Publikationsliste

Publikationen – Originalarbeiten

2014

- WHELAN, R. A., RAUSCH, S., EBNER, F., GÜNZEL, D., RICHTER, J. F., HERING, N. A., SCHULZKE, J. D., KÜHL, A. A., **KELES, A.**, JANCZYK, P., NOCKLER, K., WIELER, L. H. & HARTMANN, S. 2014. A transgenic probiotic secreting a parasite immunomodulator for site-directed treatment of gut inflammation. *Mol Ther*, 22, 1730-40

Publikationen – Tagungsbeiträge

2015

- *17th Transporter and Barrier Meeting 2015, 11.-13.05.2015, Bad Herrenalb, Deutschland*
Keles A, Tedin K, Schumann M, Rausch S, Ebner F, Bücken R, Schulzke JD, Günzel D. *Salmonella* Typhimurium affects the intestinal barrier through redistribution of claudin-4. **Poster**

2014

- *4. Doktoranden-Tag des Graduiertenkollegs IMMUCO, 07./08.11.2014, Berlin, Deutschland*
Keles A, Rausch S, Ebner F, Schumann M, Zakrzewski SS, Schulzke JD, Bücken R, Hartmann S, Moos V, Günzel D. Probiotic effects in an *in vitro* co-culture model. **Vortrag**

9.4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

9.5 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich ganz besonders bei **Prof. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel** für ihren Einsatz zur Initiierung dieses Kooperationsprojekts mit dem SFB 633 und ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Ausarbeitung des Forschungsthemas bedanken. Darüber hinaus gilt mein Dank ihr gegenüber vor allen für das in mich gesetzte Vertrauen und die umfassende Betreuung sowie Förderung und Unterstützung, die ich durch sie während der Gesamtdauer dieser Forschungsarbeit erwarren durfte. **Dr. med. Michael Schumann** danke ich für sein strukturiertes und zielführendes Mentoring. Auch **PD Dr. rer. medic. Rita Rosenthal** möchte ich für die vielen ermunternden und konstruktiven Gespräche danken. Ebenfalls ein besonderer Dank gilt dem Institutsleiter **Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke**, der mir stets bei der Lösung übergeordneter Probleme mit seinen Ratschlägen bereitstand und mir das Abschließen dieser Arbeit erst ermöglicht hat. **Prof. Dr. med. Michael Fromm** danke ich für die kritischen Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und für das stetige Aufzeigen weitere Möglichkeiten und Alternativen. **Dr. rer. nat. Verena Moos** und **Dr. rer. nat. Tina Kornprobst** danke ich für die Aufnahme im SFB 633 und den im Zuge dessen vielfältigen Möglichkeiten, an interessanten wissenschaftlichen Fortbildungen und Tagungen teilhaben zu dürfen. **PhD Rose Whelan** danke ich für die tolle kollegiale Zusammenarbeit und für meine Einführung in experimentelle Methoden der Immunologie. **Dr. rer. nat. Sebastian Rausch** und **Dr. rer. nat. Friederike Ebner** möchte ich für die stetige wissenschaftliche Unterstützung bei immunologischen Fragestellungen und der Hilfestellung bei der finalen Auswertung der immunologischen Daten meinen Dank aussprechen. Für die Beratung und die Einweisung in die Infektiologie bedanke ich mich vielmals bei **PD Dr. rer. nat. Roland Bücker**. Bei den technischen Mitarbeitern gilt ein besonders herzlicher Dank für die zuverlässige Unterstützung und labortechnische Einarbeitung an **Britta Jebautzke** und **Anja Fromm** sowie **Christiane Palissa** und **Yvonne Weber**. Ebenfalls möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung bei der Isolierung der PBM-Zellen bei **Bettina Sonnenburg** und **Marion Müller** bedanken. Auch bei **allen anderen Kollegen** aus beiden Instituten möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und schöne Zeit im Labor bedanken. Für die finanzielle Unterstützung während der experimentellen Phase möchte ich mich insbesondere beim **SFB 633** und für die Abschlussfinanzierung bei der **Sonnenfeld-Stiftung Berlin** bedanken. Mein größter Dank gilt jedoch meiner **Familie**, die mich stetig und beständig während aller Entwicklungsphasen begleitet, unterstützt, gestützt und ermutigt hat, den eingeschlagenen Weg weiter zu verfolgen sowie meiner **Frau Silke**, durch die ich vor allem im letzten Abschnitt dieses Wegs die meiste Unterstützung erfahren habe.