

Untersuchung der Effekte von  
*Enterococcus faecium* (probiotischer Stamm  
NCIMB 10415) und Zink auf die angeborene  
Immunantwort im Schwein

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.

2014

Bianca Franziska Hansche  
geb. Siepert

Untersuchung der Effekte von  
*Enterococcus faecium* (probiotischer Stamm  
NCIMB 10415) und Zink auf die angeborene  
Immunantwort im Schwein

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

BIANCA FRANZISKA HANSCHKE

geb. SIEPERT

Berlin, September 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2010 bis September 2013 in der Arbeitsgruppe von Dr. Karsten Tedin am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar. H. Wieler**

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
Robert-von-Ostertag-Str. 7-13  
14163 Berlin

**2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel**

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Biologie – Mikrobiologie  
Königin-Luise-Straße 12-16  
14195 Berlin

**Disputation am 29. September 2014**

*Meinen Eltern*

## Publikationsliste

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht in:

**Siepert B**, Reinhardt N, Kreuzer S, Bondzio A, Twardziok S, Brockmann G, Nöckler K, Szabó I, Janczyk P, Pieper R, Tedin K: *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 supplementation affects intestinal immune-associated gene expression in post-weaning piglets. *Vet Immunol Immunopathol* (2014) 157:65-77.

Twardziok, SO, Pieper R, Aschenbach JR, Bednorz C, Brockmann GA, Fromm M, Klingspor S, Kreuzer S, Lodemann U, Martens H, Martin L, Richter JF, Starke I, **Siepert BF**, Tedin K, Scharek-Tedin L, Vahjen W, Wieler LH, Zakrzewski SS, Zentek J, Wrede P: Cross-talk between host, microbiome and probiotics: A systems biology approach for analyzing the effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in piglets. *Mol Informatics* (in press). (2014).

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	5
1. Einleitung .....	8
1.1. Das intestinale Immunsystem .....	10
1.1.1. Immunologische Grundlagen – Aufbau .....	10
1.1.2. Intestinale Epithelzellbarriere .....	12
1.1.3. Mechanismen der angeborenen Immunantwort .....	13
1.1.4. Mechanismen der adaptiven Immunantwort .....	15
1.1.5. Pathogen-assoziierte Muster und Mustererkennungsrezeptoren .....	16
1.1.6. Toll-like Rezeptoren (TLRs) .....	17
1.1.7. Nod-like Rezeptoren (NLRs) .....	19
1.1.8. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) .....	22
1.1.9. Der Schlüssel-Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B .....	27
1.1.10. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine .....	31
1.1.11. Besonderheiten des Immunsystems bei Schweinen .....	35
1.2. Probiotika .....	37
1.2.1. Eingesetzte probiotische Stämme .....	38
1.2.2. Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe .....	39
1.2.2.1. Probiotika in der Schweinemast .....	41
1.2.3. Wirkmechanismen von Probiotika .....	42
1.2.3.1. Produktion von Stoffwechselmetaboliten und antimikrobiellen Substanzen .....	44
1.2.3.2. Einfluss auf die Enzymaktivität .....	45
1.2.3.3. Blockierung der Bindungsstellen oder Rezeptoren am Darmepithel .....	45
1.2.3.4. Wirkungen auf die Barrierefunktion des Darmepithels .....	47
1.2.3.5. Einfluss auf das Immunsystem .....	47
1.2.4. <i>Enterococcus faecium</i> .....	53
1.3. Zink .....	56
1.3.1. Biologische Bedeutung von Zink .....	56
1.3.2. Einfluss des Zinkstatus auf das Immunsystem .....	59
1.3.3. Zink als Futterzusatzstoff .....	61
1.4. Salmonellen .....	63
1.4.1. Charakterisierung der Salmonellen – Systematik, Nomenklatur und biochemische Eigenschaften .....	63
1.4.2. Epidemiologie der Salmonellose .....	63
1.4.3. Pathogenese der Salmonelleninfektion .....	64
1.4.4. Verfügbarkeit von Spurenelementen .....	69
1.5. Zielsetzung .....	74
2. Material .....	76

2.1.	Zelllinien.....	76
2.2.	Bakterienstämme .....	77
2.3.	Plasmide und Vektoren .....	78
2.4.	Oligonukleotide .....	79
2.5.	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	81
2.6.	Lösungen und Medien.....	82
2.7.	Kits.....	83
2.8.	Verbrauchsmaterialien .....	83
2.9.	Geräte.....	84
2.10.	Software.....	85
2.11.	Studiendesign .....	85
2.11.1.	<i>Enterococcus faecium</i> SF68 (NCIMB 10415).....	86
2.11.2.	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium DT104/Infektion der Versuchstiere mit <i>Salmonella</i> .....	86
2.11.3.	<i>Enterococcus faecium</i> SF68-Fütterungsversuch.....	87
2.11.4.	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch.....	88
2.11.5.	Zinkoxid-Fütterungsversuch.....	88
2.11.6.	<i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch .....	89
3.	Methoden .....	90
3.1.	Mikrobiologische Methoden.....	90
3.1.1.	Bakterienkultur.....	90
3.1.2.	Kryokonservierung von Bakterienstämmen.....	90
3.1.3.	Bakterienzellzahlbestimmung für Infektionsversuche.....	90
3.1.4.	Mutagenese nach Wanner und Datsenko .....	91
3.1.5.	Zellfreie Bakterienlysate.....	91
3.1.5.1.	Hitzeinaktivierung der zellfreien Bakterienlysate.....	92
3.1.5.2.	Proteinase K-Behandlung der zellfreien Bakterienlysate bzw. der intakten Bakterien .....	92
3.1.5.3.	Herstellung Gentamycin-abgetöteter <i>E. faecium</i> SF68-Suspensionen ....	92
3.2.	Zellbiologische Methoden.....	93
3.2.1.	Kultur und Subkultivierung eukaryotischer Zellen.....	93
3.2.2.	Zellzahlbestimmung .....	93
3.2.3.	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	94
3.2.4.	Gentamycin-Protection-Assay/Infektionsversuch .....	94
3.2.5.	Herstellung von NF-κB-Reporterzelllinien .....	96
3.2.6.	NF-κB-Aktivierungsassay.....	97
3.2.7.	Bakterienlysatversuche.....	99
3.2.7.1.	Verschiedene Varianten der Bakterienlysatversuche.....	101
3.2.8.	Zytotoxizitätsassay .....	103
3.2.9.	Zellviabilitätsassay.....	104
3.2.10.	Zellvitalitätsassay – MTS-Assay .....	105

3.3.	Molekularbiologische Methoden .....	105
3.3.1.	RNA-Extraktion (Organproben).....	105
3.3.2.	RNA-Extraktion (Blut) .....	106
3.3.3.	Reverse Transkription.....	106
3.3.4.	Real-time quantitative PCR.....	106
3.4.	Statistische Auswertung .....	108
3.4.1.	Zellkulturversuche.....	108
3.4.2.	Tierversuche - Quantitative Real-time PCR .....	109
4.	Ergebnisse .....	110
4.1.	Ergebnisse der Tierversuche.....	110
4.1.1.	<i>Enterococcus faecium</i> SF68-Fütterungsversuch.....	111
4.1.2.	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch.....	123
4.2.	Einfluss von <i>E. faecium</i> SF68 auf die Aktivierung des Schlüssel- Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B .....	131
4.2.1.	Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf die Inkubation mit intakten, lebenden <i>E. faecium</i> SF68.....	131
4.2.2.	Beeinflussung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 durch eine Vorinkubation der Zellen mit intakten, lebenden <i>E. faecium</i> SF68 .....	133
4.2.3.	Kurz- und langfristige Behandlung der Zellen mit intakten, Gentamycin- abgetöteten <i>E. faecium</i> SF68.....	135
4.3.	Ergebnisse der Bakterienlysatversuche.....	138
4.3.1.	Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließend Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 .....	139
4.3.2.	Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> TX0016 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließend Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 .....	145
4.3.3.	Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>S. aureus</i> ATCC 25904, ATCC 25923 und ATCC 29213, <i>E. coli</i> Nissle 1917 und <i>E. coli</i> K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden.....	148
4.3.4.	Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 und intakten, Gentamycin-abgetöteten <i>E. coli</i> K-12 MG1655 alleine und gemeinsam über 4, 24 und 48 Stunden mit nachfolgender Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 .....	151
4.3.5.	Beeinflussung der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	154
4.3.6.	Beeinflussung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	155
4.3.7.	Charakterisierung der für die Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen verantwortlichen Substanz.....	157
4.3.7.1.	Verwendung eines Aminosäure-Zusatzes .....	157
4.3.7.2.	Verwendung von täglich frisch hergestelltem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat....	158
4.3.7.3.	Hitzedenaturierung des <i>E. faecium</i> SF68-Lysates.....	161
4.3.7.4.	Proteinase K-Behandlung des <i>E. faecium</i> SF68-Lysates .....	163



4.3.7.5.	Lysozym-Behandlung des <i>E. faecium</i> SF68-Lysates.....	165
4.3.7.6.	Behandlung mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat und Zugabe von Katalase bzw. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK.....	166
4.3.7.7.	Behandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat bzw. MG-132, einem Inhibitor der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.....	168
4.4.	Untersuchung der möglichen zytotoxischen Effekte von zellfreiem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat.....	169
4.5.	Untersuchung der möglichen Effekte von zellfreiem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat auf die Viabilität der Zellen.....	172
4.6.	Untersuchung der möglichen Effekte von zellfreiem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat auf die metabolische Aktivität der Zellen.....	173
4.7.	Bestimmung der Invasionseffizienz und der intrazellulären Persistenz.....	175
4.7.1.	Untersuchung der $\Delta znuABC$ -Mutanten.....	176
4.7.2.	Untersuchung der $\Delta mntH$ -, $\Delta zraP$ - und $\Delta zur$ -Mutanten.....	178
4.7.3.	Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten.....	182
4.7.3.1.	Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten bei Zinkinkubation.....	185
4.7.3.2.	Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten bei Zinkinkubation sowie parallele Messung der durch die Infektion ausgelösten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.....	192
4.8.	Untersuchung der möglichen zytotoxischen Effekte von Zinksulfat bzw. Zinkchlorid.....	197
4.8.1.	Zinkoxid-Fütterungsversuch.....	199
4.8.2.	<i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch.....	210
5.	Diskussion.....	218
5.1.	Probiotika – <i>E. faecium</i> SF68.....	218
5.2.	<i>E. faecium</i> SF68-Tierversuche.....	220
5.3.	NF- $\kappa$ B-Aktivierungsassays und Bakterienlysatversuche.....	229
5.4.	Zusammenfassung – Wirkungsmechanismus von <i>E. faecium</i> SF68.....	247
5.5.	Zink.....	249
5.6.	Bestimmung der Invasionseffizienzen und intrazellulären Persistenzen der <i>Salmonella</i> -Deletionsmutanten.....	251
5.7.	Zinkoxid-Tierversuche.....	261
5.8.	Zusammenfassung – Wirkungsmechanismus von Zink.....	268
6.	Literaturverzeichnis.....	271
7.	Weitere Verzeichnisse.....	310
7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	310
7.2.	Abbildungsverzeichnis.....	317
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	322
8.	Lizenznummern.....	323
9.	Analyse auf Plagiarismus.....	324
10.	Danksagung.....	325

## Zusammenfassung

Die Besorgnis über die Entstehung bakterieller Resistenzen sowie vor einem möglichen Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen führte im Jahr 2006 zu einem europaweiten Verbot des Einsatzes von Antibiotika als Leistungsförderer in der Schweinemast. Aufgrund hoher Verlusten bei der Ferkelaufzucht, meist verursacht durch Durchfallerkrankungen vor allem in der Zeit vor dem Absetzen der Ferkel und wenige Tage danach, ist die Dringlichkeit hoch, Alternativen für Antibiotika zu finden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung spezieller Futterzusatzstoffe, beispielsweise von probiotischen Mikroorganismen, aber auch von Zink.

Probiotika fördern den Barriereeffekt der Darmflora, reduzieren die Besiedlung des Darms durch pathogene Bakterien, ihr Wachstum sowie die Stoffwechselaktivität und verhindern so ihre Ausbreitung. Die Immunantwort wird außerdem durch Probiotika unterstützt. Sie lösen u. a. die Bildung von Zytokinen und Antikörpern aus. Außerdem verfügen Probiotika über die Fähigkeit, die Zusammensetzung von Darmflora und Darmmilieu zu verändern.

Das essentielle Spurenelement Zink beeinflusst viele Aspekte des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Des Weiteren wurde für Zink eine bakterizide Wirkung beschrieben. Problematisch ist, dass eine pharmakologische Wirkung erst bei sehr hohen Konzentrationen (3000 – 6000 ppm) auftritt. In diesem Zusammenhang wurde schon über einige negative Folgen berichtet.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um das Teilprojekt B8 des DFG-Sonderforschungsbereichs SFB 852 „Ernährung und intestinale Mikrobiota – Wirtsinteraktion beim Schwein“ mit der Zielsetzung, die Effekte und Wirkungsweisen von Futterzusätzen (*Enterococcus faecium* SF68 [NCIMB 10415, Cyclatin<sup>®</sup>] und ZnO) auf die angeborene Immunantwort von Schweinen gegenüber intestinalen Pathogenen *in vivo* und im Infektionsmodell zu untersuchen. Als Infektionsmodell wurden die enteropathogenen Salmonellen verwendet. In vier unterschiedlichen Tierversuchen wurden Blut- und Gewebeproben entnommen und mittels quantitativer Real-time PCR die Genexpression immunrelevanter Gene in Kontroll- und Versuchsgruppen überprüft. Dabei wurde die Genexpression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-8, IL-10), die des kostimulatorischen Proteins CD86 (T-Zell-Aktivierung) und des inhibitorischen Proteins CTLA4 (T-Zell-Anergie) untersucht. Daneben wurden auch intrazelluläre (Nod1, Nod2) sowie sezernierte (PGLYRPs) Erkennungsproteine für Peptidoglykan untersucht.

Im *E. faecium* SF68-Fütterungsversuch konnte während der Periode vor dem Absetzen in intestinalen Geweben eine pro-inflammatorische Immunantwort auf geringem Niveau, charakterisiert durch eine erhöhte Genexpressionsrate von IL-8/CXCL8, beobachtet werden. Nach dem Absetzen konnte ein Wechsel hin zu einer anti-inflammatorisch ausgerichteten Immunantwort detektiert werden. Diese wurde durch signifikant reduzierte Expressionen von IL-8 und CD86 in den ilealen Peyer'schen Platten der Probiotika-Tiere im Vergleich zu den

Kontrolltieren sichtbar. Insgesamt scheint es eine altersabhängige Genexpression von IL-8 zu geben, bei der das Absetzen der Ferkel eine entscheidende Rolle spielt. Teile dieser Ergebnisse wurden schon veröffentlicht (Siefert *et al.*, 2014; Twardziok *et al.*, 2014).

Die Beobachtungen und Ergebnisse aus den Tierversuchen mit *E. faecium* SF68 (Fütterungsversuch und *Salmonella* challenge Versuch) konnten insgesamt zeigen, dass eine anhaltende Fütterung von Sauen und ihren Ferkeln mit dem probiotischen Stamm *E. faecium* SF68 zu einer anti-inflammatorischen bzw. immunsuppressiven Immunantwort in den Ferkeln führt, welche vor allem in der Phase nach dem Absetzen sichtbar wird. Beispielsweise könnten die im *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch detektierten erhöhten Bakterienlasten, die reduzierte bzw. verzögerte Proliferationsantwort der PBMCs als Antwort auf *Salmonella*-Antigene, aber auch die Veränderungen bei den Immunzellpopulationen nach Fütterung der Tiere mit *E. faecium* SF68 durch eine anti-inflammatorische Wirkung von *E. faecium* SF68 erklärt werden.

Parallel zu den *In-vivo*-Versuchen wurden permanente porcine intestinale Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnliche Zellen (3D4/31; PLN/C2) verwendet, die chromosomal-integrierte, NF- $\kappa$ B-abhängige Reporterkonstrukte enthalten, um so eine Untersuchung der Effekte des Probiotikums, der zellfreien Bakterienlysate oder von anderen Futterzusatzstoffen (Zink) auf die angeborene Immunantwort in den Wirtszellen zu ermöglichen.

Insgesamt scheinen die zellfreien *E. faecium* SF68-Lysate einen starken inhibitorischen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in porcinen Zellen zu haben. Es konnte eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung deutlich unter das basale Level der unbehandelten Zellen beobachtet werden. Diese Inhibierung lässt sich in den IPEC-J2 durch keinen eingesetzten Stimulus (*S. Typhimurium*-Infektionen, LPS- oder TNF- $\alpha$ -Zugabe bzw. *E. coli*-Bestandteile) im beobachteten Zeitraum wieder aufheben. Um die bakterielle Komponente aus dem zellfreien *E. faecium* SF68-Lysat, welche für den anti-inflammatorischen Effekt verantwortlich ist, enger einzukreisen, wurden verschiedene Untersuchungen zur näheren Charakterisierung gemacht. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf eine proteinhaltige, relativ hitzebeständige Struktur zurückgeht. Die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist sowohl abhängig von der eingesetzten Konzentration als auch der Behandlungsdauer und scheint größtenteils irreversibel im untersuchten Zeitraum zu sein. Es konnte weiter gezeigt werden, dass weder zytotoxische Effekte noch apoptotische Vorgänge für die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich sind. Aufgrund der lang anhaltenden Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt es vermutlich zu einer Dysregulation der Genexpression verschiedener NF- $\kappa$ B-Zielgene, was auch der Grund für eine verminderte metabolische Aktivität der Zellen sein könnte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die inhibitorische Aktivität einer Protein-Komponente im *E. faecium* SF68-Lysat nicht nur die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf eine Infektion mit *Salmonella*, LPS oder TNF- $\alpha$

verhindert, sondern auch zu einer starken Inhibierung der Zellproliferation führt (persönliche Mitteilung, Dr. Karsten Tedin).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Charakteristika (Protein bzw. proteinhaltige Struktur, relativ hitzestabil, Proteinase K-sensitiv) der für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlichen Substanz könnten auf ein *Enterococcus* Enterozin hinweisen. In der Literatur konnte schon für unterschiedliche Bakteriozine/Enterozine eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Wirkungsweise von Zink auf die angeborene Immunantwort im Schwein wurde zunächst überprüft, welchen Effekt die Deletion verschiedener Gene bzw. die Gabe von exogenem Zink auf die Virulenz und Pathogenese von *S. Typhimurium* hat. Dazu wurden  $\Delta znuA$ -,  $-B$ - und  $-BC$ -,  $\Delta zur$ -,  $\Delta zraP$ -,  $\Delta mntH$ -,  $\Delta zirS$ -,  $\Delta zirT$ - und  $\Delta zirTS$ -Deletionsmutanten hergestellt und hinsichtlich ihrer Invasioneffizienzen und intrazellulären Persistenz in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, PLN/C2) überprüft. Diese Gene codieren für ein Zink-Aufnahmesystem (ZnuABC) und den dazugehörigen Repressor (Zur), ein zinkabhängiges NRAMP-Homolog (MntH), welches ein Metallionen-Transporter ist, ein Protein (ZraP), welches in die Zink-Toleranz involviert ist sowie ein alternatives, von der Zink-Konzentration im umgebenden Medium abhängiges Sekretionssystem (ZirTS). Insgesamt zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Deletionsmutanten, dass es viele zinkabhängige Systeme mit essentieller Bedeutung in *S. Typhimurium* gibt. Diese Beobachtungen sind die Grundvoraussetzung für einen sinnvollen Einsatz von Zink als vorbeugende Maßnahme gegenüber bakteriellen Infektionen.

Im nächsten Schritt wurde innerhalb eines Zinkoxid-Fütterungsversuches und eines *Salmonella* challenge Versuches die Expression verschiedener immunrelevanter Gene (IL-8, IL-10, CD86, PGLYRP-1, -2A und 2B, Nod1 und Nod2) überprüft und damit die Bedeutung von Zink auf die Expressionsraten dieser Gene untersucht. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Zinkoxid-Fütterung nach dem Absetzen zu einer eher anti-inflammatorisch ausgerichteten Immunantwort führt. Bei einer Infektion mit *Salmonella* 32 Tage *post partum* konnten zwei Tage *post infectionem* in den Geweben der intestinalen Wand, mit Ausnahme der ilealen Peyer'schen Platten in Gruppe C, wo die Expression von IL-8 signifikant erhöht war, keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich einer Zinkoxid-Fütterung beobachtet werden. Zum späten Zeitpunkt, 42 Tage *post infectionem*, konnte dagegen eine, zum Teil auch signifikant, erhöhte Expression von IL-8, der PGLYRPs und der Nod-Proteine in den Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) und den mesenterialen Lymphknoten beobachtet werden. Dies deutet auf eine starke inflammatorische Immunantwort sowie eine erhöhte Translokation des gastrointestinalen Pathogens hin.

Insgesamt konnten die Resultate der vorliegenden Arbeit einen Wirkmechanismus von *E. faecium* SF68 aufzeigen, der viele der zuvor in anderen Studien gesehenen Ergebnisse

erklären könnte. Ferner konnte auch für die Gabe/Fütterung von Zink sowohl eine Auswirkung auf den Modellorganismus (*S. Typhimurium*) als auch auf die Genexpression immunrelevanter Gene im Schwein beobachtet werden.

## Summary

The worldwide concern about the development of antimicrobial resistance and the possibility of a transfer of antibiotic resistance genes led to banning the use of antibiotics as growth promoters in swine production in the European Union since January 1, 2006. Due to the high number of piglet losses - mainly caused by diarrhea during the weaning period - viable alternatives to antibiotics are needed. One possibility is the use of specific feed additives such as probiotics or zinc.

Probiotics enhance the barrier effect of the intestinal flora, reduce pathogenic bacterial colonization of the intestine, their growth and metabolic activity and prevent their distribution. Another mode of action is the modulation and support of the hosts immune response. The administration of probiotics induces the production of cytokines and antibodies, amongst others. In addition, probiotics have the ability to modulate the composition of the intestinal flora and alter the intestinal environment.

Zinc is an essential trace element and exhibits a strong effect on both, the innate as well as the adaptive immune system. Antibacterial activity of zinc was also described. The main problem for the use of zinc as an alternative growth promoter is that pharmacological effects occur only with unusually high concentrations (3000 – 6000 ppm). In this context different negative effects have already been reported.

This project was part of the Collaborative Research Group (SFB) 852 “Nutrition and intestinal microbiota - host interactions in the pig” with the major goals to determine the effects and mechanisms of feed additives (*E. faecium* SF68 [NCIMB 10415, Cyclatin®] and ZnO) on innate immune responses to intestinal pathogens in swine both *in vivo* and using a *Salmonella* infection model. In four different animal trials, tissue and blood samples were taken from the piglets and analyzed using Real-Time quantitative PCR to determine the gene expression of immunologically relevant genes in control and experimental groups. The gene expression of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-8, IL-10), T-cell co-stimulatory protein CD86 (T cell activation) and inhibitory protein CTLA4 (T cell anergy) were studied. In addition, both intracellular (Nod1, Nod2) and secreted (PGLYRPs) Peptidoglycan Recognition Proteins were also examined.

In feeding trials of sows and piglets with the probiotic *E. faecium* NCIMB 10415 (SF68) we observed an apparent low-level inflammatory response in intestinal tissues of pre-weaning piglets in the probiotic group (age 12 and 26 days *post partum*) as indicated by elevated levels of the pro-inflammatory chemokine IL-8/CXCL8. Post-weaning however, a switch to an apparent anti-inflammatory response was observed, characterized by significantly reduced levels of IL-8 and CD86 in ileal Peyer’s patches relative to control animals, suggesting a post-weaning anti-inflammatory response. Furthermore there appeared to be an age-

dependent gene expression of IL-8 in which weaning plays a key role. Portions of this work have already been published (Siepert *et al.*, 2014; Twardziok *et al.*, 2014).

The results and observations of the clinical trials (*E. faecium* SF68 feeding trial, *Salmonella* challenge study) strongly suggest that prolonged supplementation of sows and piglets with *E. faecium* SF68 probiotic strain results in a local, anti-inflammatory or immunosuppressive response in intestinal mucosal tissues which becomes highly apparent post-weaning. These results provide a mechanism explaining prior observations made with *E. faecium* NCIMB 10415 regarding higher bacterial loads and shedding in two, independent *Salmonella* challenge studies, reduced or delayed cytotoxic effects of PBMC preparations *in vitro*, as well as changes in populations of regulatory T cells and cytolytic CD8 $\beta$ <sup>+</sup> T cells.

In parallel to the *in vivo* studies, permanent porcine intestinal epithelial (IPEC-J2) and macrophage cell lines (3D4/31; PLN/C2) harbouring chromosomally-integrated, NF- $\kappa$ B-dependent reporter fusions were used to determine the effects of probiotics, their products (*E. faecium* SF68 lysates - cell wall components, *etc.*), and other feed supplements (zinc) on host innate immune responses.

I show in this work that cell-free lysates of *E. faecium* SF68 have a strong inhibitory effect on NF- $\kappa$ B activation in porcine intestinal epithelial and macrophage cell lines. *E. faecium* SF68 suppressed the activity of NF- $\kappa$ B below the basal levels of expression in untreated cells. This inhibitory activity also prevented the activation of NF- $\kappa$ B in response to different stimuli such as *Salmonella* infections, Gram-negative LPS, TNF- $\alpha$ , *E. coli* cell components. To further characterize the component responsible for the inhibitory effect on NF- $\kappa$ B activation, several studies were performed.

In summary, it is clear that a relatively heat-resistant protein product of *E. faecium* SF68 is responsible for the inhibitory effects on NF- $\kappa$ B activation. The effect depends on the applied concentration as well as the duration of the treatment and appears to be irreversible during the period examined. Assays for cell cytotoxicity as well as apoptosis demonstrate that these effects played no role in the inhibition of NF- $\kappa$ B activation through *E. faecium* SF68. The prolonged inhibition of NF- $\kappa$ B activation likely leads to a dysregulation of the gene expression of different NF- $\kappa$ B target genes, explaining a reduced metabolic activity of lysate treated cells. The inhibitory activity of the protein product of *E. faecium* SF68 also strongly inhibits cell proliferation, as determined by antibody staining against the proliferation marker Ki67 (personal communication, Dr. Karsten Tedin). Different characteristics determined in this study of the component responsible for the inhibitory effect (protein product, heat-resistant, sensitive to Proteinase K) may indicate an *Enterococcus* Enterocine, consistent with prior studies showing inhibitory effects of different Bacteriocines/Enterocines on NF- $\kappa$ B activation. To investigate the effects of zinc on innate immune response and with regard to the zinc supplementation trials, a number of directed deletion mutants in genes involved in zinc transport and regulation in *Salmonella* Typhimurium were constructed to determine whether

the virulence and/or pathogenesis of *Salmonella* could be affected by exogenous zinc as a feed supplement. Mutants were constructed with deletions for the genes *mntH*, *znuA*, *znuB*, *znuBC*, *zur*, *zraP*, *zirS*, *zirT*, or *zirTS*, and were tested in *in vitro* infection assays to determine the effects on host cell invasion and intracellular growth within the porcine intestinal epithelial cell line IPEC-J2 and porcine macrophage cell lines 3D4/31 and PLN/C2. The investigated genes encode for a high-affinity zinc uptake system (ZnuABC) and its regulator (Zur), a zinc-dependent NRAMP homologue (MntH) which is a divalent metal ion transporter, a protein involved in zinc tolerance (ZraP) as well as for a new alternative secretion system (ZirTS) whose expression is dependent on zinc. Overall, the results of these assays showed many essential zinc-associated systems in *S. Typhimurium*, and that the virulence and/or pathogenesis of *Salmonella* could be affected by exogenous zinc. This observation is an important prerequisite for the use of zinc as a preventative measure against bacterial infections.

In a further study *in vivo*, I investigated the gene expression levels of different immunologically relevant genes (IL-8, IL-10, CD86, PGLYRP-1, -2A und 2B, Nod1 and Nod2) during a zinc supplementation and *Salmonella* challenge ZnO trial in order to study the relevance of additional zinc treatment.

Overall, the results indicate that high zinc supplementation leads to an anti-inflammatory immune response post-weaning. After an infection with *S. Typhimurium* 32 days *post partum* no differences regarding zinc supplementation could be observed in the expression of immunologically relevant genes in intestinal tissues 2 days *post infectionem*, with the exception of the ileal Peyer's Patches in one of the supplemented groups, where the gene expression of IL-8 was significantly increased. Interestingly, at the latest time point, 42 days *post infectionem*, increased gene expression of IL-8, PGLYRPs and Nod proteins in tissues of the intestinal wall (IlePP, JePP) and mesenteric lymph nodes was observed. This is suggested to reflect an inflammatory immune response and an increased translocation of the gastrointestinal pathogen.

In summary, the results of the present work provide a mechanism explaining many prior observations made with the probiotic *E. faecium* SF68. Moreover, it was found that zinc supplementation/treatment affects both host invasion and persistence of *S. Typhimurium* as well as gene expression of immunologically relevant genes in a porcine model.



## 1. Einleitung

Bei der Aufzucht von Lebensmittel liefernden Tieren steht die Bereitstellung von sicherer Nahrung unter Einbeziehung des Wohls der Tiere im Vordergrund. Um dies zu gewährleisten wurden bis Ende 2005 Antibiotika in subtherapeutischen Konzentrationen als Wachstumsförderer (*Antibiotic Growth Promoters*, AGPs) in der Schweinemast eingesetzt [1]. Seit dem 1. Januar 2006 sind sie laut EG-Verordnung Nr. 1831/2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung europaweit verboten. Zu diesem Schritt führte die weltweite Besorgnis über die Entstehung bakterieller Resistenzen und die Angst vor einem möglichen Transfer der Antibiotika-Resistenzgene [1–3]. Das Verbot dieser Leistungsförderer hätte daher in den folgenden Jahren zu einem drastischen Umsatzrückgang bei den Veterinärantibiotika führen müssen. Dazu kam es allerdings nicht [4]. Im ersten Jahr nach dem Inkrafttreten des Verbots stieg der Antibiotika-Umsatz in Deutschland um 7 % und im folgenden Jahr noch einmal um 9,2 % [5]. Das Verbot der Wachstumsförderer führte letztendlich dazu, dass der Antibiotika-Einsatz zu therapeutischen Zwecken in den Tierzuchtbetrieben erheblich stieg [4, 5]. Antibiotika werden heute in der Veterinärmedizin zur Therapie und Metaphylaxe von Infektionskrankheiten eingesetzt. So ist es bei der Infektion einzelner Tiere im Stall immer noch möglich, alle Tiere zu behandeln, unter der Voraussetzung, dass sicher angenommen werden kann, dass ansonsten die gesamte Herde erkrankt (Metaphylaxe) [5]. Bei der Schweinezucht ist der kritische Punkt die Ferkelaufzucht bzw. genauer definiert die Zeit vor dem Absetzen der Ferkel und wenige Tage danach [6]. Etwa 20 % der Ferkel sterben in diesen Tagen [7]. Häufigste Ursachen sind Durchfallerkrankungen, die durch *Escherichia coli* oder das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGV) verursacht werden [8, 9]. In der darauffolgenden Mastphase liegt die Mortalitätsrate zwar deutlich niedriger, zu einem wirtschaftlichen Verlust kommt es aber trotzdem. Dementsprechend ist es dringend notwendig nach Alternativen für Antibiotika zu suchen, um die Verlusten aufgrund von Durchfallerkrankungen in der Ferkelproduktion zu verringern und allgemein den Gesundheitsstatus der Tiere sowie die Produktionseffizienz zu steigern [10]. Eine Möglichkeit ist der Einsatz von spezifischen Futterzusatzstoffen, um so die natürlichen Abwehrmechanismen der Tiere zu stärken, die Tiergesundheit positiv zu beeinflussen und den massiven Einsatz von Antibiotika in der Tierzucht zu verringern [11, 12].

Der Darm übernimmt wichtige Aufgaben im Bereich der Immunabwehr, beispielsweise bildet die Darmschleimhaut die größte Menge an Antikörpern. Eine ausbalancierte Darmflora stellt eine effektive Barriere gegen eine Besiedlung durch pathogene Bakterien dar. In diesem Zusammenhang sind Probiotika, aber auch Prebiotika und Synbiotika eine mögliche Lösung. Die Hauptwirkungen dieser Futterzusätze sind die verbesserte Widerstandskraft gegenüber einer intestinalen Besiedlung durch pathogene Bakterien und eine verstärkte intestinale

Immunabwehr [13–15]. Dies führt zu einer verringerten pathogenen Bakterienlast und so zu einem verbesserten Gesundheitsstatus der Tiere sowie einem reduzierten Risiko der Aufnahme von Krankheitserregern durch Lebensmittel für den Menschen. Probiotika erfreuen sich auch in der Humanernährung zunehmender Beliebtheit. Neben den positiven Effekten auf den Magen-Darm-Trakt wurden Probiotika auch schon in der Allergie-Vorbeugung eingesetzt. Desweiteren zeigten Untersuchungen am Menschen die Wahrscheinlichkeit eines protektiven Effektes von probiotischen Bakterien gegenüber einem Kolonkarzinom [16]. Unter den zahlreichen eingesetzten probiotischen Bakterienstämmen sind die wichtigsten Vertreter die Milchsäurebakterien. In Verbindung mit Lebensmitteln werden vor allem Stämme aus den Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Streptococcus* verwendet [17].

Ein möglicher Kandidat für die Verwendung als Probiotikum in der Schweinemast ist *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415), welcher in der europäischen Union als Futterzusatzstoff zugelassen ist. In Studien konnte beobachtet werden, dass eine Fütterung von *Enterococcus faecium* SF68 die Durchfallerkrankungen bei Absatzferkeln reduziert [18, 19]. Eine weitere Studie hat ein verringertes Auftreten von *Escherichia coli*-Serotypen beobachtet, die typischerweise für Durchfallerkrankungen während der Absetzperiode verantwortlich sind [20]. Daneben konnten Pollmann *et al.* in Fütterungsversuchen mit Ferkeln zeigen, dass *E. faecium* SF68 zu einer verringerten Übertragungsrate von *Chlamydia* vom Muttertier auf das Ferkel führt [21].

Diese positiven Effekte gegenüber natürlichen Infektionen konnten bei einer Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Pathogen *Salmonella* Typhimurium nicht gezeigt werden. Studien zeigten eine erhöhte bakterielle Last in der zuvor mit *Enterococcus faecium* SF68 gefütterten Versuchsgruppe [22]. Trotz der vielen durch Studien belegten gesundheitsfördernden Effekte von *Enterococcus faecium* SF68 ist der Wirkmechanismus dieses probiotischen Bakteriums nach wie vor wenig erforscht.

Neben der Verwendung von Probiotika wurde in den vergangenen Jahren auch versucht, durch erhöhte Gaben von Kupfer oder Zink der hohen Mortalitätsrate bei Ferkeln direkt vor und nach dem Absetzen entgegenzuwirken. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von pharmakologischen Mengen Zinkoxid (ZnO) die Stabilität der intestinalen Mikroflora unterstützt und sich so vorbeugend auf das Durchfallgeschehen bei Ferkeln auswirkt [23, 24]. Auch aus der Humanmedizin ist bekannt, dass Zinkoxid z. B. als Salbe auf der Haut antibakteriell und antiviral wirkt. Relativ zur weiten Bandbreite der Verwendung von hohen Zinkoxid-Konzentrationen in der Tierernährung existieren allerdings nur wenige *In-vivo*-Studien, die sich mit dem Einfluss von Zinkoxid auf intestinale Mikrobiota beschäftigen. Übliche Futtermittel enthalten 50 – 100 ppm ZnO [25]. Damit kann der normale Bedarf an Zink bei Schweinen gedeckt werden. Das dem Futtermittel zugesetzte wasserunlösliche ZnO wird im Magen der Schweine durch die dort gebildete Salzsäure in Zinkchlorid umgewandelt.

Das gelöste Zinkchlorid wird im Dünndarm zum Teil resorbiert, überschüssige Mengen werden allerdings ausgeschieden. Deutlich über dem eigentlichen Bedarf liegende Konzentrationen von ZnO (2000 – 3000 ppm) werden den Ferkeln in der Absatzperiode verabreicht. Diese hohen Dosierungen im Futter zeigen positive Effekte auf Darmwand, intestinale Mikrobiota, das darmassoziierte Immunsystem sowie die gewünschte Verringerung von Durchfallerscheinungen bei Ferkeln [26–28]. Hier geht man davon aus, dass die im Magen der Absatzferkel gebildete Salzsäure nicht ausreicht, die gesamte Menge Zinkoxid in wasserlösliches Zinkchlorid umzuwandeln. Daher gelangt ein Teil auch als Zinkoxid in den Dünndarm und übt dort seine bakterizide Wirkung aus. Der Einsatz von Zinkoxid-Mengen im Bereich zwischen 2000 und 3000 ppm ist allerdings über einen längeren Zeitraum verboten. So konnte gezeigt werden, dass es bei Fütterung dieser hohen Zinkoxid-Mengen zu einer verringerten Futteraufnahme sowie damit verbunden einer reduzierten Gewichtszunahme kommt [29]. Des Weiteren kommt es durch die Ausscheidung hoher Zinkmengen zu negativen Einflüssen auf die Umwelt [30].

### **1.1. Das intestinale Immunsystem**

#### **1.1.1. Immunologische Grundlagen – Aufbau**

Neben seiner zentralen Funktion als Verdauungsorgan erfüllt der Darm weitere wichtige Aufgaben, beispielsweise im Bereich der Immunabwehr von pathogenen Keimen. Der menschliche Darm hat eine Oberfläche von etwa 200 m<sup>2</sup> und stellt so eine riesige Kontaktfläche zur Umwelt dar [31]. Tagtäglich wird der Gastrointestinaltrakt einer Vielzahl von fremden Antigenen (Nahrungsantigene, Mikroorganismen) ausgesetzt. Der Schutz vor potentiell schädigenden Substanzen wird durch ein einzigartiges, komplexes Netzwerk aus immunologischen und nicht-immunologischen Mechanismen, welche oft als gastrointestinale Mukosabarriere bezeichnet werden, ermöglicht. Dabei ist die Balance zwischen dem Schutz des Wirtsorganismus vor potentiell schädigenden Pathogenen und der Toleranz gegenüber residenten Mikroorganismen, welche für die Absorption und Verwertbarkeit von Nährstoffen eine wichtige Rolle spielen, von entscheidender Bedeutung [32]. Pathogene Keime müssen mit einer entsprechenden Antikörper- und zellvermittelten Immunreaktion bekämpft werden. Auf apathogene Bakterien reagiert der Organismus mit einer sogenannten oralen Toleranz, die von großer Bedeutung ist, um eine chronische Manifestation einer Entzündungsreaktion zu verhindern. Die kommensalen Darmbakterien besitzen die Fähigkeit, für den Menschen unverdauliche Nahrungsbestandteile abzubauen und erweitern so die Nutzbarkeit für den Menschen. Allerdings hat das intestinale Immunsystem auch eine bedeutende Rolle bei der Limitierung der Gewebeinvasion durch residente Mikroorganismen, um so die symbiotische Natur dieser Interaktion zu erhalten [31]. Bakterien stellen die größte und wichtigste Gruppe von Mikroorganismen dar, welche den Gastrointestinaltrakt besiedeln. Der Darm eines Erwachsenen beherbergt etwa 10<sup>14</sup> kommensale Bakterien [33] und 400 – 500 verschiedene

Bakterienspezies, davon sind allerdings nur 30 – 40 Spezies dominant vorkommend [31, 34]. Zu den dominierenden Spezies gehören *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* sowie einige grampositive Kokken. *Enterobacteriaceae* und *Enterococcus* kommen dagegen nur in geringen Zahlen vor [35].

Die epitheliale Barriere besteht aus einer dicken Mukosaschicht, epithelialen und nicht-epithelialen Zellen [36, 37]. Das Epithelium besteht nur aus einer einzigen Schicht säulenförmiger Zellen (absorptive Enterozyten; Saumzellen), die einerseits als physikalische Barriere dienen und andererseits die Aufnahme von Nährstoffen ermöglichen [37]. Darunter liegen die *Lamina propria mucosae* (Bindegewebsschicht) und die epitheliale Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*). Typische intestinale Epithelzellen besitzen Mikrovilli, einen filamentösen Bürstensaum sowie eine Glykokalix an der apikalen Seite [38]. In der *Lamina propria* gibt es Herde von organisiertem lymphatisches Gewebe, das sogenannte "mucosa-associated lymphoid tissues" (MALT). Dieses spezialisierte Gewebe ist als Teil des Darm-assoziierten Lymphgewebes (*gut-associated lymphoid tissues*, GALT) über den gesamten Gastrointestinaltrakt verteilt. Ganze Aggregate von Lymphfollikeln kommen hier vor. Die breiteste Ausdehnung erreichen sie in der Wand von Ileum und *Appendix vermiformis* (*Noduli lymphoidei aggregati*, Peyer-Plaques). Die Peyer'schen Platten bestehen aus unterschiedlichen Kompartimenten und enthalten hauptsächlich follikular dendritische Zellen (FDC), B-Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten [39]. Sie besitzen im Gegensatz zu Lymphknoten keine afferenten Lymphgefäße, die Aufnahme von Antigenen findet hier über spezialisierte Epithelzellen statt [40]. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Antigenerkennung und Lymphozyten-Aktivierung. Es wird davon ausgegangen, dass die *Lamina propria* des Intestinums mehr Antikörper-produzierende B-Zellen als alle anderen Organe des Körpers inklusive Milz, Thymus und Lymphknoten enthält [41]. Über dem MALT liegt das Follikel-assoziierte Epithel (FAE). Dieses Gewebe ist auf die Aufnahme von Antigenen und Mikroben aus dem Darmlumen spezialisiert und weist mehrere Besonderheiten auf. Die Zotten, Krypten und Becherzellen fehlen. Daneben ist die Muzinschicht nur sehr dünn oder fehlt ganz. Die physiologischen Charakteristika erleichtern den Kontakt zu den luminalen Antigenen/Pathogenen [42]. Nur im FAE der Peyer'schen Platten kommen spezialisierte intestinale Epithelzellen, sogenannte M-Zellen (*microfold* oder *membranous*, M) vor [39]. Die M-Zellen transportieren partikuläre Antigene und Mikroorganismen vom Darmlumen transepithelial zu organisiertem Lymphgewebe in die intestinale Mukosa [42, 43]. Sie weisen einen auf ihre Funktion abgestimmten charakteristischen Aufbau auf. An ihrer Oberfläche befinden sich im Gegensatz zu normalen Enterozyten weniger und auch kürzere Mikrovilli [43]. Das Kennzeichen der M-Zellen ist allerdings die Anwesenheit einer ungewöhnlichen Subdomäne auf der basolateralen Seite, welche die Zelloberfläche vergrößert und eine intraepitheliale Tasche bildet [44]. Die taschenartige Invagination enthält eine Andockstelle für spezielle Subpopulationen

intraepithelialer Lymphozyten [45, 46] und verkürzt die Distanz, welche die transzytotischen Vesikel zwischen apikaler und basolateraler Seite zurücklegen müssen [47]. In dieser Tasche befinden sich neben Lymphozyten (z. B. B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen) auch dendritische Zellen und Makrophagen. Eine Anwesenheit von pathogenen Mikroorganismen, beispielsweise von *Salmonella* erhöht die Anzahl der M-Zellen [48, 49]. Allerdings nutzt *Salmonella*, wie andere Pathogene auch, M-Zellen um in den Wirtsorganismus einzudringen [50]. Sansonetti *et al.* (2002) zeigten, dass *S. Typhimurium* sich mit Hilfe von langen Fimbrien an murine M-Zellen anlagert und es zu einem sogenannten Membran-Ruffling und nachfolgend zu einer Makropinozytose kommt [51].

Das GALT setzt sich aus zwei funktionellen Teilen, dem efferenten und dem afferenten Schenkel zusammen. Dabei besteht der efferente Teil hauptsächlich aus diffus in der *Lamina propria* verteilten Lymphozyten (*lamina propria lymphocytes*, LPL) sowie zwischen den Epithelzellen oberhalb der Basalmembran befindlichen intraepithelialen Lymphozyten (*intraepithelial lymphocytes*, IEL). Der afferente Schenkel besteht im Wesentlichen aus organisiertem Lymphgewebe, den Peyer'schen Platten des Dünndarms und anderen Lymphfollikeln, welche mit dem FAE assoziiert sind [32].

Die mesenterialen Lymphknoten (mLN) befinden sich im Mesenterium des Darms. Die verschiedenen löslichen Antigene sowie die von den dendritischen Zellen bereits prozessierten Antigene wandern über die afferente Lymphe in die mLN. Antigen-beladene dendritische Zellen aus den Peyer'schen Platten gelangen ebenfalls in die mLN [52]. Macpherson *et al.* zeigten 2004, dass nach Entnahme der mLN kommensale Bakterien in der Milz zu finden waren. Folglich nehmen die mLN eine entscheidende Funktion bei der Aufrechterhaltung der symbiontischen Beziehung und der Begrenzung kommensaler Mikroorganismen ein [53]. Daneben scheinen die mLN eine wichtige Rolle bei der Toleranzentwicklung zu haben [54].

### 1.1.2. Intestinale Epithelzellbarriere

Die intestinale Mukosa ist ein Faktor der Darmbarriere. Das intestinale Epithel verfügt über eine Vielzahl physikalischer und biochemischer Anpassungen, um die Kontaktfläche zwischen luminalen Mikroorganismen und Wirt zu minimieren. Weitere Faktoren für einen erfolgreichen Schutz gegenüber schädigenden Pathogenen sind an der Grenzschicht der Enterozyten physiko-chemische Bedingungen, wie z. B. das Vorhandensein von Magensäure, Gallensalzen, proteolytischen Enzymen, eine dicke Schleimschicht oder auch intakte *tight junctions* [55]. Die epitheliale Plasmamembran ist undurchlässig für hydrophobe Substanzen, sofern kein spezialisierter Transporter vorhanden ist. Allerdings ist es notwendig, den parazellulären Transport zwischen den Zellen zu kontrollieren. Dazu dienen die *tight junctions* und die darunterliegenden *adherens junctions* [56]. Die *tight junctions* sind mit Aktin-reichen mikrovillösen Verlängerungen (Mikrovilli) gekoppelt, welche einen

Bürstensaum auf der apikalen Seite bilden und so eine Anlagerung und Invasion pathogener Mikroorganismen erschweren [57]. Diese physikalische Barriere wird verstärkt durch biochemische Anpassungen wie beispielsweise apikal gebundene und sezernierte Muzine, welche eine Glykokalix bilden. Diese Muzine werden von spezialisierten Zellen, z. B. den intestinalen Goblet-Zellen (Becherzellen) sezerniert. Es entsteht eine viskose, relativ unpermeable Barriere mit einer Dicke von etwa 150  $\mu\text{M}$  auf der apikalen Seite der Epithelzellen [58]. Diese Barriere bietet Schutz vor einem direkten Kontakt vieler Bakterien mit den Epithelzellen [59, 60]. McGuckin *et al.* zeigten in einem Mäusemodell, dass Tiere mit einem fehlerhaften Muc1-Gen deutlich stärker anfällig für eine Kolonisation mit *Helicobacter pylori* sind als solche mit funktionierendem Gen [61]. Allerdings haben verschiedene Pathogene Strategien entwickelt, um durch die Muzinschicht zu gelangen und so Zugang zur Zelloberfläche zu erhalten. *Helicobacter pylori* verwendet Urease, um den pH-Wert der Muzinschicht zu erhöhen und so die Viskosität ebenfalls zu steigern [62]. *Campylobacter jejuni* und *Salmonella* spp. nutzen ihre Flagellen, um die Muzinschicht zu durchdringen [63]. Intestinale Epithelzellen übernehmen neben den Transport- und Barrierefunktionen auch wichtige Funktionen bei der Immunantwort, z. B. die Präsentation von Antigenen, die Expression von Toll-like Rezeptoren sowie verschiedene Abwehrfunktionen [64]. Des Weiteren kommt es nach Aktivierung der Epithelzellen durch pathogene Keime zu einer verstärkten Chemokinexpression und nachfolgend zur Rekrutierung von Entzündungszellen (Neutrophile, Makrophagen, dendritische Zellen, T-Lymphozyten) [64–66]. Darauf folgt eine NF- $\kappa$ B-vermittelte Expression unterschiedlicher Zytokine und Zytokinrezeptoren.

### 1.1.3. Mechanismen der angeborenen Immunantwort

Intestinale Epithelzellen (vor allem Paneth-Zellen, Enterozyten, Goblet-Zellen) sezernieren eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden. Dazu gehören Defensine, Cathelicidine und Calprotectine. Hauptsächlich wirken diese Peptide über ihre hydrophoben und alkalischen Reste, welche ein breites Spektrum an antimikrobiellen Eigenschaften bieten, indem sie Poren in der bakteriellen Zellwand bilden [67–69]. Einige der antimikrobiellen Peptide, z. B. die  $\alpha$ -Defensine, werden je nach Spezies z. B. in der Maus konstitutiv exprimiert und benötigen keinen bakteriellen Stimulus zur Expression [70]. Allerdings wird die Expression des Hauptteils der antimikrobiellen Peptide durch bakterielle Signale kontrolliert, welche von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRR) erkannt werden. Die sezernierten antimikrobiellen Peptide konzentrieren sich in der Muzinschicht. Diese Konzentration erhöht die Effektivität antimikrobieller Peptide beim Schutz der apikalen Seite der Epithelzellen vor einer Kolonisation durch pathogene Mikroorganismen [71]. Verschiedene gastrointestinale Pathogene haben allerdings Resistenzmechanismen gegenüber antimikrobiellen Peptiden entwickelt. Beispielsweise entgeht *S. Typhimurium* der

enzymatischen Zerstörung seiner Zellmembran durch antimikrobielle Peptide indem das Bakterium die Lipid A-Reste seiner Lipopolysaccharide modifiziert [72].

Neben der physikalischen Barriere sowie der Sezernierung von antimikrobiellen Peptiden gibt es noch weitere Verteidigungsmechanismen. Diese richten sich gegen Bakterien, welche die intestinale Epithelbarriere überwunden haben und in die Epithelzellen eingedrungen bzw. auch schon weiter darüber hinaus vorgedrungen sind. Die Mechanismen setzen sich aus einer raschen Erkennung sowie dem Abtöten der Pathogene zusammen. Dazu gehört die bakterielle Aufnahme und Phagozytose durch Zellen der angeborenen Immunantwort sowie die T-Zell vermittelte Immunantwort. Mikroorganismen, welche die intestinale Epithelzellbarriere durchdringen, werden normalerweise durch Makrophagen der *Lamina propria* rasch phagozytiert und durch Mechanismen, die antimikrobielle Peptide und reaktive Sauerstoffspezies einschließen, abgetötet [73]. Makrophagen aus vielen Geweben (z. B. Knochenmark) sezernieren pro-inflammatorische Effektoren, um Neutrophile und aktivierte T-Zellen anzulocken. Dies kommt bei intestinalen Makrophagen allerdings nur in einem deutlich geringeren Umfang vor. Im Gegensatz zu Blutmakrophagen ist eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) nicht möglich, da intestinale Makrophagen keine bzw. nur in sehr geringem Umfang LPS-Rezeptoren (CD14, TLR-4) exprimieren [74–77]. Daneben können die intestinalen Makrophagen keine klonale T-Zellexpansion einleiten, da sie die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2) ebenfalls kaum bis gar nicht exprimieren [77, 78]. Deswegen produzieren intestinale Makrophagen auch keine pro-inflammatorischen Zytokine wie z. B. IL-6, TNF $\alpha$ . Intestinale Makrophagen sind in der Lage pathogene Keime zu phagozytieren. Werden T-Zellen allerdings prozessierte Antigene präsentiert, ohne das Ko-Stimulatoren (CD80, CD86) vorhanden sind, kommt es zu einer Anergie der T-Zellen. Dies bedeutet, dass die T-Zellen unfähig werden, auch bei Anwesenheit der ko-stimulatorischen Moleküle wieder auf das gleiche Antigen zu reagieren [79, 80]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine evolutionäre Anpassung an die hohe Antigenlast sein, welcher der Darm ständig ausgesetzt ist, um einer dauerhaften, den Organismus schädigenden pro-inflammatorischen Immunantwort vorzubeugen [81, 82]. Dies bedeutet, dass gegen den Großteil der Antigene keine Antikörper produziert werden. Es kommt zu einer Toleranz. Pathogene Keime werden dahingegen erkannt und bekämpft. In den immunologischen Prozess, der dieser Differenzierung zwischen schädlichen und unschädlichen Antigenen zugrunde liegt, sind mehrere Mechanismen involviert. Eine Voraussetzung für die orale Toleranz ist die Integrität der mukosalen Barriere sowie die intestinale Proteolyse [83]. Die Induktion der oralen Toleranz durch ein oral verabreichtes Antigen kann vermieden werden, indem die proteolytische Degradation verhindert wird [84]. Der Mechanismus, der für die Bildung der oralen Toleranz verantwortlich ist, ist abhängig von der oralen Dosis des Antigens, die verabreicht wird [85]. Dabei führen hohe Dosierungen zu einer Anergie bzw. zu einer Deletion der Antigen-spezifischen Effektorzellen, niedrige

Dosierungen induzieren regulatorische Zellen, die eine Antigen-spezifische Immunantwort supprimieren. Antigen-spezifische regulatorische T-Zellen, die Zytokine, z. B. IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ , sezernieren, spielen hier eine Rolle [83, 85]. Die Generation dieser T-Zellen erfolgt nach dem heutigen Kenntnisstand in den Peyer'schen Plaques. Von dort wandern sie in andere Immunorgane aus und sezernieren die oben genannten supprimierenden Zytokine [86].

Zu einer Mukosinfiltration durch Entzündungszellen kommt es nach vorheriger Aktivierung der intestinalen Epithelzellen durch pathogene Mikroorganismen [87]. Die chemotaktische Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfolgt entlang eines Gradienten des hauptsächlich produzierten CXC-Chemokins CXCL8 (Interleukin-8) [88, 89]. Daneben werden auch weitere Chemokine produziert (CXCL1, GRO $\alpha$ ; CXCL5, ENA78). Nachdem die Neutrophilen das Darmlumen erreicht haben, setzen sie ihre antibakterielle Wirkung ein. Der zentrale regulierende Faktor für die Produktion der unterschiedlichen Zytokine und Chemokine ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor NF- $\kappa$ B [90].

Ein Unterbinden des Abtötens durch phagozytierende Zellen stellt allerdings auch einen wichtigen Virulenzmechanismus vieler Pathogene dar. Beispielsweise regulieren *Salmonella* spp. die mikrobiziden Mechanismen von Makrophagen herunter und können so intrazellulär überleben und replizieren [87].

### **1.1.4. Mechanismen der adaptiven Immunantwort**

Ein weiterer Mechanismus zur Bekämpfung pathogener Keime stellt die Sezernierung von Immunglobulin A (IgA) dar. Sezerniertes IgA limitiert die bakterielle Anlagerung an die intestinale Epithelzelloberfläche [91]. Dendritische Zellen, welche sich unter der epithelialen Kuppel der Peyer'schen Platten befinden, nehmen Bakterien auf, die das darüber liegende Epithelium durchdringen. Andererseits sammeln dendritische Zellen in der *Lamina propria* mit Hilfe von Pseudopodien aktiv eine geringe Zahl von Bakterien, die sich auf der apikalen Seite der Epithelzelle befinden [92–94]. Die mit Bakterien beladenen dendritischen Zellen wandern in die Peyer'schen Platten oder mLN ab. Dort induzieren sie die Differenzierung von B-Zellen in IgA<sup>+</sup> Plasmazellen. Die IgA<sup>+</sup> Plasmazellen wandern in die intestinale *Lamina propria* und sezernieren IgA. Immunglobulin A wird bei Schweinen als Dimer überwiegend im Duodenum produziert. Es bindet an die sekretorische Komponente (Poly-Ig-Rezeptor) auf der basolateralen Seite der Epithelzellen. Anschließend wird IgA zusammen mit der sekretorischen Komponente internalisiert und auf der luminalen Seite gemeinsam mit dem Großteil der sekretorischen Komponente abgegeben [95]. Nach dem transzellulären Transport bindet IgA Bakterien auf der luminalen Seite und verhindert so deren Anheftung an das Epithel [91]. Daneben wird dadurch auch das Eindringen der Bakterien in die Zellen verhindert [96].



### 1.1.5. Pathogen-assoziierte Muster und Mustererkennungsrezeptoren

In einer Umgebung die reich an potentiell schädlichen Mikroorganismen ist, hängt das Überleben von den Abwehrmechanismen ab, welche als Reaktion auf eine Infektion vom Wirtsorganismus eingeleitet werden. Solche schützenden Mechanismen werden als angeborene Immunität bezeichnet und kommen evolutionär konserviert in allen mehrzelligen Organismen vor. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, welche auf Millionen von lymphoiden Zelloberflächenrezeptoren basiert, die eine unbegrenzte Vielfalt von Antigenen erkennen, hat die angeborene Immunantwort eine deutlich geringere Anzahl von Rezeptoren, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) als Basis [97–99]. Diese Rezeptoren sind in der Lage, molekulare Muster unterschiedlicher Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) zu erkennen. Dabei nehmen sie hauptsächlich konservierte molekulare Muster wahr, welche fremde Organismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) charakterisieren [99]. Im Gegensatz dazu erkennt die adaptive Immunantwort Details molekularer Strukturen, beispielsweise spezifische Proteine, Peptide oder Kohlenhydrate. Die PRR befinden sich u. a. auf Zelloberflächen, in intrazellulären Kompartimenten und Organellen sowie als sezernierte Moleküle im extrazellulären Raum. Zu den PAMPs zählen Komponenten der Zellwand von Bakterien/Pilzen, Lipopolysaccharide (LPS), Lipoproteine, Peptidoglykane, bakterielle/virale Nukleinsäuren und andere Moleküle [100–102]. Diese chemisch sehr unterschiedlichen Strukturen werden vom Wirt nicht gebildet, kommen im Großteil der Pathogene vor und sind für die Pathogenität sowie das Überleben im Wirt unerlässlich [98]. Die Bindung der PAMPs an die PRRs, welche sich auf der Oberfläche verschiedener antigenpräsentierender Zellen wie Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen aber auch intestinalen Epithelzellen befinden, führt zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege [99, 101, 102]. Daneben können PRRs auch zu einer Endozytose (z. B. der extrazelluläre Mannose-Rezeptor) führen oder als Opsonine (z. B. sezernierte PRRs, Mannan-bindendes Protein) wirken.

Peptidoglykan (PGN), auch Murein genannt, ist ein sehr gutes Ziel für die Erkennung durch das eukaryotische angeborene Immunsystem, da es eine essentielle und einzigartige Komponente der Zellwand von nahezu allen Bakterien ist und in eukaryotischen Zellen nicht vorkommt [103]. Zu den wichtigen Effektoren, welche bakterielles Peptidoglykan erkennen, gehören die NOD-Proteine und die Peptidoglykan Erkennungsproteine (*peptidoglycan recognition proteins*, PGRPs) [104]. Peptidoglykan wird extrazellulär von höheren Eukaryoten durch membrangebundenes CD14 und Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) erkannt [105–108]. Die intrazelluläre Erkennung von PGN wird durch zwei Mitglieder der Nod-like Familie, Nod1 und Nod2 reguliert [109–111]. Zu den sezernierten Molekülen, welche für die Erkennung von Peptidoglykan im umgebenden Medium verantwortlich sind, gehören die PGRPs, lösliches CD14, Lysozym und C-Typ Lektine [104, 112, 113].

### 1.1.6. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Das Rezeptormolekül Toll wurde zunächst als wichtiger Faktor für den Ablauf der Embryogenese bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt [114]. Lemaitre *et al.* (1997) zeigten, dass Toll in Insekten auch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen spielt [115]. In Säugetieren wurden bis heute 13 Mitglieder der Toll-like Familie identifiziert [99, 116, 117]. Es wurden allerdings nur 10 Mitglieder der TLR-Familie (TLR1 – 10) im Menschen identifiziert und charakterisiert [118]. Dabei unterscheiden sie sich untereinander aufgrund der Ligandenspezifität, dem Genexpressionsmuster und vermutlich auch bei den Zielgenen, die sie induzieren [99]. Die TLRs gehören zur Gruppe der integralen Membran-Glykoproteine Typ 1 und werden in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten exprimiert. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und der nur in Mäusen exprimierte TLR11 werden auf der Zelloberfläche exprimiert und nach Aktivierung durch spezifische Liganden in Phagosomenstrukturen eingeschlossen. Dahingegen werden TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in intrazellulären Vesikeln, wie z. B. Endosomen, exprimiert. Der Transport der intrazellulären TLRs zu den Vesikeln erfolgt dabei mit Hilfe eines Transmembranproteins, UNC93B1, welches im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle lokalisiert ist [119–121].

Auch intestinale Epithelzellen besitzen die Fähigkeit, TLRs zu exprimieren und so Mikroorganismen zu erkennen [122]. TLR2 und TLR4 werden in geringen Mengen in intestinalen Epithelzellen, welche aus humanem Kolongewebe stammen, exprimiert [123, 124]. TLR3 scheint konstitutiv in großen Mengen in normalem humanen Dünndarm- und Kolongewebe exprimiert zu werden, wohingegen TLR5 hauptsächlich im Kolon exprimiert wird [123]. Bei allen TLRs, mit Ausnahme von TLR10, konnte eine Expression in intestinalen Epithelzellen des humanen Kolons zumindest auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Expression von TLR1 – 5 sowie TLR9 wurde ebenfalls in intestinalen Epithelzellen aus dem Dünndarm nachgewiesen [124]. In einer Vergleichsstudie mit keimfreien und normalen Mäusen konnte gezeigt werden, dass kommensale Bakterien die Expression verschiedener TLRs (TLR2 – 5) induzieren. Bei Abwesenheit der normalen Mikroflora ist die Expression der TLRs in den intestinalen Epithelzellen geringer im Vergleich zu den normalen Mäusen und die keimfreien Mäuse sind zusätzlich anfälliger für pathogene Keime [125].

Die Toll-like Rezeptoren sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener PAMPs zu erkennen. Unterschiedliche Komponenten der bakteriellen Zellwand werden durch TLR4 (LPS – gramnegative Bakterien) und TLR2 (Peptidoglykan – grampositive Bakterien) erkannt. TLR5 ist in der Lage, ein strukturelles Epitop des bakteriellen Flagellins zu binden. Die Liganden von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind verschiedene Formen mikrobieller Nukleinsäuren. Diacyl- oder Triacyl-Lipopeptide von Bakterien, Mykobakterien und Mykoplasmen werden durch die Heterodimere TLR1/2 oder TLR6/2 erkannt [99, 126–128].

**Tabelle 1: Beschreibung der humanen TLRs, Lokalisation, wichtige Liganden sowie Transkriptionsfaktor-Aktivierung und induzierte Zytokine (modifiziert nach [128]).**

LAM, Lipoarabinomannan; WNV, Westnilvirus; RSV, Respiratorische-Synzytial-Viren; MCMV, murines Cytomegalovirus; MMTV, Maus-Mammaturvovirus; LTA, Lipoteichonsäure; VSV, Vesicular Stomatitis Virus; HSV, Herpes-simplex-Viren; CpG, Cytosin-Phosphat-Guanin; PGN, Peptidoglykan.

TLR	Lokalisation	Liganden	Transkriptionsfaktor(en)	Induzierte Zytokine
TLR1/2	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Triacyl-Lipopeptide (Bakterien, Mykobakterien)	NF-κB	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6)
TLR2	Plasmamembran (Zelloberfläche)	PGN (grampositive Bakterien), LAM (Mykobakterien), Hämagglutinin (Masernvirus), Phospholipomannan ( <i>Candida</i> )	NF-κB	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6)
TLR3	Endosom	virale ssRNA (WNV), virale dsRNA (Reovirus)	NF-κB, IRF3,7	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6), Typ I IFNs
TLR4	Plasmamembran (Zelloberfläche)	LPS (gramnegative Bakterien), Mannan ( <i>Candida</i> ), virale Hüllproteine (RSV, MMTV)	NF-κB, IRF3,7	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6)
TLR5	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Flagellin (begeißelte Bakterien)	NF-κB	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6)
TLR6/2	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Diacyl-Lipopeptide ( <i>Mykoplasma</i> ), LTA (Streptokokken), Zymosan ( <i>Saccharomyces</i> )	NF-κB	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6)
TLR7	Endosom	virale ssRNA (VSV, Influenzavirus)	NF-κB, IRF7	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6), Typ I IFNs
TLR8	Endosom	virale ssRNA (RNA-Viren)	NF-κB, IRF7	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6), Typ I IFNs
TLR9	Endosom	virale dsDNA (HSV, MCMV), CpG Motive von Bakterien/Viren	NF-κB, IRF7	pro-inflammatorische Zytokine (z. B. TNF-α, IL-6), Typ I IFNs

Die Ligandenerkennung durch die verschiedenen TLRs führt zur Rekrutierung unterschiedlicher Adapter-Moleküle, die über eigene TIR-Domänen mit den TLRs

interagieren wie z. B. MyD88, TIRAP (*TIR-associated protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$* ) und TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) [128–130]. Die Stimulierung von TLR1, TLR2 sowie TLR4 – 9 durch ihre entsprechenden Liganden führt zu einer Rekrutierung von MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) und zur Phosphorylierung von Mitgliedern der IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) Familie. Es kommt zur Assoziation mit und dadurch zur Aktivierung von TRAF6 (*TNF-receptor-assoziiated factor 6*). TRAF6 führt zur Aktivierung von TAK1 (TGF $\beta$ -aktivierte Kinase 1). Diese phosphoryliert im Anschluss sowohl MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinasen als auch den IKK(*inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-kinase*)-Komplex, welcher aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  (auch bezeichnet als *NF- $\kappa$ B essential modulator*, NEMO) besteht. Der IKK-Komplex phosphoryliert I $\kappa$ B, was zu dessen Ubiquitinierung und nachfolgend zum Abbau führt. Es kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zu dessen Translokation in den Zellkern, wo die Expression verschiedener Zielgene wie beispielsweise der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  angeregt wird [127, 128, 131, 132].

TLR3 und TLR4 induzieren den TRIF-abhängigen Signalweg, um die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone zu veranlassen. Dieser Signaltransduktionsweg aktiviert NF- $\kappa$ B über zwei unabhängige Signalwege. Einerseits interagiert die N-terminale Domäne von TRIF mit TRAF6 und aktiviert schließlich NF- $\kappa$ B. Andererseits interagiert die C-terminale Domäne von TRIF mit RIP1 (*receptor interacting protein 1*) und führt so zur Aktivierung von TAK1 [133]. Der TRIF-abhängige Signalweg induziert die Expression von Typ I Interferonen ebenfalls durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) [128, 134].

Die Expression von TLRs auf Zellen der angeborenen Immunantwort verbindet die Erkennung pathogener Mikroorganismen mit der Einleitung antimikrobieller Mechanismen, wie z. B. der Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies sowie der Expression antimikrobieller Peptide. Zusätzlich kann die Aktivierung der TLRs durch ihre spezifischen Liganden auch eine adaptive Immunantwort durch die Kontrolle der Reifung dendritische Zellen vorantreiben [135, 136]. Die Erkennung von *S. Typhimurium* wird hauptsächlich durch TLR2, TLR4 und TLR5 vermittelt [137–141]. Allerdings hat *Salmonella* Mechanismen entwickelt, um die Erkennung durch TLRs zu verhindern oder den nachfolgenden Konsequenzen zu entgehen. Beispielsweise führt eine Modifizierung von Lipid A zu einer verringerten Erkennung durch TLR4 [72, 142].

### 1.1.7. Nod-like Rezeptoren (NLRs)

Das angeborene Immunsystem umfasst verschiedene Klassen von PRRs. Neben den TLRs, welche Mikroorganismen auf der Zelloberfläche und in Endosomen erkennen gibt es auch die Nod(*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLRs), welche intrazelluläre, zytosolische Sensoren für Mikroorganismen sind [143]. Beim Menschen

besteht die NLR Familie aus 23 zytosolischen Proteinen, die durch eine konservierte Nod-Domäne (*nucleotide-binding and oligomerization domain*, auch als NACHT-Domäne bezeichnet) zur Selbstoligomerisation nach vorheriger Aktivierung sowie mit ATPase-Aktivität und eine C-terminale Leucin-reiche Domäne (LRR) zur Bindung von Liganden gekennzeichnet sind [144]. Daneben enthält die Struktur noch eine N-terminale Effektor-bindende Domäne (EBD), welche aus einer Protein-Protein Interaktionsdomäne CARD (*caspase-activating and recruitment domain*), verantwortlich für die Rezeptorbindung, besteht [144, 145]. NLRs werden in einer automatisch gehemmten, inaktiven Form synthetisiert. Spezifische Liganden werden durch die Ligandenerkennungs-Domäne erkannt und es kommt durch eine Änderung der Konformation zu einer Selbstoligomerisation, welche zur Rekrutierung von Effektor-Molekülen über die Effektor-bindende Domäne von entscheidender Bedeutung ist [146, 147]. Einige Nod-Proteine führen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie von Caspasen. Die ersten beiden intrazellulären PRRs, die identifiziert wurden, waren Nod1 und Nod2 (auch bekannt als CARD4 und CARD15) [148, 149]. Diese beiden Nod-Proteine unterscheiden sich u. a. anhand ihrer Verteilung im Organismus. Nod1-Rezeptoren werden im Körper in vielen unterschiedlichen Gewebetypen exprimiert, wohingegen Nod2-Rezeptoren hauptsächlich in antigenpräsentierenden Zellen (Monozyten, Granulozyten, dendritische Zellen und in geringen Mengen auch in T-Zellen) sowie in Paneth-Zellen des Dünndarms lokalisiert sind [144, 149]. Die Nod-Rezeptoren befinden sich frei im Zytosol der Zelle. Nod-Liganden sind keine kompakten Mikroorganismen, sondern vielmehr Peptide (Muropeptide), die beim Abbau von Peptidoglykan entstehen. Nod1-Proteine identifizieren Peptidoglykan-Fragmente, welche meso-Diaminopimelinsäure (meso-DAP) enthalten. Meso-DAP kommt überwiegend in den Zellwänden gramnegativer Bakterien und in einigen wenigen grampositiven Bakterien (z. B.: Gattung *Bacillus*) vor. Muramyldipeptid (MDP), ebenfalls ein Peptidoglykanfragment, ist die essentielle Struktur, mit Hilfe derer Nod2-Rezeptoren Peptidoglykan erkennen können. Weil MDP in allen Peptidoglykanen vorkommt, kann Nod2 sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien erkennen [110, 111, 146, 150, 151]. Allerdings konnten Magalhaes *et al.* (2005) in ihrer Studie zeigen, dass es hinsichtlich der Muropeptide, die durch Nod1 erkannt werden, speziesspezifische Unterschiede gibt [152]. Humane Nod1-Proteine binden bevorzugt an Tripeptide, die DAP enthalten, dahingegen erkennen murine Nod1-Proteine hauptsächlich Tetrapeptide, welche DAP enthalten. Magalhaes *et al.* (2005) konnten weiter beobachten, dass hNod1-Proteine TCT (*Tracheal cytotoxin*, Tetrapeptide, welches DAP enthält) nur in sehr geringem Maß detektieren, wohingegen mNod1-Proteine dies sehr effektiv können [152].

Die Bindung von meso-DAP an den Nod1- bzw. von MDP an den Nod2-Rezeptor führt zu deren autogener Oligomerisation und zur Rekrutierung von RICK (*receptor-interacting serine/threoninekinase*), einer Serin-Threonin Kinase. Im Folgenden kommt es zur

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [143, 153]. NF- $\kappa$ B initiiert daraufhin im Zellkern die gesteigerte Transkription von Genen, welche für pro-inflammatorische Zytokine z. B. IL-8 codieren [110, 154]. Diese Aktivierung ist TLR-unabhängig und stellt daher einen alternativen pro-inflammatorischen Signalweg dar. Die beiden Aktivierungswege sind oft synergistisch, verstärken sich also gegenseitig [104]. Viele Bakterien sezernieren Peptidoglykan-Fragmente, die als Aktivatoren für Nod-Proteine dienen können [155]. Daneben detektieren die Nod-Proteine Bakterien, die ins Zytosol entkommen wie z. B. *Salmonella*, *Shigella* oder auch *Listeria*. Beispielsweise konnten Le Bourhis *et al.* (2009) zeigen, dass eine Mutation des *Nod1*-Gens in Mäusen zu einer erhöhten Anfälligkeit für einen SPI(*Salmonella* Pathogenitätsinsel)-1-Mutantenstamm von *S. Typhimurium* führt. Damit konnten sie die entscheidende Rolle von Nod1 bei der Abwehr von enteropathogenen Bakterien wie *Salmonella* durch die Modulation von dendritischen Zellen aus der *Lamina propria* verdeutlichen [156]. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Nod2 sowohl in SW480- als auch in Caco2-Zellen (intestinalen Epithelzellen) zumindest auf mRNA-Level exprimiert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass Nod2 eine Hauptkomponente der angeborenen intestinalen Immunabwehr gegenüber pathogenen Bakterien ist und eine antibakterielle Rolle bei der Abwehr einer Salmonelleninfektion spielt [157].

Die Beteiligung der Nod-Proteine bei der Pathogenese vieler genetischer Erkrankungen macht deutlich, dass diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen spielen. Mutationen des *Nod2*-Gens werden mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, beispielsweise Morbus Crohn (Crohn's Disease) assoziiert [158, 159].

In einer Studie untersuchten Tohno *et al.* (2008) das porcine Nod2-Protein [160]. Beim Vergleich der Nukleotidsäuresequenzen des porcinen Nod2 mit dem humanen und murinen konnten sie zeigen, dass diese eine 84,4 bzw. 77,9%ige Übereinstimmung aufweist. Auch die Aminosäure-Identität war beim Vergleich von porcinem und humanem Nod2 höher (81,6 % gegenüber 76,7 %) [160]. Folglich scheint das poNod2 sowohl auf cDNA- als auch auf dem Aminosäurelevel dem hNod2 ähnlicher zu sein als dem mNod2. Auch in einer phylogenetischen Analyse konnte gezeigt werden, dass das poNod2 näher mit dem humanen als dem murinen Nod2 verwandt ist [160]. Daneben konnten Tohno *et al.* auch zeigen, dass es bezüglich der mRNA-Expression von Nod2 altersabhängige Unterschiede im Schwein gibt [160]. Bei neugeborenen Schweinen war die Genexpression in den mesenterialen Lymphknoten und der Milz gegenüber den anderen untersuchten Geweben (z. B. ileale PP, Ileum, Jejunum, Duodenum, Kolon) erhöht. In den ausgewachsenen Schweinen konnte die höchste Genexpressionsrate von Nod2 in den ilealen Peyer'schen Platten nachgewiesen werden [160].

### 1.1.8. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs)

Neben den Nod-Proteinen wurde eine weitere Familie von Peptidoglykan-Erkennungsproteinen beschrieben: die *peptidoglycan recognition proteins* (PGRPs). Diese sind Teil der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Infektionen und kommen sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten vor. Das erste PGRP wurde in der Seidenraupe (*Bombyx mori*) als ein Protein, welches bakterielles Peptidoglykan erkennt und daraufhin die Aktivierung der Prophenol-Oxidase Kaskade initiiert, entdeckt [161]. Insekten haben bis zu 19 PGRPs, Säugetiere besitzen 4 PGLYRPs, welche sezerniert werden [162, 163]. Insekten-PGRPs und Säugetier-PGLYRPs verteidigen die Wirtszellen mit unterschiedlichen Mechanismen gegen eine Infektion. Insekten exprimieren die PGRPs entsprechend ihrer Funktion bei der Immunantwort in immunkompetenten Organen wie z. B. Fettkörpern, dem Darm und Hämozyten. Zu einer Hochregulierung der Expression der PGRPs kommt es bei Zugabe von Peptidoglykan und Bakterien [162, 164, 165]. Die PGRPs der Insekten werden in zwei Klassen eingeteilt. Kleine (short) PGRPs (PGRP-S), bei denen es sich um kleine extrazelluläre Proteine handelt und große (long) PGRPs, die aus langen Transkripten bestehen und sowohl intrazelluläre, extrazelluläre als auch membranüberspannende Proteine sind [165, 166]. Meist sind die Gene noch alternativ gespleißt. Die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) verfügt z. B. über 13 PGRP Gene, die in mindestens 19 Proteine transkribiert werden [166]. Drei *Drosophila* PGRPs, PGRP-SA, PGRP-SD und PGRP-SC1 dienen als Sensoren für bakterielles Peptidoglykan. Letztendlich führt der Signalweg zur Aktivierung eines weiteren NF- $\kappa$ B-ähnlichen Transkriptionsfaktors, Relish, welcher zur Transkription von Diptericin und weiteren, hauptsächlich gegenüber gramnegativen Bakterien, aktiven antimikrobiellen Peptiden führt [104, 167–169]. Neben den direkt antibakteriell wirksamen PGRPs gibt es auch solche, die über eine Amidase-Aktivität verfügen. *Drosophila* PGRP-SC1, PGRP-SB1 und PGRP-LB sind N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidasen. Sie hydrolysieren die Peptidbindung zwischen MurNAc und L-Alanin und trennen so das Stammpeptid vom Polysaccharid-Rückgrat [170–172]. Mellroth *et al.* (2003) zeigten, dass ein enzymatischer Abbau von bakteriellem Peptidoglykan durch Amidasen die Fähigkeit von Peptidoglykan zur Stimulierung der Immunantwort bei Insektenzellen reduziert oder sogar ganz herabsetzt [170]. PGRPs, die eine Amidase-Aktivität besitzen, wirken demnach als detoxifizierende Enzyme gegenüber Peptidoglykan in *Drosophila*.

Säugetiere besitzen eine Familie aus vier PGRPs, die zunächst analog zu den Insekten-PGRPs als PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I $\alpha$  und PGRP-I $\beta$  (für *short*, *long*, *intermediate*) bezeichnet wurden [163]. Diese Namen wurden später durch das „Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee“ in PGLYRP-1 – 4 umbenannt. Die Säugetier-PGLYRPs übernehmen wichtige Funktionen bei der angeborenen Immunität gegenüber pathogenen Bakterien. Im Gegensatz zu den Insekten PGRPs, erkennen Säugetier-PGLYRPs bakterielles Peptidoglykan nicht nur, sondern sie wirken auch direkt bakterizid

[169]. Alle vier PGLYRPs sind lösliche intrazelluläre oder sezernierte Moleküle. PGLYRP-2 besitzt Amidase-Aktivität (N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase-Aktivität), PGLYRP-1, PGLYRP-3 und PGLYRP-4 haben eine antibakterielle Aktivität [104, 173]. Säugetier-PGLYRPs spielen keine Rolle beim TLR-induzierten Signalweg.

Alle PGRPs besitzen mindestens eine C-terminale PGRP-Domäne (ca. 165 Aminosäure-Reste), die homolog zur Bakteriophagen und bakteriellen Typ 2 Amidase ist [162, 163, 174]. PGLYRP-3, PGLYRP-4 sowie *D. melanogaster* PGRP-LF besitzen zwei nicht-identische PGRP-Domänen. Alle Tiere besitzen PGRP-Domänen, die zu annähernd 42 % identisch sind [163, 164, 166, 174]. Jede PGRP-Domäne verfügt über eine Liganden-Bindungsstelle. Dementsprechend besitzen PGLYRP-3 und PGLYRP-4 Monomere und Dimere zwei bzw. vier Liganden-Bindungsstellen, PGLYRP-1 und PGLYRP-2 Monomere und Dimere ein bzw. zwei Bindungsstellen für Liganden [175]. Kristallographische Messungen konnten zeigen, dass humanes PGLYRP-1, die C-terminale PGRP-Domäne von PGLYRP-3 sowie Insekten PGRP-LB, -SA und -LCA Liganden-Bindungsstellen besitzen, welche Peptidoglykan binden und spezifisch für Muramyl-Tripeptide sind [175–179]. Größere Strukturen (z. B. GlcNAc-MurNAc-Tetrapeptide) können aufgenommen werden, Muramyl-Dipeptide oder Peptide ohne MurNAc werden allerdings nicht gebunden [180]. Die minimalen Substrate von PGLYRP-2 zur Hydrolyse sind Muramyl-Tripeptide [181]. Eine hochaffine Bindung von Peptidoglykan durch die PGLYRPs wird dadurch ermöglicht, dass sowohl die Peptide als auch die MurNAc-Anteile des Peptidoglykans in der tiefen Bindungs-Spalte festgehalten werden [175]. Ein Muramyl-Tripeptid füllt beispielsweise annähernd ein Drittel der Spalte aus und nimmt Kontakt zu den 16 Aminosäure-Resten auf, welche die Spalte säumen. Der Großteil der Interaktionen erfolgt mit dem Peptid-Anteil von Peptidoglykan, MurNAc wird für die Bindung allerdings auch benötigt [175]. Die Bindung gramnegativer Bakterien erfolgt vermutlich auch über die Lipoteichonsäure (LTA) [173]. Sowohl LTA als auch LPS kann von PGRPs gebunden werden, die Lokalisation der Bindungsstelle ist aber noch unbekannt [182, 183]. Beim Schwein konnten bislang drei PGLYRPs beschrieben werden: PGLYRP-1, sowie zwei Spleißformen von PGLYRP-2: PGLYRP-2A und PGLYRP-2B [184]. Die Säugetier-PGLYRPs werden in den verschiedenen Organen und Geweben unterschiedlich exprimiert. Eine Zusammenfassung der Expressionsorte sowie der Funktionen humaner und porciner PGLYRPs ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Expressionsorte und Funktionen humaner und porciner PGLYRPs**

PGLYRP	Expressionsorte	Funktion	Referenz
<b>Human</b>			
PGLYRP-1	polymorphonukleäre Leukozyten (PMN granules), M-Zellen	antibakteriell/ bakterizid	[182]; [186]; [187]



## Einleitung

PGLYRP-2	konstitutiv in der Leber (sezerniert in den Blutkreislauf) induzierbar in Epithelzellen (Haut – Keratinozyten, Intestinum – intestinale follikelassoziierte Epithelzellen)	Amidase	[104]; [181]; [187–189]; [190]
PGLYRP-3	Haut, Augen, Mund, Intestinaltrakt, Schweißdrüsen, Talgdrüsen	antibakteriell/ bakterizid	[104]; [163]; [173]
PGLYRP-4	Haut, Augen, Mund, Intestinaltrakt, Schweißdrüsen, Talgdrüsen, Speicheldrüsen	antibakteriell/ bakterizid	[104]; [163]; [173]
<b>Schwein (<i>Sus scrofa</i>)</b>			
PGLYRP-1	polymorphonukleäre Leukozyten (PMN granules), M-Zellen	antibakteriell/ bakterizid	[184]
PGLYRP-2A	entsprechend humanem PGLYRP-2	Amidase	[184]
PGLYRP-2B	konstitutiv in vielen Geweben (Intestinaltrakt, Leber, Haut, Milz, Nieren u. a.)		[184]

PGLYRP-1 wird hauptsächlich in polymorphonukleären Leukozyten (PMN) exprimiert. Es wirkt direkt bakterizid gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien [173, 183, 191]. Beispielweise konnte gezeigt werden, dass PGLYRP-1 Knockout-Mäuse stärker anfällig für Infektionen mit einigen grampositiven Bakterien sind und ihre PMNs Defekte beim Abtöten und beim Verdau grampositiver Bakterien aufweisen [186]. Für die bakterizide Aktivität von PGLYRP-1 werden Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) benötigt [173]. Daneben konnte PGLYRP-1 auch in M-Zellen nachgewiesen werden [187]. Die genaue Funktion ist hier noch nicht aufgeklärt, allerdings wird davon ausgegangen, dass PGLYRP-1 die M-Zellen und die intestinale Submukosa vor Infektionen schützt.

PGLYRP-3 und PGLYRP-4 werden gezielt in Geweben exprimiert, die in Kontakt mit der Umwelt treten, wie z. B. Haut, Zunge, Speiseröhre, Mund, Intestinaltrakt, Augen [173, 192]. Die Anwesenheit von Bakterien erhöht die Expressionsrate von PGLYRP-3 und PGLYRP-4 in Keratinozyten und oralen Epithelzellen [173, 193]. Diese erhöhte Genexpressionsrate geht vermutlich auf die Aktivierung des Toll-Signalweges und auf die Stimulierung der PRRs TLR2, TLR4 und Nod1, Nod2 zurück. PGLYRP-3 und PGLYRP-4 sowie PGLYRP-1 werden hauptsächlich als Homodimere sezerniert, welche durch eine Disulfidbrücke miteinander gekoppelt sind [173]. Allerdings kommt es bei einer Ko-Expression von PGLYRP-3 und PGLYRP-4 in der gleichen Zelle ausschließlich zur Bildung von PGLYRP-3:4 Heterodimeren

[173]. Humane PGLYRP-1, PGLYRP-3 und PGLYRP-4 sind direkt bakterizid für viele pathogene und nicht-pathogene grampositive und gramnegative Bakterien [173, 191]. Daneben wirken sie bei Mäusen auch *in vivo* auf der Mukosa bakterizid gegenüber einer intranasalen Infektion mit *Staphylococcus aureus* [173]. Allerdings ist der Umfang der bakteriziden Aktivität der verschiedenen PGLYRPs unterschiedlich. Beispielsweise werden gramnegative Bakterien am effektivsten durch PGLYRP-1 und PGLYRP-3 abgetötet und weniger effizient durch PGLYRP-4 [173, 191]. Die PGLYRPs sind bakterizid (Abtöten von 99 % der Bakterien) bei einer Konzentration von 0,1 – 1  $\mu\text{M}$ , was sie demnach aktiver macht als den Großteil der antimikrobiellen Peptide, beispielsweise Defensine [173]. Gegenüber der normalen grampositiven Mikroflora wirken PGLYRPs nur gering bakterizid oder bakteriostatisch. Dies beugt vermutlich einem zu großen Wachstum der Bakterien der normalen Hautflora und im Intestinaltrakt vor und hält so die Symbiose aufrecht, ohne die Bakterien vollständig abzutöten [104]. Für die bakterizide Wirkung aller humanen PGLYRPs gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien werden physiologische Konzentrationen, ca. 2 – 5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen benötigt. Diese Konzentrationen liegen im Bereich der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen im Schweiß (ca. 17  $\mu\text{M}$ ), im Speichel (ca. 2  $\mu\text{M}$ ) und im Plasma (ca. 15  $\mu\text{M}$ ) [191]. Für die bakterizide Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien kann  $\text{Zn}^{2+}$  nicht durch andere Ionen ersetzt werden, wohingegen beim Abtöten von grampositiven Bakterien  $\text{Zn}^{2+}$  teilweise durch  $\text{Ca}^{2+}$  ersetzt werden kann [191]. Da  $\text{Zn}^{2+}$  bei vielen Proteinen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren eine essentielle Komponente für ihre Struktur und/oder Funktion darstellt, sind auch viele Immunfunktionen zinkabhängig [194, 195]. Verschiedene Peptidoglykan-lyisierende Enzyme sowie einige antimikrobielle Peptide benötigen ebenfalls  $\text{Zn}^{2+}$  für ihre antimikrobielle Funktion [196–199]. Die Zink-Bindungsstelle bei den Säugetier-PGLYRPs PGLYRP-1, PGLYRP-3 und PGLYRP-4 sind nicht bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass humane PGLYRPs sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien synergistisch mit einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden abtöten. Zu einer Synergie mit z. B.  $\text{PLA}_2$ ,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensin kommt es, wenn beide Komponenten in sub-bakteriziden Konzentrationen vorhanden sind [191]. *In vivo* kommt es zu einer verstärkten antimikrobiellen Abwehr, da die PGLYRPs und die antimikrobiellen Peptide in denselben Geweben wie z. B. polymorphonukleären Leukozyten, Haut, Augen, Intestinaltrakt (PGLYRP-3, PGLYRP-4,  $\text{PLA}_2$ , Defensine) vorkommen. Daneben können PGLYRPs auch synergistisch mit verschiedenen bakteriolytischen Enzymen, beispielsweise Lysozym und Lysostaphin, wirken [173, 174, 191, 200].

Der Mechanismus, mit dem PGLYRPs Bakterien abtöten scheint einheitlich zu sein, sich allerdings von den Mechanismen der bekannten antibakteriell wirksamen Substanzen zu unterscheiden. PGLYRPs permeabilisieren die Cytoplasmamembran nicht, sie wirken auch

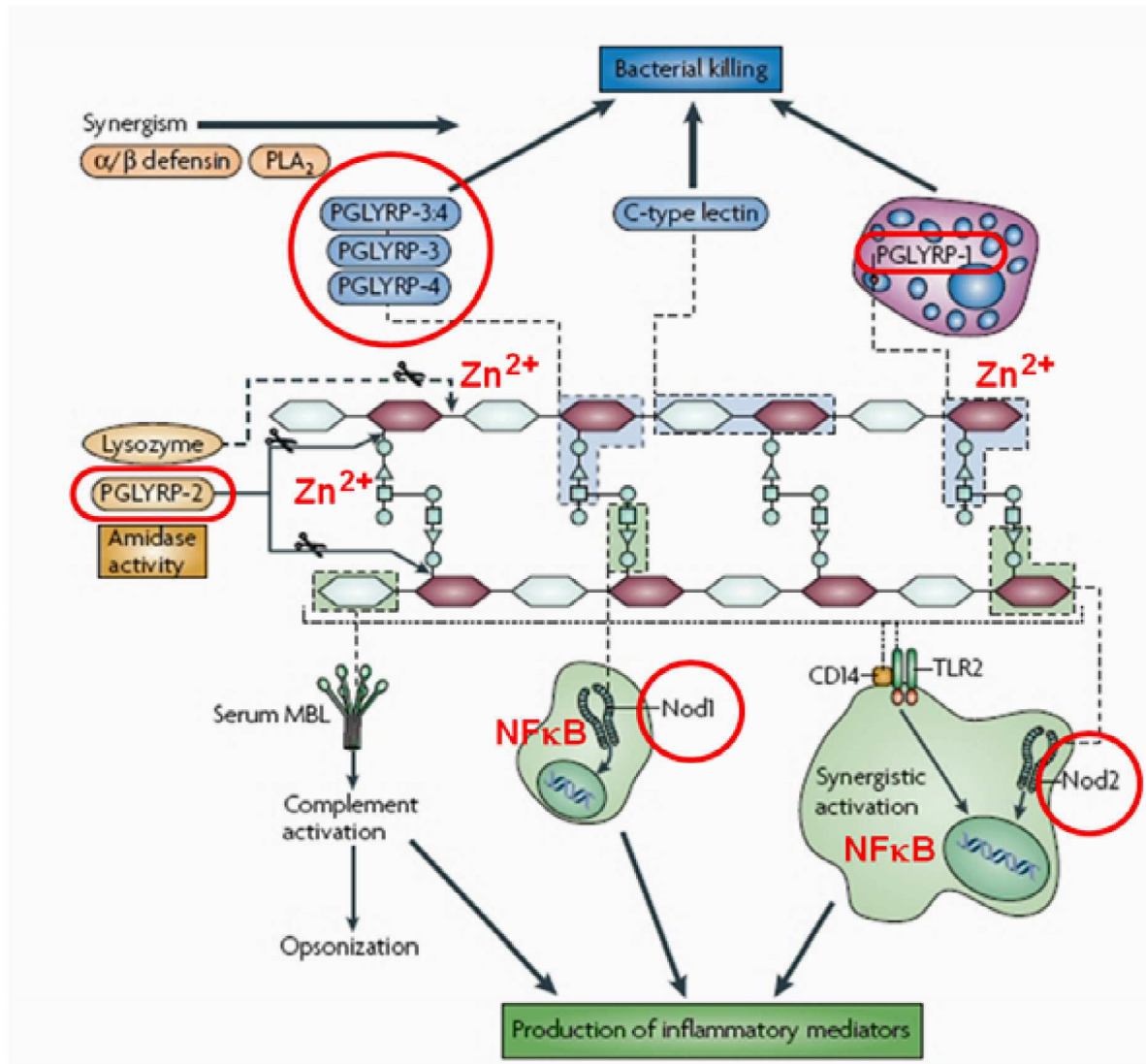
nicht hydrolytisch auf Peptidoglykan, ihr Wirkmechanismus scheint am ehesten dem Effekt von Antibiotika zu ähneln, welche die Peptidoglykan-Synthese blockieren [173, 191].

PGLYRP-2 wird von der Leber konstitutiv exprimiert und in den Blutstrom sezerniert. Eine Induktion der Genexpression ist in Epithelzellen (Haut, Intestinum) durch Bakterien oder auch Zytokine möglich [181, 187–190]. Die Funktion von PGLYRP-2 als N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase entspricht wahrscheinlich der von Insekten Amidase-PGRPs und dient u. a. zur Eliminierung von pro-inflammatorischem Peptidoglykan, um eine Überreaktion des Immunsystems zu vermeiden [104]. Die Erkennung von Peptidoglykan erfolgt in Säugetieren durch TLR2. Ein Abbau des Peptidoglykans durch Amidasen reduziert folglich die Menge des TLR2-Liganden [170, 201]. Intrazellulär erfolgt die Erkennung von Peptidoglykan-Fragmenten durch Nod1 und Nod2. Kommt es zu einem Verdau von Peptidoglykan durch die Amidase-Aktivität werden so auch die Liganden für Nod2 (MDP) abgebaut [109]. Andererseits werden bei einem Verdau von Peptidoglykan-Polymeren auch Nod1-Liganden (meso-DAP) erzeugt, die nach Erkennung zu einer verstärkten antimikrobiellen Reaktion führen [110]. Außerdem besitzt PGLYRP-2 eine direkte antibakterielle Aktivität und kann die Aktivität verschiedener antibakterieller Peptide verstärken. Die Nod-Signalwege sind demzufolge mit den PGRP-Signalwegen verbunden. Durch die Muramidase-Aktivität der PGLYRPs werden vermehrt Muramylpeptide (Peptidoglykan-Fragmente) bereitgestellt, welche durch Nod1-Proteine erkannt werden. Extrazellulär wird Peptidoglykan durch TLR2 und CD14 erkannt, intrazellulär durch Nod1 und Nod2. Es kommt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und dessen Zielgenen, welche für pro-inflammatorische Zytokine codieren. Der Nod-Signalweg andererseits spielt eine große Rolle bei der Expression der PGLYRPs. Eine vermehrte Zytokin-Produktion, ausgelöst durch eine erhöhte Menge an Muramylpeptiden, führt zu einer Induktion der Expression von PGLYRPs. In Abbildung 1 sind die Funktionen der Säugetier PGLYRPs sowie die Verbindung zum Nod-Signalweg dargestellt (modifiziert nach [104]).

PGRP-Formen, welche eine Peptidoglykan Amidase-Aktivität besitzen, haben alle eine konservierte Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstelle und benötigen Zink als Cofaktor. Die Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstelle enthält zwei Histidin-Reste, einen Tyrosin-Rest und einen Cystein-Rest (Cys168 in *D. melanogaster*, Cys530 bei humanem PGLYRP-2). Bei PGRPs ohne Amidase-Aktivität ist der Cystein-Rest durch einen Serin-Rest ersetzt. Das Vorhandensein dieses Cystein-Restes dient demnach als Vorhersage einer Amidase-Aktivität von PGRPs [170, 189, 190].

Auch wenn die Hauptfunktionen der Säugetier-PGLYRPs aufgeklärt wurden, ist es wahrscheinlich, dass die PGLYRPs noch weitere unbekannte Aktivitäten und Funktionen besitzen. Sang *et al.* konnten 2005 etwa zeigen, dass die zwei porzinen Spleißformen von PGLYRP-2, PGLYRP-2A und PGLYRP-2B bei der Expression des antimikrobiellen Peptids  $\beta$ -Defensin eine bedeutende Rolle spielen. Ein Stilllegen des Gens für PGLYRP-2B führte zu

einer Herabregulierung der Expression von  $\beta$ -Defensin-1 in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2), die mit *Listeria monocytogenes* infiziert wurden [184].



**Abbildung 1: Funktionen der Säugetier-PGLYRPs (modifiziert nach [104]).** Die sezernierten *peptidoglycan recognition proteins* PGLYRP-3, -4 sowie das Heterodimer PGLYRP-3:4 wirken direkt bakterizid gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien. Daneben wirken sie synergistisch mit antibakteriellen Peptiden (z. B. PLA<sub>2</sub>, Defensine). Die bakterizide Wirkung erfordert physiologische Konzentrationen von Zn<sup>2+</sup>-Ionen (2 – 5 μM). PGLYRP-2 besitzt eine Amidase-Aktivität und hydrolysiert die Spaltung der Peptidbindung an der dargestellten Position im Peptidoglykan. Durch diese Spaltung werden Liganden für Nod2 (meso-DAP) abgebaut und Liganden für Nod1 (MDP) bereitgestellt. Für die Amidase-Aktivität werden Zn<sup>2+</sup>-Ionen als Cofaktoren benötigt. Eine gesteigerte Zytokin-Produktion aufgrund einer Stimulierung durch MDP führt zu einer Expression der PGLYRPs. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Microbiology, copyright (2007).

### 1.1.9. Der Schlüssel-Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor-κB* (NF-κB) spielt eine Schlüsselrolle bei der Expression einer Vielzahl von Zielgenen, welche z. B. die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose-Mechanismen regulieren [202]. Außerdem spielt er eine entscheidende Rolle bei der zellulären Antwort auf verschiedenste Arten von Stress, bei Immun- und Entzündungsreaktionen [203–205]. Die NF-κB-Familie besteht bei Säugetieren

aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), c-Rel, RelB, p105/p50 (NF-κB1) und p100/p52 (NF-κB2) [202, 206, 207]. Diese Proteine besitzen alle eine strukturell konservierte, N-terminale 300 Aminosäuren umfassende Rel-homologe Domäne (RHD), welche die Dimerisierungs-, Kernlokalisierungs- und DNA-bindende Domäne enthält [208]. Jedes Mitglied der Vertebraten NF-κB-Familie kann *in vivo* Homo- oder Heterodimere bilden. Die einzige Ausnahme ist RelB, welches *in vivo* nur Heterodimere bilden kann. Hauptsächlich kommt ein Heterodimer bestehend aus einer p65 Untereinheit, assoziiert mit einer p50 oder p52 Untereinheit vor. Die NF-κB Transkriptionsfaktor-Dimere binden an DNA-Sequenzen (sogenannte κB-Sequenzen) mit einer Länge von 9 – 10 bp sowie einer großen Variabilität [209, 210]. Für die Initiation der Transkription ist neben der Fähigkeit die entsprechende DNA-Sequenz zu erkennen auch das Vorhandensein einer Transaktivierungsdomäne im C-terminalen Bereich des Proteins erforderlich. Diese besitzen aus den Vertretern der NF-κB/Rel-Familie nur p65, RelB und c-Rel [203, 211–213]. Dementsprechend verfügen auch nur NF-κB-Dimere, welche diese Untereinheiten enthalten, über die Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription. In einigen wenigen Zelltypen, z. B. B-Lymphozyten oder auch dendritischen Zellen, ist NF-κB konstitutiv im Zellkern aktiv, in den meisten anderen Zelltypen liegt es jedoch inaktiv an Inhibitor-Proteine, sogenannte IκB-Proteine, gebunden im Cytoplasma vor. Es gibt eine Vielzahl von IκB-Proteinen, zu den wichtigsten Vertretern gehören IκBα, IκBβ und IκBε [202]. Die verschiedenen regulatorischen IκB-Proteine haben unterschiedliche Affinitäten zu den NF-κB-Dimeren, werden unterschiedlich durch Phosphorylierungen und proteolytische Spaltungen reguliert, und zeigen gewebespezifische Genexpressionsmuster.

Es gibt zwei, vermutlich auch mehr, Signalwege die zu einer Aktivierung von NF-κB führen können. Die beiden am besten beschriebenen Signalwege werden als kanonischer und nicht-kanonischer oder auch klassischer und alternativer Signalweg bezeichnet. NF-κB kann durch eine Vielzahl (ca. 200) an Stimuli, z. B. Zytokine (z. B. TNF-α, IL-1), Radikale, Bindung von Liganden an die Antigen-Rezeptoren von B- und T-Zellen sowie bakterielle oder virale Antigene aktiviert werden [206, 214–216]. Ein Ausschnitt der verschiedenen Stimuli ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Überblick ausgewählter NF-κB-Aktivatoren.**

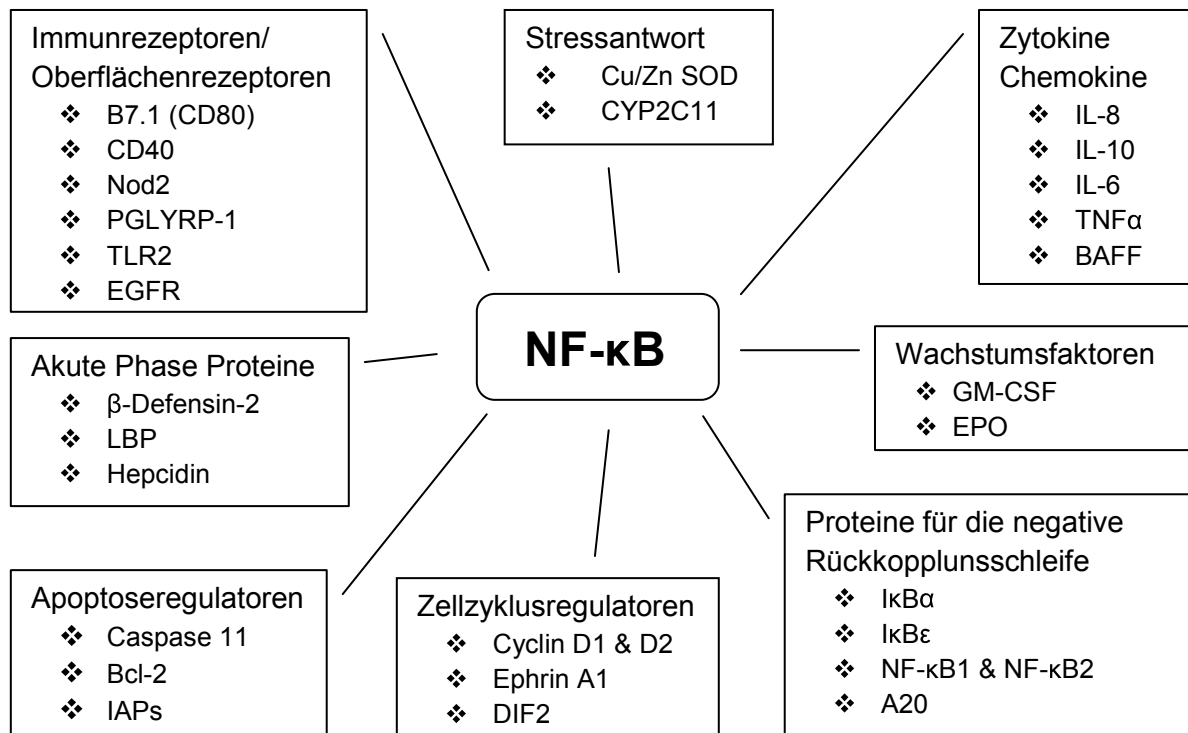
Stimulus	Referenz	Stimulus	Referenz
<i>Bakterien</i>		<i>Zytokine</i>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	[217]; [218]	IL-1	[214]; [215]; [219]; [220]
<i>Staphylococcus aureus</i>	[221]; [222]	IL-2	[206]; [223]
<i>Bakterielle Produkte</i>		IL-18	[224]

## Einleitung

Flagellin	[225–227 ]	TNF $\alpha$	[206]; [215]; [219]; [220]
Lipoteichonsäure (LTA)	[228]; [229]; [230]	<i>Physikalischer Stress</i>	
Lipopolysaccharide (LPS)	[205]; [215]; [231]; [232]	UV-Strahlung	[214]; [215]; [233]
Muramyl-Peptide	[234]; [235]	<i>Oxidativer Stress</i>	
<i>Staphylococcus</i> enterotoxin A und B	[222]; [236]	Ozon	[237]
<i>Viren</i>		Wasserstoffperoxid	[206]; [238]
Epstein-Barr Virus (EBV)	[239]	<i>Rezeptor-Liganden</i>	
Influenza Virus	[240]	TCR-Aktivierung/ BCR-Aktivierung	[203]; [206]; [214]

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch bakterielle und virale Antigene ist von entscheidender Bedeutung für eine effektive Immunabwehr. Zytokine können über den Transkriptionsfaktor physiologische Prozesse im Zusammenhang mit beispielsweise der Immunregulation, Entzündungsreaktionen aber auch Differenzierungs- und Wachstumsprozessen steuern. NF- $\kappa$ B ist ein zentraler inflammatorischer Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, insbesondere pro-inflammatorischer Zielgene, wie z. B. IL-1, IL-8, TNF $\alpha$ , in deren Enhancer- bzw. Promotorregion die NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenz enthalten ist. Daneben spielt NF- $\kappa$ B auch eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort. In B- und T-Zellen wird NF- $\kappa$ B durch Antigene aktiviert und reguliert beispielsweise die B-Zell-Reifung. Bei einer Mutation von NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 in Mäusen werden keine reifen B-Zellen gebildet [241]. NF- $\kappa$ B-Proteine regulieren die Lymphozyten-Entwicklung durch eine Beeinflussung der Proliferation, das Verhindern einer TNF-induzierten Apoptose und einer Regulierung der Expression von anti-apoptotischen Genen [203, 242, 243].

Bislang wurden mehr als 500 NF- $\kappa$ B-Zielgene identifiziert [244]. Diese Zielgene lassen sich abhängig von ihrer Funktion in unterschiedliche Kategorien einteilen. Abbildung 2 zeigt Beispiele für Gene, welche durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert werden.



**Abbildung 2: Zielgene von NF- $\kappa$ B (modifiziert nach [244]).** EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*; LBP, *Lipopolysaccharide binding protein*; Bcl-2, *B-cell lymphoma 2*; IAPs, *Inhibitor of apoptosis proteins*; DIF2, *Differentiation-dependent gene 2 protein*; CYP2C11, *cytochrome P450, subfamily 2, polypeptide 11*; GM-CSF, *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*; EPO, *Erythropoietin*; BAFF, *B-cell Activating Factor*, A20, auch bekannt als TNFAIP3, *Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3*.

Prinzipiell beruht die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auf einer proteolytischen Degradation des entsprechenden I $\kappa$ B-Proteins. Die kanonische (klassische) NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch z. B. TNF $\alpha$ , IL-1 oder LPS resultiert in einer Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK), welcher aus einer katalytischen Kinase-Untereinheit (IKK $\alpha$  und/oder IKK $\beta$ ) und einer regulatorischen Untereinheit (*NF- $\kappa$ B essential modulator*, NEMO, IKK $\gamma$ ) besteht [210, 245]. Dieser I $\kappa$ B-Kinase-Komplex phosphoryliert die I $\kappa$ B-Proteine und leitet damit deren Ubiquitinierung und den Abbau durch das Proteasom ein. NF- $\kappa$ B-Moleküle, überwiegend Heterodimere mit p65, werden von ihren Inhibitoren freigesetzt und können nun in den Zellkern gelangen, wo sie an die spezifischen DNA-Sequenzen binden und die Transkription ihrer Zielgene einleiten. I $\kappa$ B wird allerdings schnell resynthetisiert, um erneut seine inhibitorische Kontrolle von NF- $\kappa$ B aufzunehmen [203, 210]. In den meisten Fällen erfolgt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Anwesenheit eines kontinuierlich vorhandenen Stimulus transient und zyklisch entsprechend der wiederholten Degradation und Re-Synthese von I $\kappa$ B. Beispielsweise konnte in murinen Fibroblasten gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von TNF $\alpha$  die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B alle 30 – 60 Min. auftritt und wieder verschwindet [246].

Der seltenere nicht-kanonische oder alternative Signalweg wird durch eine begrenzte Anzahl von Rezeptor-Signalen (z. B. Lymphotoxin  $\beta$ ; *B-cell activating factor*, BAFF; CD40) eingeleitet und verläuft über einen I $\kappa$ B-Kinase-Komplex, der zwei IKK $\alpha$  Untereinheiten, aber

kein NEMO enthält [245]. Die Ligandenbindung führt zur Aktivierung der *NF-κB inducing kinase* (NIK), welche den IKKα-Komplex phosphoryliert und damit aktiviert. Der aktivierte IKKα-Komplex phosphoryliert zwei zur „*ankyrin repeats*“ Domäne von IκB benachbarte Serin-Reste im Vorläuferprotein p100 und leitet so die partielle Proteolyse zu p52 ein. Es entsteht ein p52/RelB-Komplex, welcher in den Zellkern transloziert [243, 245].

### **1.1.10. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine**

Zytokine und Chemokine sind kleine transient exprimierte und sezernierte Proteine oder Glykoproteine (8 – 40 kDa), welche das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren sowie einen entscheidenden Einfluss auf fast jeden Aspekt der Immunität besitzen [247]. Zytokine bzw. Chemokine dienen als Botenstoffe, die infolge einer TLR- oder NLR-Aktivierung durch z. B. bakterielle/virale Antigene, Pilze oder Parasiten sezerniert werden. So regulieren sie von der Induktion der angeborenen Immunantwort, über die Bildung zytotoxischer T-Zellen, hin zur Entstehung von Antikörpern durch das adaptive Immunsystem eine Vielzahl von Mechanismen [248–250]. Das Zytokinexpressionsprofil bestimmt, welcher Arm des Immunsystems aktiviert wird. Zytokine erzielen ihre Effekte schon bei sehr geringen Konzentrationen, allerdings haben sie eine geringe Halbwertszeit und damit auch eine begrenzte Reichweite [251, 252]. Sie können autokrin (auf die produzierende Zelle) oder parakrin (in der Nähe der produzierenden Zelle), seltener auch endokrin (auf entfernt liegende Zellen) wirken [249]. Zytokine werden im Gegensatz zu den klassischen Hormonen von einer Vielzahl von Zelltypen an unterschiedlichen Stellen im Körper, hauptsächlich von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Endothelzellen, Neutrophilen, natürlichen Killerzellen und Fibroblasten aber auch von Epithelzellen, gebildet [64, 253, 254]. Die Expression kann sowohl konstitutiv als auch nach einer Stimulierung erfolgen. Die über den ganzen Organismus verbreitete Produktion von Zytokinen spiegelt die Vielzahl von regulatorischen Aufgaben wider, welche die Zytokine übernehmen. Einige Zytokine wirken redundant. IL-1 und TNFα haben beispielsweise sehr ähnliche Wirksamkeitsprofile [247, 254]. Zytokine vermitteln ihre Effekte über die Bindung an hochspezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Anschließend kommt es zu einer Internalisierung der Zytokine und Initiation unterschiedlicher Aktivierungs-/Inhibierungsprozesse von verschiedenen enzymatischen Systemen, was letztendlich zur Modifizierung der DNA- und Proteinsynthese führt [254].

Heutzutage werden Zytokine entsprechend ihrer Rolle bei einer Infektion/Entzündungsreaktion in zwei Gruppen eingeteilt, die pro-inflammatorischen Zytokine wie z. B. TNFα, Interleukine (IL)-1, -6, -8 und -18 sowie Interferon-γ, und die anti-inflammatorischen Zytokine, wie z. B. Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-4 (IL-4) und *transforming growth factor beta* (TGFβ) [247].

Antigen-präsentierende Zellen, im Speziellen die dendritischen Zellen, spielen eine immunregulatorische Schlüsselrolle bei der Immunantwort. Darunter sind die Aufnahme und

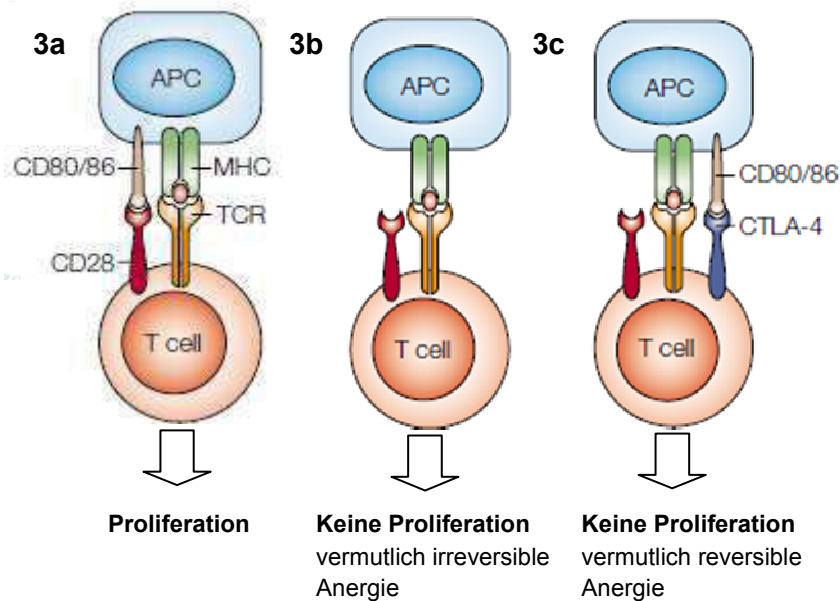


Prozessierung von Antigenen, die Aktivierung der antigenspezifischen Immunantwort und das Aufrechterhalten der Th1 – Th2 Immunbalance. Abhängig von ihrer Polarisierung lassen sich CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in zwei Typen (Th1 und Th2) mit unterschiedlicher Zytokin-vermittelter Immunantwort einteilen [255]. Die Th1-Zellen setzen als wichtigsten Immunbotenstoff Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) frei, welcher zu einer Produktion von Immunglobulin G (IgG) führt. Bei einer Th1-Immunantwort kommt es zudem zur Produktion typischer pro-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise IL-2, IL-18 und TNF- $\beta$ . In deren Rahmen werden Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophile aktiviert, B-Zellen werden gehemmt und so eine Th2-Immunantwort verhindert. Daneben wird die Passage der Leukozyten aus dem Blutstrom in das Gewebe erleichtert [247]. Die Th1-Immunantwort ist von besonderer Bedeutung für die Abwehr intrazellulärer Infekte (*Salmonella*, Mykobakterium, Chlamydien, Viren). Zytokine der angeborenen Immunantwort (pro-inflammatorische Zytokine) werden von mononukleären Phagozyten nach Stimulation mit Bakterien usw. freigesetzt. Neben der pro-inflammatorischen Wirkung haben diese Zytokine auch regulatorische Funktionen, indem sie die Freisetzung anderer Zytokine veranlassen. Von IL-1 und TNF $\alpha$  wird beispielsweise die Sekretion von IL-6, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-11, PDGF und TGF $\beta$  stimuliert [250, 254, 256].

Die Th2-Immunantwort führt zu einer Bildung von anti-inflammatorischen Zytokinen, beispielsweise IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und TGF $\beta$ . Dadurch wird die Proliferation von B-Zellen sowie die Produktion von Antikörpern (der Klassen IgA, IgM, IgG, IgE) durch die B-Zellen, also die adaptive Immunantwort, vermittelt. Allerdings kommt es auch zur Hemmung der Makrophagen-Aktivierung. Die Th2-Immunantwort tritt bei extrazellulären bakteriellen und parasitären Infektionen sowie allergischen Erkrankungen auf. Ein immunologisches Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Immunantwort ist von großer Bedeutung, die Th1-Antwort führt hauptsächlich zu Entzündungsreaktionen, wohingegen die Th2-Antwort diese Entzündungen unterdrückt. Zu den wichtigsten anti-entzündlichen Zytokinen gehören TGF $\beta$  und IL-10. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Immuntoleranz. IL-10 hemmt die Bildung von Zytokinen der Th1-Antwort und wirkt verlängernd auf Überleben, Vermehrung und Antikörperproduktion von B-Lymphozyten [250]. Das Zytokin beeinflusst drei wichtige Funktionen von Monozyten/Makrophagen: die Freisetzung von Immunmodulatoren, die Antigen-Präsentation sowie die Phagozytose [257]. Die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 bewirkt die Inhibierung der LPS-induzierten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF $\alpha$ ) in humanen Monozyten durch die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Diese Wirkung von IL-10 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg in Monozyten beinhaltet die Blockade der Freisetzung von I $\kappa$ B vom NF- $\kappa$ B-Komplex (IKK-Hemmung) sowie die Hemmung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B [258]. Kuwata *et al.* (2003) konnten daneben mit Hilfe einer Microarray-Analyse zeigen, dass *Bcl-3* (*B-cell lymphoma 3-encoded protein*) in Makrophagen ein durch IL-10-

induzierbares Gen ist [259]. Das Protein Bcl-3 besitzt 7 „ankyrin repeats“ Domänen, die eng verwandt mit denen aus I $\kappa$ B-Proteinen sind und ist ein atypischer Vertreter der NF- $\kappa$ B-Inhibitor-Familie [260]. Dieses Protein fungiert als transkriptioneller Ko-Aktivatoren [260, 261]. In *bcl-3*-transduzierten und mit IL-10 stimulierten Makrophagen konnte beobachtet werden, dass die LPS-induzierte Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern nicht beeinflusst wurde. Dagegen wurde die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B (Heterodimer p50/p65) gehemmt. Deletionsversuche konnten verdeutlichen, dass Bcl-3 für die IL-10-vermittelte Hemmung der Produktion von TNF $\alpha$  verantwortlich ist [259].

IL-10 inhibiert außerdem die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 durch dendritische Zellen und andere Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und verhindert so die Fähigkeit der APCs zusätzliche Signale bereitzustellen, die für eine Aktivierung von T-Helferzellen notwendig sind [262]. Das Interleukin-10 wirkt aber auch direkt auf T-Zellen, um ihre Zytokin-Produktion zu hemmen, indem es die Expression von CD28 und anderer induzierbarer Ko-Stimulatoren verhindert [263]. Die Interaktion zwischen CD28 mit den B7-Molekülen CD80 oder CD86 auf APCs initiiert ein ko-stimulierendes Signal für die T-Zellen, welches nachhaltig die T-Zell-Aktivierung über T-Zell-Rezeptoren steigert. Allerdings ist die T-Zell-Immunantwort das Ergebnis eines Gleichgewichts aus stimulatorischen und inhibitorischen Signalen [264, 265]. CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) ist ein Zelloberflächenmolekül, dessen Expression hauptsächlich auf T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, beschränkt ist. Eine Expression wurde auch für B-Zellen beschrieben. CTLA4 ist eng verwandt mit CD28 und es konnte gezeigt werden, dass CTLA4 ein wirksamer negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung ist [265, 266]. Die T-Zell-Antwort wird durch eine Konkurrenz mit dem positiven Stimulator CD28 um die Ligandenbindungsstellen auf T-Zellen gehemmt [266]. Zu einer T-Zell-Aktivierung kommt es bei gleichzeitiger Erkennung von einerseits einem spezifischen MHC-Komplex durch den T-Zell-Rezeptor und andererseits von B7.1 (CD80) bzw. B7.2 (CD86) durch den ko-stimulatorischen Rezeptor CD28 (siehe Abbildung 3a). Es kommt zur Produktion von IL-2 und nachfolgend zu einer Proliferation der T-Zellen. Bei Abwesenheit der Ko-Stimulatoren führt ein starkes Signal durch den T-Zell-Rezeptor zu einer vermutlich irreversiblen Anergie oder die Zellen werden apoptotisch (Abbildung 3b). Durch die Aktivierung der T-Zellen kommt es zu einer verstärkten Expression von CTLA4, welche zum Ende der Proliferation führt. Es kommt zur Konkurrenz um die Bindungsstellen und damit zur reversiblen Anergie der T-Zellen (Abbildung 3c).



**Abbildung 3: Einfluss von CTLA4 auf die Aktivierung von T-Zellen (modifiziert nach [265]).** Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, copyright (2001).

Werden dendritische Zellen mit IL-10 behandelt führt dies zu einer Peptid-spezifischen Anergie in verschiedenen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen [267]. Bei Ko-Kultivierung der anergischen T-Zellen mit T-Zellen derselben Peptidantigen-Spezifität kommt es zu einer Hemmung der Proliferation dieser T-Zellen [267–270]. Diese Hemmung ist abhängig von Zell-Zell-Kontakten und wird teilweise durch CTLA4 vermittelt. Eine Blockierung des CTLA4-Weges führt zu einer 70%igen Wiederherstellung der T-Zellproliferation [270].

Chemokine sind kleine (8 – 12 kDa) Zytokin-ähnliche Polypeptide, welche die Fähigkeit besitzen, Chemotaxis in einer Vielzahl von Zellen (z. B. Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten und Eosinophilen) anzuregen [250]. Bis heute sind 52 humane Chemokine und 20 Chemokin-Rezeptoren identifiziert [271, 272]. Chemokine vermitteln ihre Aktivität durch Interaktionen mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine [273]. Traditionell werden Chemokine basierend auf der Position ihrer Cysteinbausteine in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: CXC, CC, C und CX3C [274]. Innerhalb einer Subfamilie existiert eine 30 – 90%ige Aminosäure-Identität [250, 274]. Bei den C-Chemokinen fehlen der erste und der letzte Cysteinrest. Die ersten beiden Cysteinreste sind bei der CC-Motiv-Familie direkt miteinander verbunden. In der Familie der CX3C-Chemokine sind die ersten beiden Cysteinreste durch drei variable Aminosäuren voneinander getrennt. Nur ein Mitglied dieser Familie ist bis heute identifiziert worden: CX3CL1 (fractalkine) [273, 275]. Bei der CXC-Familie sind die ersten beiden Cysteinreste durch eine variable Aminosäure unterbrochen [250, 273]. Insgesamt enthalten Chemokine des CXC-Motivs vier Cysteinreste. Ein wichtiger Vertreter dieser Familie ist IL-8. Dieses Zytokin ist als Entzündungsmediator in die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten,

insbesondere von neutrophilen Granulozyten, in das entzündete Gewebe involviert [276, 277]. IL-8 gehört zur Gruppe der Chemokine, die selektiv bei Entzündungsreaktionen exprimiert werden. Im gesunden Gewebe wird es kaum exprimiert. Eine subkutane Injektion von IL-8 führt an der Einstichstelle zu einer T-Lymphozyten Einwanderung [278]. *In-vitro*-Experimente mit IL-8 konnten zeigen, dass dieses Chemokin eine Vielzahl von Wirkungen auf Neutrophile ausübt. Dazu gehört die Freisetzung lysosomaler Enzyme [279], Induktion von oxidativem Stress [280], Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid [281] sowie Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen [282, 283]. Die Expression des Chemokins wurde für eine Vielzahl von Zellen beschrieben [284, 285]. Verschiedene Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ), bakterielle (v. a. Lipopolysaccharide) oder virale Antigene sowie zellulärer Stress können die Expression von IL-8 veranlassen [65, 286–292]. Dabei können einige Stimuli wie z. B. IL-1 und TNF $\alpha$  die Expression von IL-8 um mehr als das 100-Fache erhöhen [288], wohingegen andere, z. B. bakterielle Antigene, nur eine 5 – 10-fache Erhöhung hervorrufen [218, 285, 291]. *Salmonella typhimurium* löst die Bildung von IL-8 in intestinalen Epithelzellen aus und führt zur chemotaktischen Einwanderung von Neutrophilen [293].

### **1.1.11. Besonderheiten des Immunsystems bei Schweinen**

Prinzipiell verläuft die vorgeburtliche Entwicklung des Schweins in Bezug auf das Immunsystem anders als beim Menschen. Im Gegensatz zu Primaten und Nagern wird der Schweineembryo durch eine epitheliochoriale Plazenta ernährt [294]. Die Plazenta nistet sich hier kaum in das mütterliche Gewebe ein, die äußere Schicht des Chorions (Embryos) bleibt in Kontakt mit der intakten Schicht des Uterusepithels. Neugeborene Ferkel können Antikörper nur über das Kolostrum erhalten, da die maternalen Antikörper die Plazenta nicht überqueren können [295]. Die kurz nach der Geburt durch das Kolostrum aufgenommenen Antikörper überqueren das intestinale Epithelium und treten in den Blutzyklus der Ferkel ein [294]. In der Milch der Sauen ist IgA ebenso wie Transferrin und Laktoferrin (antibakterielle Wirkung) enthalten. Eine antibakterielle Wirkung der Muttermilch von Sauen auf *E. coli* konnte gezeigt werden [296, 297]. Zunächst ist das neugeborene Ferkel also auf die Antikörper der Mutter angewiesen, da es erst ab etwa dem zehnten Lebenstag mit der Bildung eigener Antikörper beginnt [298]. Der Darm der neugeborenen Ferkel ist mehr oder weniger frei von Leukozyten [299]. Neben den Abweichungen bei der frühen Entwicklung des Immunsystems gibt es auch Spezies-spezifische Unterschiede bei der frühen Entwicklung des lymphatischen Gewebes (GALT). Die Verteilung der Peyer'schen Platten, der M-Zellen sowie der intraepithelialen Lymphozyten ist von der Tier-Spezies abhängig. Beispielsweise haben die Schweine eine sehr lange, kontinuierliche ileale Peyer'sche Platte, welche im Alter von 4 Wochen bis zu 2 m lang werden kann [300]. Der distale ileale Teil unterscheidet sich sowohl in der Größe (2 – 15 cm gegenüber 2 m) als auch in der Zellzusammensetzung von

den diskreten jejunalen Peyer'schen Platten, welche unregelmäßig über das Jejunum verteilt sind [301]. Dabei beherbergt der ileale Teil bis zu 80 % B-Zellen, welche gemeinsam mit Immunglobulin A bis zur *Lamina propria mucosae* wandern und dort ihre Aufgaben übernehmen [302, 303]. Die Struktur und Diversität der IgA Allele weicht von denen im Menschen ab. Beim Schwein kommt IgA im Serum als Dimer oder noch größeres Polymer vor, wohingegen IgA beim Menschen hauptsächlich als Monomer auftritt [304]. Die kontinuierliche ileale Peyer'sche Platte entwickelt sich im ersten Lebensjahr und verschwindet in älteren Tieren teilweise wieder [294]. Daneben wurde auch gezeigt, dass die Antigen-aufnehmenden M-Zellen sich in den verschiedenen Spezies hinsichtlich ihrer Zelloberflächen unterscheiden. Diese Spezies-spezifischen Modifikationen der Oberfläche der M-Zellen könnten teilweise für die Wirtsabhängigkeit unterschiedlicher *Salmonella*-Serovare verantwortlich sein [305, 306].

Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass Schweine im Gegensatz zu anderen Säugetieren kein  $\alpha$ -Defensin produzieren. Bis jetzt konnte nur das porcine  $\beta$ -Defensin identifiziert werden. Dieses wird zwar konstitutiv exprimiert, allerdings wird die Expression als Reaktion auf eine Infektion nicht hochreguliert. Die konstitutive Expression von  $\beta$ -Defensin deutet darauf hin, dass dieses antimikrobielle Peptid für die Aufrechterhaltung des „Steady State“-Zustandes der Mikroflora auf der Mukosa verantwortlich ist [307, 308].

Im Gegensatz zum Menschen werden beim Schwein keine Antigene durch die intestinalen Epithelzellen präsentiert, da der dafür notwendige MHC II (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II) hier nicht exprimiert wird.

Intestinale Epithelzellen produzieren Zytokine und Chemokine, um z. B. Neutrophile anzulocken. Verschiedene Zytokine (z. B. TGF- $\alpha$ , IL-1, IL-10, IL-18) werden dabei konstitutiv exprimiert, andere (z. B. IL-8, TNF $\alpha$ , IL-6, GM-CSF) hauptsächlich als Antwort auf eine mikrobielle Infektion [253, 309]. Dabei kann die intestinale Sekretion/Expression von Zytokinen und Chemokinen in Schweinen von vielen intrinsischen und extrinsischen Faktoren abhängen. Beispielsweise wird das Absetzen der Ferkel durch einen vorübergehenden Anstieg der Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) begleitet [310–312]. Außerdem können Infektionen mit verschiedenen Pathogenen, z. B. *Salmonella* spp. ebenfalls zu einer erhöhten intestinalen Expression pro-inflammatorischer Zytokine führen [313, 314].

Das Interleukin-8 ist ein Haupt-Chemoattraktant für Neutrophile und spielt in Mensch und Schwein sowohl während der intestinalen Infektion als auch später bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. In porcinen Makrophagen wird IL-8 in einer hohen Konzentration produziert [315]. Dahingegen wird IL-8 in Mäusen nicht produziert, was einen beachtlichen Unterschied bezüglich intestinaler Modelle verglichen mit Menschen und Schweinen ausmacht [316].

Daneben haben Schweine ungewöhnliche Immunzellpopulationen. Im Gegensatz zu Mensch und Maus besitzen Schweine CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positive T-Zellen, welche bei ausgewachsenen Tieren etwa 25 % der T-Zellen ausmachen [303, 317, 318]. Beim größten Teil davon handelt es sich um T-Zellen mit Helferfunktion, einige besitzen aber auch zytotoxische Eigenschaften [318, 319].

### 1.2. Probiotika

Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) sind Probiotika „definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen“ (WHO, BfR) [320]. Der Begriff leitet sich aus dem Lateinischen her; „pro“ bedeutet „für“, und „bios“ ist „das Leben“. Probiotische Bakterien werden in der Lebensmittelherstellung, als Futterzusatz aber auch in medizinischen Präparaten eingesetzt.

Für die Definition als probiotisches Lebensmittel muss der Erhalt der probiotischen Eigenschaften in Abhängigkeit von den Kulturen in dem jeweils beworbenen Lebensmittel gegeben sein. Dabei reicht es nicht aus, dass die Kulturen alleine betrachtet probiotische Wirkungen haben. Probiotische Lebensmittel sind daher laut Definition: „Lebensmittel, die Probiotika in einer Menge enthalten, bei der die probiotischen Wirkungen nach dem Verzehr eines derartigen Lebensmittels erzielt werden“. Diese Definition impliziert, dass eine gesundheitsfördernde Wirkung für das Probiotikum nachgewiesen werden muss. So wurden von der FAO-WHO 2005 Richtlinien veröffentlicht, die festlegen, welche Eigenschaften notwendig sind, um den Namen „probiotisches Lebensmittel“ tragen zu können [321, 322]. Hierzu müssen die enthaltenen probiotischen Stämme individuell systematisiert werden: Angabe des Phänotyps, Beschreibung der funktionellen Wirksamkeit (gesundheitsfördernd) sowie die Bewertung der Sicherheit. Die zu verwendenden *In-vitro*-Tests zur Beurteilung der Sicherheit sind ebenfalls angegeben. Gesundheitsfördernde Wirkungen, die nachgewiesen wurden, sind z. B. die Verbesserung der intestinalen mikrobiellen Homöostase [323], die Stabilisierung und Verbesserung der gastrointestinalen Barrierefunktion [14], die Expression von Bakteriozinen [324], immunmodulatorische Effekte [15], die Inhibierung von prokarzinogenen Enzymen und die negative Beeinflussung pathogener Keime bez. der Kolonisation und Infektion der Schleimhaut [16]. Von einem probiotischen Bakterium werden folgende Charakteristika und Sicherheitskriterien erwartet (modifiziert nach Gaggia, F. *et al.*; 2010 [17]):

- ❖ Nichttoxisch, apathogen
- ❖ Genaue und exakte taxonomische Identifizierung
- ❖ Normal vorkommender Bewohner der Wirtsspezies
- ❖ Überleben, Kolonisation und metabolische Aktivität am Zielort:

- Resistent gegenüber Magensäure und Galle
- Intestinale Persistenz
- Vermögen zur Adhäsion an Epithelzellen oder Mucus
- Vermögen mit der vorhandenen Darmflora zu konkurrieren
- ❖ Produktion antimikrobieller Substanzen
- ❖ Antagonismus gegenüber pathogenen Bakterien
- ❖ Modulation der Immunantwort
- ❖ Geringe Ausscheidungsrate lebensfähiger Probiotika
- ❖ Genetische Stabilität
- ❖ Bestehende Viabilität während der Verarbeitung, Lagerung und Auslieferung
- ❖ Gute sensorische Eigenschaften
- ❖ Produktion im Großformat möglich

Für die Zulassung, das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermittelzusatzstoffen (Pre- und Probiotika) gilt die Verordnung (EG) 1831/2003, welche im November 2003 in Kraft trat.

Gerade die Sicherheit verschiedener probiotischer Stämme muss unterschiedlich bewertet werden. Milchsäurebakterien, die schon traditionell als Startkulturen für Milchprodukte verwendet wurden (*Lactobacillus*- und *Bifidobacterium*-Stämme, *Streptococcus thermophilus*), werden als unbedenklich eingestuft. Diese Unbedenklichkeit kann allerdings nicht pauschal auf andere Stämme übertragen werden. Die Übertragung von Antibiotika-Resistenzen von probiotischen Bakterien auf andere Keime der Darmflora steht dabei vor allem im Fokus. Solche übertragbaren Resistenzen wurden vielfach für Enterokokken beschrieben, wohingegen diese bei Laktobazillen nicht nachgewiesen werden konnten [325–328]. Im Mai 2012 hat die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit eine Leitlinie zur Bewertung der Sicherheit von *Enterococcus faecium* in Futtermitteln veröffentlicht. Bisher war es notwendig, das Fehlen einer Reihe von Virulenzmarkern im Bakterium nachzuweisen, damit Zusatzstoffe auf Basis von *E. faecium* von der EFSA als unbedenklich eingestuft wurden. Im neuen EFSA-Leitfaden wird eine einfachere Methode zur Differenzierung zwischen sicheren und potenziell schädlichen klinischen *E. faecium*-Stämmen beschrieben. Diese Methode beruht auf der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin sowie dem Fehlen dreier genetischer Virulenz-assoziiertes Marker [329].

### 1.2.1. Eingesetzte probiotische Stämme

Hauptsächlich werden spezielle Arten von Milchsäurebakterien, die besonders widerstandsfähig gegenüber Säuren sind und deshalb die Passage durch Magen und Dünndarm größtenteils überleben, als Probiotika eingesetzt. Die bekanntesten Vertreter dieser Bakteriengruppe sind die Laktobazillen und die Bifidobakterien, die beide auch als Starterkulturen in Milchprodukten Verwendung finden. Ebenfalls im Nahrungsmittelbereich

werden verschiedene Hefen und das sogenannte „Joghurtbakterium“ *Streptococcus thermophilus* eingesetzt. Hefen sind einzellige Pilze, die vom Menschen schon seit Jahrtausenden als Katalysatoren bei Gärungs- und Verdauungsprozessen genutzt werden [330–332]. Diverse *Saccharomyces*-Arten werden in medizinischen Präparaten eingesetzt (Biotherapeutika). Gleiches gilt für etliche Enterokokken- und Kolibakterienstämme, die ebenfalls zu den Probiotika zählen. Letztere machten durch ihren berühmtesten Vertreter, den *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 (heute Bestandteil des Medikaments Mutaflor®), bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts im Zusammenhang mit der Behandlung von schweren Durchfallerkrankungen von sich reden [333, 334]. Unabdingbar für die Wirksamkeit eines probiotischen Mikroorganismus ist die regelmäßige Aufnahme. Diese ist bei einer Zufuhr von mindestens  $10^8 - 10^9$  lebenden Keimen/Tag messbar (BgVV, 1999; [335]). Trotz vorhandener Resistenz gegenüber den Verdauungssekreten erreichen im Regelfall nur etwa 10 – 30 % der verzehrten probiotischen Mikroorganismen das Kolon lebend (BgVV, 1999; [335]). Von der European Federation of Health Product Manufacturers (EHPM), einer Organisation der europäischen Lebensmittelindustrie, ist im Zusammenhang mit der Umsetzung des in der „Health-Claims-Verordnung“ (VO 1924/2006) geforderten Profils gesundheitsbezogener Aussagen für Lebensmittel eine Liste aller von der Lebensmittelindustrie in der EU als Probiotika verwendeten Bakterien-Stämme zusammengestellt worden (Stand 2007). Diese Liste umfasst 74 probiotische Stämme mit kurzen Angaben zu deren Charakteristika, einzusetzenden Konzentrationen usw. ([www.ehpm.org](http://www.ehpm.org); [336]).

### **1.2.2. Probiotika als Futtermittelzusatzstoffe**

In der 2. Hälfte des vergangenen Jahrhunderts erforderte der schnelle Aufschwung der industriellen Tierproduktion vor allem aus ökonomischen Gründen eine verbesserte Futtermittelverwertung und Haltungshygiene. Dazu wurden zunächst Antibiotika in subtherapeutischen Dosen prophylaktisch eingesetzt. Dies führte allerdings zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Tiere gegenüber pathogenen Bakterien, was auf eine veränderte Zusammensetzung der Mikroflora zurückzuführen war. Bereits im Jahr 1973 wurde in einer Studie an Küken gezeigt, dass durch eine „Beimpfung“ mit Kot gesunder adulter Tiere die Resistenz gegenüber einer Salmonelleninfektion gesteigert werden konnte [337]. Diese Studie diente als Vorlage für viele folgende Untersuchungen, bei denen die Steigerung der Resistenzen gegenüber Pathogenen durch Mikroorganismen mit antagonistischen Wirkmechanismen im Vordergrund stand. Im Jahr 1978 wurde daneben durch eine Studie an gnotobiotischen Mäusen die entscheidende Stellung einer intakten Darmflora zur Abwehr von Infektionskeimen herausgestellt [338]. Heute wird international eine große Anzahl von Mikroorganismen als probiotische Futtermittelzusatzstoffe in der Nutztierzucht eingesetzt.



Seitdem Probiotika als Alternativen für Antibiotika in Futtermitteln zur Förderung von Wachstum und Leistung diskutiert werden, sind zunehmend ihre Auswirkungen auf den Gesundheitsstatus sowie die Produktivität der Nutztiere von primärem Interesse. Für die Zulassung von Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe ist ein Wirksamkeitsnachweis notwendig.

Mögliche positive Effekte von probiotischen Mikroorganismen in der Nutztierzucht sind (modifiziert nach [339] in [340, 341]):

- ❖ Beschleunigung der Lebendmassezunahme bei Masttieren
- ❖ Verbesserte Futtermittelnutzung
- ❖ Verbesserte Absorption von Nährstoffen
- ❖ Gesteigerte Milchproduktion
- ❖ Verbesserte Milchqualität
- ❖ Gesteigerte Eiproduktion und verbesserte Eiqualität
- ❖ Verbesserte Abwehr gegenüber Infektionskrankheiten

Die häufigsten signifikanten Effekte von probiotischen Mikroorganismen konnten beobachtet werden, wenn sie in einem für das Tier besonders stressreichen Lebensabschnitt dem Futter zugesetzt wurden. Beispielsweise während des Absetzens vom Muttertier oder am Beginn der Laktationsperiode. In beiden Fällen bedeutet dies Stress für das Tier, aber auch für die vorhandene Darmflora. Tabelle 4 zeigt Beispiele für den tierspezifischen Einsatz von probiotischen Mikroorganismen in der Nutztierzucht (modifiziert nach Reuter [342]). Zur Applikation werden die probiotischen Mikroorganismen als Mono- oder Mischkulturen dem Trinkwasser oder Futter zugesetzt, bei Geflügel auch mittels Aerosol.

**Tabelle 4: Beispiele für probiotische Mikroorganismen und der tierspezifische Einsatz bei landwirtschaftlichen Nutztieren (+) = gelegentlich; + = mäßig häufig; ++ = häufig.**

Probiotischer Mikroorganismus	Schwein	Geflügel	Kalb/Lamm	Rind/Schaf
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	(+)	(+)	(+)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	(+)	++		
<i>Lactobacillus</i> -Mischung	++	++	++	
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	(+)			
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	(+)			
<i>Bacillus subtilis</i>	(+)			
<i>Bacillus toyoi</i>	++			
<i>Bacillus licheniformis</i>	(+)			
<i>Enterococcus faecialis</i>	(+)			
<i>Enterococcus faecium</i>	+	(+)	++	(+)
<i>Saccharomyces</i> spp.	(+)	+	++	+

### 1.2.2.1. Probiotika in der Schweinemast

Nutztiere sind oft verschiedensten umweltbedingten Stressfaktoren ausgesetzt (z. B. Veränderungen der Futterdiät), welche zu einem Ungleichgewicht des intestinalen Ökosystems und damit zu einem erhöhten Risiko einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen führen können. Für jede Tierspezies gibt es hierfür einen kritischen Punkt in der Produktionskette. In der Schweinemast tritt der meiste Stress für die Tiere während des Absetzens von der Mutter auf. Das Absetzen ist mit einer drastischen Veränderung in der sozialen Umgebung, der Haltungsumwelt und der Fütterung (Wechseln von Milch zu einer Diät basierend auf pflanzlichen Polysacchariden) verbunden, was für die Ferkel starken akuten Stress bedeutet [343]. Die Periode des Absetzens ist durch eine reduzierte Futteraufnahme und damit auch ein verlangsamtes Wachstum gekennzeichnet [344, 345]. Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass abgesetzte Ferkel eine höhere Konzentration von Stresshormonen (z. B. Cortisol) im Blut haben. Eine verringerte Zellteilungsaktivität von Lymphozyten wurde ebenfalls nachgewiesen [346, 347]. Insgesamt führt diese verminderte Immunfunktion zu einer erhöhten Anfälligkeit der Ferkel für Krankheitserreger während der Periode des Absetzens und damit zu einer Mortalitätsrate von 20 % [7].

Bei tragenden Sauen hat die Fütterung von probiotischen Mikroorganismen einen positiven Effekt auf die Futteraufnahme und damit die Zunahme an Lebendgewicht gezeigt. In der gleichen Studie konnte auch eine größere Wurfzahl und eine verbesserte Vitalität der neugeborenen Ferkel beobachtet werden [348, 349]. In der Zeit zwischen der Geburt und dem Absetzen der Ferkel sind diese besonders anfällig für eine Besiedlung des Darms mit pathogenen Bakterien (*E. coli*, *Clostridium difficile*, *Salmonella*, *Listeria*), Viren (Rotaviren, Coronaviren), aber auch Parasiten (*Isospora*, *Cryptosporidium*), welche für Durchfallerkrankungen, eine verringerte Futteraufnahme und damit eine reduzierte Gewichtszunahme verantwortlich sind [8, 350–353]. Während dieser Zeit werden verschiedene probiotische Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe eingesetzt. Diverse Studien haben die Wirksamkeit probiotischer Mikroorganismen belegt [350, 354–358]. Eine tägliche Fütterung von Ferkeln mit *Enterococcus faecium* über die gesamte Zeit zwischen Geburt und Absetzen wirkte sich positiv auf die Anzahl der Tiere aus, die an Durchfall litten. Dies hatte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Lebendmassezunahme der Ferkel [359]. Gesundheitsfördernde Wirkungen von probiotischen Mikroorganismen wurden auch nach dem Absetzen beobachtet. In einer Studie mit *Saccharomyces cerevisiae* ssp. *boulardii* konnten Bontempo *et al.* [360] zeigen, dass diese probiotische Hefe einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Ferkel hat. Während des Absetzens kommt es häufig zu einer Abnahme der Dicke der Mukosaschicht. *S. boulardii* fördert den Wiederherstellungsprozess und insgesamt die Darmgesundheit. In einer anderen Studie wurde der Einfluss von *Pediococcus acidilactici* und *Saccharomyces cerevisiae* ssp. *boulardii* auf intestinale Immuncharakteristika und die Resistenz gegenüber Infektionen mit enterotoxischen

*Escherichia coli* (ETEC) untersucht. Es konnte eine reduzierte Sekretion von Immunglobulin A nach Fütterung mit *P. acidilactici* festgestellt werden, was ein Hinweis auf eine verbesserte Barrierefunktion des Darmes sein könnte. Außerdem wurde eine reduzierte intestinale Translokation der ETEC beobachtet [361].

In Masttieren konnte ein positiver Einfluss auf die Lebendmassezunahme in Anwesenheit von probiotischen Mikroorganismen als Futterzusatzstoffe gezeigt werden. Bei Verwendung von Milchsäurebakterien wurde außerdem ein positiver Effekt auf die mikrobielle Qualität sowie die Nährstoffqualität von flüssigem Futter gezeigt [362]. Tabelle 5 zeigt die Hauptanwendungsgebiete von probiotischen Mikroorganismen in der Schweinemast.

**Tabelle 5: Hauptanwendungsgebiete von probiotischen Mikroorganismen in der Schweinemast (modifiziert nach [363]).**

<b>Tragende Sauen</b>	<b>Laktierende Sauen und Ferkel</b>	<b>Mastschwein</b>
Verbesserte Verdaubarkeit der Diät	Verbesserte Qualität der Kolostralmilch	Verbesserter Nutzwert des Futters
Verstopfung, Darmträgheit entgegenwirken	Verbesserte Qualität und Quantität der Milch	Verbesserte Fleischqualität
Stress verringern	Erhöhte Lebendmasse, Ferkelgewicht	Durchfallrisiko vermindern
	Durchfallrisiko vermindern	

In dieser Arbeit wurde als probiotischer Mikroorganismus *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) verwendet. Dieses Probiotikum ist nach Verordnung (VO) 252/2006 im Anhang I unbegrenzt für Sauen und Ferkel zugelassen.

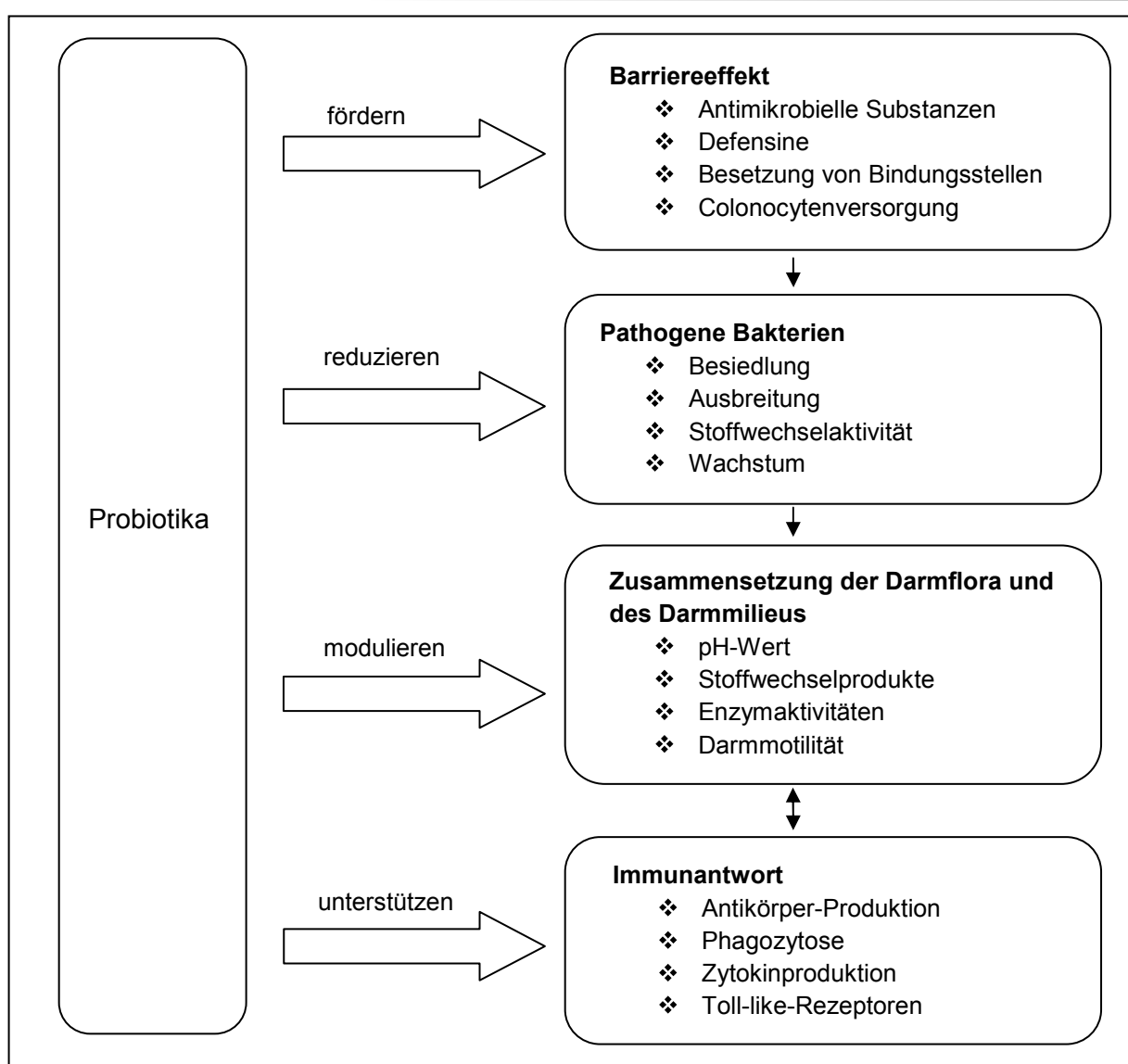
### 1.2.3. Wirkmechanismen von Probiotika

Die Zahl der Publikationen zu den Themen Wirkung und Wirkmechanismus von Probiotika hat in den letzten Jahren enorm zugenommen. Durch die vielen unterschiedlichen Studien hat sich herausgestellt, dass die probiotischen Mikroorganismen über ein sehr breites, aber auch individuell angelegtes Wirkungsspektrum verfügen. Dieses Wirkungsspektrum ist sowohl durch Interaktionen mit der wirtseigenen Mikroflora als auch durch Wechselwirkungen mit dem Wirtsorganismus selbst gekennzeichnet. Die Vielfalt der Wirkungen beruht darauf, dass es sich um lebende Einzeller handelt, welche über diverse StoffwechsellLeistungen und andere Aktivitäten verfügen [364]. Dies bedeutet allerdings auch eine gewisse Umweltabhängigkeit der Wirkungen (z. B. von den Bedingungen im Magen-Darm-Trakt) der probiotischen Mikroorganismen. In Abbildung 4 sind die Wechselwirkungen zwischen probiotischem Mikroorganismus, Darmflora und Immunsystem dargestellt (modifiziert nach DGE-Ernährungsbericht 2004, Kapitel 6 [365]).

Probiotische Mikroorganismen verfügen über die Fähigkeit, die intestinale Mikroflora zu beeinflussen und das Wachstum pathogener Keime durch die Stimulierung des Wirtes zur

Produktion von IgA und  $\beta$ -Defensin zu hemmen. Des Weiteren führen Probiotika zur Induktion der Produktion von antibakteriellen Substanzen und Hitzeschockproteinen [366–368]. Außerdem können Probiotika die Barrierefunktion des Darmes stärken, indem sie die *tight junctions* verstärken [369] und zur Mucinproduktion anregen [370]. Eine Probiotika-vermittelte Immunmodulation kann durch eine veränderte Sekretion von Zytokinen erfolgen [371]. Viele Hinweise deuten darauf hin, dass Probiotika mit dem Wirt durch Modulierung der Hauptsignaltransduktionswege, wie z. B. NF- $\kappa$ B oder MAPK, kommunizieren und so entweder durch Verstärkung oder Inhibierung auch nachgeschaltete Signalwege beeinflussen [372, 373]. Veränderungen dieser Signaltransduktionswege können auch Einfluss auf die Proliferation und Ausdifferenzierung von Immunzellen (z. B. T-Zellen) oder Epithelzellen haben [374]. Die Darmmotilität und die Nozizeption (Vermittlung der Schmerzempfindung) kann durch die Regulation der Expression von Schmerzrezeptoren und die Sekretion von Neurotransmittern beeinflusst werden [375].

Neben den intakten Bakterien können auch deren Zellwandbestandteile (Peptidoglykane, Teichonsäure, Polysaccharide) oder zellfreie Überstände ebenso wie bakterielle DNA [376] mit dem Immunsystem in Kontakt treten. In einer Studie von Bermudez-Brito *et al.* (2013) konnte gezeigt werden, dass zellfreie Kulturüberstände von *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 eine anti-inflammatorische Wirkung haben und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12p40) und Chemokine (MIP-1 $\alpha$ /CCL3) in dendritischen Zellen nach einer Infektion mit *Salmonella typhi* verringern [377]. Allerdings kam es nicht wie von Horau *et al.* ([378]) in ihrer Studie mit zellfreiem Kulturüberstand von *Bifidobacterium breve* C50 berichtet zu einer erhöhten Konzentration von IL-10.



**Abbildung 4: Wechselwirkungen zwischen probiotischem Mikroorganismus, Darmflora und Immunsystem (modifiziert nach DGE Ernährungsbericht 2004 [365]).** Probiotika fördern den Barriereeffekt der Darmflora, indem sie z. B. die Bildung antimikrobieller Substanzen auslösen. Daneben kommt es zur Besetzung von Rezeptor-Bindungsstellen und damit zu einer Konkurrenz mit pathogenen Mikroorganismen um solche. Probiotische Mikroorganismen reduzieren die Besiedlung des Darms, das Wachstum sowie die Stoffwechselaktivität von pathogenen Bakterien und verhindern so deren Ausbreitung. Daneben verfügen Probiotika über die Fähigkeit, die Zusammensetzung der Darmflora sowie des Darmmilieus zu verändern (pH-Wert, Enzymaktivitäten). Die Immunantwort wird durch Probiotika unterstützt. Sie lösen beispielsweise die Bildung von Zytokinen und Antikörpern aus.

### 1.2.3.1. Produktion von Stoffwechselmetaboliten und antimikrobiellen Substanzen

Probiotische Bakterien können eine Vielzahl von Substanzen produzieren, die einen inhibitorischen Effekt sowohl auf grampositive als auch auf gramnegative Bakterien haben. Zu diesen inhibitorischen Substanzen gehören organische Säuren, Wasserstoffperoxid und Bakteriozine, welche die Fähigkeit besitzen, das Wachstum anderer Bakterien hemmen zu können. Diese Substanzen können nicht nur die Zahl der Pathogene reduzieren, sondern haben auch einen Einfluss auf den bakteriellen Metabolismus oder die Toxin-Produktion. Eine große Anzahl von Studien hat sich mit der Untersuchung von antimikrobiellen

Substanzen, die von probiotischen Mikroorganismen produziert werden, und ihren Wirkungsweisen beschäftigt [379–382]. Eine wichtige Gruppe von Virulenzfaktoren vieler pathogener Keime sind spezielle Toxine. Probiotische Mikroorganismen können vor diesen Toxinen schützen, indem sie deren Expression verhindern. Asahara *et al.* zeigten (2004), dass *Bifidobacterium breve* Yakult und *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM20439 die Expression von Shiga-Toxin bei *E. coli* (STEC) O157:H7-Stämmen *in vitro* und im Mausmodell unterdrücken. In der *B. breve* Yakult-Versuchsgruppe überlebten alle Mäuse, wohingegen in der Kontrollgruppe 90 % der Tiere verstarben. Zellkulturversuche deuten darauf hin, dass die von *B. breve* Yakult produzierte hoch konzentrierte Essigsäure für die Inhibierung der Expression des Shiga-Toxins verantwortlich ist [383]. Stoffwechselmetabolite von probiotischen Mikroorganismen, im Speziellen der Milchsäurebakterien (hauptsächlich Laktobazillen, Bifidobakterien und Enterokokken), sind vor allem organische Säuren. Durch die Produktion von Milchsäure sowie durch das von einzelnen Milchsäurebakterien produzierte Wasserstoffperoxid wird das Milieu im Darm verändert, wodurch die Anzahl pathogener Keime reduziert wird [384]. Außerdem senkt die produzierte Milchsäure lokal den pH-Wert, was säurelabile Keime absterben lässt. In einer Studie zeigten Wehkamp *et al.* 2004, dass lebende sowie hitzeinaktivierte *E. coli* Nissle 1917 aber auch eine Vielzahl anderer probiotischer Mikroorganismen die Expression des antimikrobiell wirkenden humanen  $\beta$ -Defensin-2 in Caco-2 Zellen induzieren. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt bei der *E. coli* Nissle 1917-induzierten  $\beta$ -Defensin-Produktion eine entscheidende Rolle. Bei Zugabe des spezifischen NF- $\kappa$ B-Inhibitors Helenanin wurde auch die Produktion von  $\beta$ -Defensin eingestellt [366].

### **1.2.3.2. Einfluss auf die Enzymaktivität**

Probiotische Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, verschiedene Enzyme zu produzieren, zu aktivieren oder aber auch zu hemmen. Beispielsweise konnte die Bildung von Urease, Amino-, Di-, und Tripeptidasen, Decarboxylasen, Dehydroxylasen nachgewiesen werden [385, 386]. In einer Studie mit *Saccharomyces boulardii* wurde gezeigt, dass eine von der Hefe gebildete Protease über die Fähigkeit verfügt, einen Toxin-Rezeptor auf der intestinalen Mukosa zu degradieren, welcher für die von *Clostridium difficile* produzierten Toxine (A und B) essentiell ist [387]. *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus acidophilus* konnten in einer Studie durch die Phosphorylierung integraler Membranproteine (Actinin, Occludin) in den *tight junctions* die Invasion von enteroinvasiven *E. coli* in Epithelzellen verhindern [388].

### **1.2.3.3. Blockierung der Bindungsstellen oder Rezeptoren am Darmepithel**

Ein weiterer Wirkmechanismus der probiotischen Mikroorganismen ist die kompetitive Hemmung/Blockierung von Bindungsstellen für pathogene Keime auf der Darmoberfläche. Die Adhäsion von pathogenen Keimen an die Darmoberfläche ist der erste Schritt für eine intestinale Infektion [389]. Viele Bakterien besitzen dazu Adhäsine, welche an spezifische

Kohlenhydratsequenzen der Rezeptoren binden. Eine Adhäsion kann durch Blockierung des Rezeptors oder durch räumliche Behinderung verhindert werden. Durch die Anheftung der Probiotika an die Bindungsstellen wird ausgeschlossen, dass sich Pathogene daran binden und so eine Infektion einleiten können. Probiotische Bakterien können mit hoher Effizienz an Enterozyten, die Mucinschicht aber auch an Glykoproteine binden. Einige *Lactobacillus*-Stämme sind entweder alleine oder in Verbindung mit ihrem verbrauchten Kulturüberstand (*spent culture supernatant*; SCS) in der Lage, die Adhäsion pathogener Keime zu inhibieren [390, 391]. Beispielsweise zeigten Spencer *et al.* (1994), dass spezifische Laktobazillenstämme die Adhäsion von enterotoxischen *Escherichia coli* an porcine Enterozyten hemmen [392]. Außerdem konnte in einer Studie mit Caco-2 Zellen (humane intestinale Epithelzellen) beobachtet werden, dass Probiotika die Adhäsion von enterotoxischen *Escherichia coli* an diese Zellen verhindert [393]. Der Laktobazillenstamm *Lactobacillus rhamnosus* GG kann die Produktion von Mucin und Schleim in Epithelzellen des Darms anregen [394]. Die Bildung dieser als Biofilm bezeichneten Schleimschicht kann sowohl die Adhäsion an die Darmschleimhaut als auch das Eindringen von pathogenen Keimen in die Darmschleimhaut verhindern. Vor allem die Bakterien der Hauptflora sowie Immunglobuline (IgA) sind in den Biofilm eingebettet. Neben den durch die Zellen gebildeten Schleimsubstanzen bilden die Laktobazillen zusätzlich eigene Mukopolysaccharide und Schleime, die auch zum Biofilm gehören. Ausgewählte probiotische *Lactobacillus*-Stämme verfügen über die Fähigkeit, an intestinale Epithelzellen zu binden und kurz danach die Bildung von eukaryotischen Mucinen auszulösen. Es kommt zu einer erhöhten Expression des eukaryotischen MUC<sub>3</sub>-Gens. Das gebildete Mucin wirkt effektiv gegen eine Anheftung pathogener Keime an intestinale Epithelzellen [395]. Tuomola *et al.* konnten außerdem schon 1999 nachweisen, dass bestimmte Laktobazillenstämme die Anheftung von *Salmonella typhimurium* an humanen intestinalen Mucus signifikant hemmen [396]. *Enterococcus faecium* 18c23 besitzt die Fähigkeit, dosisabhängig, mit einer sehr hohen Effizienz (90 %) die Adhäsion von *E. coli* K88 und K8MB an die Darmschleimhaut zu verhindern [397].

In einer elektronenmikroskopischen Studie wurde von Galdeano *et al.* (2004) allerdings gezeigt, dass die gefütterten probiotischen Laktobazillen sich nur oberflächlich an der Darmmukosa von Mäusen festsetzten. Zu einer Einbettung in die Mukosa kam es nicht [398]. Dieses Ergebnis wurde schon in früheren humanen Untersuchungen beobachtet [399, 400]. Demzufolge müssen die probiotischen Mikroorganismen dauerhaft über das Futter zugeführt werden, um einen gesundheitsfördernden Effekt zu erzielen. Für die Nutztierzucht ist es deswegen notwendig, diejenigen probiotischen Mikroorganismen zu identifizieren, welche nachweislich den Intestinaltrakt kolonisieren können [401].

#### **1.2.3.4. Wirkungen auf die Barrierefunktion des Darmepithels**

Ein sogenannter "Bacterial-epithelial crosstalk", also die Kommunikation von Darmbakterien mit den Darmepithelzellen unter Verwendung von Signalstoffen, wurde zunächst für pathogene Keime entdeckt [402]. Durch die Interaktion mit intestinalen Epithelzellen können pathogene Keime wie z. B. *Salmonella* oder enteropathogene *E. coli* die Funktion des Epithels modifizieren, um ihr Eindringen durch die Epithelschicht zu erleichtern und die wirtseigenen Abwehrmechanismen für sich auszunutzen. Aber nicht nur pathogene Keime kommunizieren mit dem Darmepithel, sondern auch nicht-pathogene und kommensale Mikroorganismen [403, 404]. Probiotische Bakterien sind in der Lage, chemisch oder infektiös geschädigte Darmbarrieren wiederherzustellen [364]. *E. coli* Nissle 1917, aber auch Laktobazillen und Bifidobakterien können, wie in einigen Untersuchungen gezeigt, effektiv zu einer Regenerierung der Darmbarriere beitragen [369, 405].

In Bezug auf die Veränderung der Transportphysiologie des Darmes konnten Parassol *et al.* (2005) bei Untersuchungen mit *Lactobacillus casei* DN-114 001 eine Inhibierung der durch enteropathogene *E. coli* normalerweise erhöhten parazellulären Permeabilität feststellen [406].

Diese durch einige Probiotika ausgelösten Veränderungen der Mukosabarrierefunktion benötigen wie schon beschrieben eine biochemische Kommunikation über Signalstoffe zwischen den Mikroorganismen und Enterozyten. Beispielsweise aktivieren probiotische Mikroorganismen einen Signaltransduktionsweg, welcher letztendlich zur Verstärkung der *tight junctions* zwischen den Enterozyten führt und so den parazellulären Transport von Antigenen, die eine Inflammation auslösen können, reduziert [404].

#### **1.2.3.5. Einfluss auf das Immunsystem**

Die Oberfläche der Mukosa stellt die größte Berührungsfläche zwischen Körper und Umwelt dar. Deswegen ist eine effektive lokale Immunität notwendig, um den Organismus gegen die Invasion von schädlichen Antigenen und Keimen zu schützen. Die M-Zellen nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf und transportieren sie durch die Zelle in den Bereich der Peyer'schen Platten. Allerdings sind nicht nur M-Zellen zum Transport von Antigenen in der Lage. Rescigno *et al.* konnten 2001 zeigen, dass dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen, *tight junctions* zwischen Enterozyten zu öffnen, um mit Hilfe von Dendriten luminale Antigene direkt zu sammeln [92]. Im subepithelialen Bereich der Peyer'schen Platten werden die Antigene durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) den T- und B-Lymphozyten der *Lamina propria* präsentiert. Nach der Aktivierung wandern die IgA-produzierenden T- und B-Lymphozyten durch das lymphatische System und treten durch den Brustlymphgang in den peripheren Blutkreislauf ein [407].

Besonders intensiv wurde in den letzten Jahren die Wirkung von probiotischen Mikroorganismen auf das darmassoziierte Immunsystem untersucht. Pouwels *et al.* (1996)



zeigten, dass die Stimulierung der spezifischen und unspezifischen Immunantwort ein weiterer Wirkmechanismus von probiotischen Mikroorganismen ist [13]. Die Gabe von *Lactobacillus* GG während einer akuten Rotavirus-Infektion führt zu einer verstärkten Immunreaktion [408]. Für die Untersuchung der immunmodulierenden Fähigkeiten von *E. coli* Nissle 1917 existieren eine Vielzahl von *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien [409–411]. Anti-inflammatorische Wirkungen wurden auch für unterschiedliche Laktobazillenstämme beschrieben. Die Aktivierung von Zytokinen bzw. Zytokinprofilen ist dabei allerdings abhängig vom eingesetzten Bakterien-Stamm und der Dosis. Maassen *et al.* (2000) zeigten beispielsweise durch eine Untersuchung von acht verschiedenen Laktobazillus-Stämmen, dass Laktobazillen unterschiedliche Zytokinprofile im Darm von BALB/c Mäusen auslösen können [412]. Des Weiteren können verschiedene *Lactobacillus*-Stämme *in vitro* Makrophagen anlocken: *Lactobacillus gasseri* JCM1131<sup>T</sup> produziert z. B. chemotaktische Substanzen (sogenannte Gasserokine), welche Makrophagen anlocken [413]. Verschiedene *Lactobacillus*-Stämme induzieren eine unterschiedliche Modulation der Expression von Zytokinen sowie die Reifung von Oberflächenmarkern auf dendritischen Zellen [414].

*Bifidobacterium longum* und einige *Lactobacillus*-Stämme können zu einer erhöhten Konzentration von IgA im Intestinum führen [415, 416]. Die Aktivierung der Immunantwort der Darmschleimhaut ist abhängig vom Antigen, welches mit den M-Zellen der Peyer'schen Platten und den lymphassozierten Immunzellen in Kontakt tritt. Es wurde gezeigt, dass die Stimulierung des Immunsystems durch Milchsäurebakterien abhängig vom Bakterien-Stamm variiert. Manche Bakterien erhöhen die anti-entzündliche Immunreaktion, andere führen zu einem erhöhten Level von sezernierten Antikörpern (S-IgA). In einer Untersuchung mit *Lactobacillus plantarum* konnte beispielsweise eine erhöhte Antikörper-Produktion als Reaktion auf eine Infektion mit *E. coli* festgestellt werden [417]. Die orale Gabe von *Lactobacillus casei* zwei Tage vor der Infektion mit *Salmonella* oder *E. coli* hat bei Mäusen zu einer verringerten Translokation der pathogenen Bakterien und einer erhöhten IgA-Konzentration geführt [418]. Eine Studie von Perdigò *et al.* (2000) zeigte, dass die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Milchsäurebakterien wahrscheinlich auf verschiedene Wege beim Eindringen in den Darm zurückzuführen sind, wodurch die Bakterien den Kontakt mit den Immunzellen in der *Lamina propria* aufnehmen [419]. Serum IgA wirkt anti-entzündlich durch die Modulation der Freisetzung von inflammatorischen Molekülen wie z. B. TNF $\alpha$ , Interleukin-6 und reaktiver Sauerstoffspezies in Neutrophilen und Makrophagen [420].

### *Wirkung auf das angeborene Immunsystem:*

Die Zellen des angeborenen Immunsystems stellen die erste Abwehrlinie gegen Pathogene dar. Sie sind allerdings nicht sehr spezifisch in ihrer Fähigkeit, ihre Ziele zu erkennen. Ein Hauptcharakteristikum der angeborenen Immunantwort ist die Geschwindigkeit der Antwort.

Daneben spielt die angeborene Immunantwort eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der anschließenden adaptiven Immunantwort. Zu den Mechanismen der angeborenen Immunantwort zählen z. B. eine verstärkte Antigenpräsentation, eine erhöhte Phagozytose-Aktivität von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) sowie eine gesteigerte Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK). Schon 1988 zeigten Perdigón *et al.*, dass *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus casei* durch ein Verstärken der Phagozytose-Kapazität von murinen Peritonealmakrophagen zu einer systemischen Immunstimulierung führen [421]. In einer weiteren Studie mit *Lactobacillus acidophilus* La1 konnte ebenfalls eine erhöhte Phagozytose-Fähigkeit, dieses Mal von Leukozyten aus humanem Blut, festgestellt werden [422, 423]. Eine wesentlich erhöhte Phagozytose-Kapazität von Blutleukozyten wurde außerdem bei Untersuchungen mit *Bifidobacterium lactis* Bb12 gefunden [423]. *Lactobacillus rhamnosus* GG führt zu einer signifikant erhöhten Expression von wichtigen Phagozytose-Rezeptoren wie z. B. CR1, CR3, FcγRIII oder FcαR in den Neutrophilen gesunder Individuen.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus* die Zellpopulationen und die Aktivität von natürlichen Killerzellen bei Menschen und Mäusen signifikant erhöht [424, 425]. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 und *Bifidobacterium lactis* HN109 erhöhen das zytotoxische Potential von natürlichen Killerzellen signifikant. Nach Beendigung der Gabe von probiotischen Mikroorganismen geht diese erhöhte Zytotoxizität wieder zurück, bleibt aber insgesamt auf einer höheren Basislinie [426, 427]. *Lactobacillus casei* Shirota erhöht die Aktivität von natürlichen Killerzellen bei Menschen und Mäusen nach Verzehr von fermentierter Milch. Diese erhöhte Aktivität geht wahrscheinlich auf eine durch das Probiotikum ausgelöste Produktion von Interleukin-12 zurück [428]. Des Weiteren führt die orale Gabe von *Lactobacillus fermentum* CECT5716 zu einer Verstärkung der Wirkung eines Anti-Influenza-Impfstoffes durch die Erhöhung der Anzahl an natürlichen Killerzellen [429].

Eine weitere Untersuchung konnte zeigen, dass der probiotische *E. coli* Nissle 1917 die Produktion des pro-inflammatorischen Interleukin-8 in humanen Adenokarzinomzellen (HT-29, Kolon) anregt. Dahingegen können Laktobazillen und Bifidobakterien, die in VSL#3 (Mischung aus acht verschiedenen Milchsäurebakterien) enthalten sind, diese Produktion nicht auslösen [405, 430]. McCracken *et al.* zeigten (2002), dass *Lactobacillus plantarum* 299v ebenfalls zu einem erhöhten mRNA Level von IL-8 in humanen epithelialen HT-29 Zellen führt, die zuvor mit TNFα stimuliert wurden. Die Produktion von IL-8 ist abhängig vom Vorhandensein lebender probiotischer Bakterien und konnte nicht beobachtet werden, wenn die Adhäsion von *L. plantarum* 299v an die HT-29 Zellen inhibiert wurde [431]. IL-8 scheint das wichtigste Zytokin zu sein, welches als Reaktion auf Probiotika in den Enterozyten produziert wird. Die Hauptfunktion von IL-8 ist die Anlockung von Neutrophilen. Die Qualität und die Dosis des Probiotikums spielen ebenfalls eine Rolle. Beispielsweise kam es bei Inkubation von Caco-2 Zellen mit hohen Dosen von *Lactobacillus rhamnosus* GG zu einer

geringeren durch TNF $\alpha$  ausgelösten Produktion von IL-8 [372]. Aber nicht alle Probiotika besitzen die gleiche Fähigkeit die Produktion von IL-8 anzuregen, manche führen sogar zu einer verringerten IL-8-Expression. Zum Beispiel hat *Lactobacillus rhamnosus* einen anti-inflammatorischen Effekt auf HT-29 Zellen. Dieser Effekt ist auf das Verringern der IL-8-Produktion zurückzuführen [432]. Neben der Produktion von IL-8 können Enterozyten noch weitere Zytokine exprimieren, beispielsweise IL-15 oder IL-6. *Lactobacillus casei* CRL431 und *Lactobacillus helveticus* R389 führen nach Ko-Inkubation mit primären intestinalen Epithelzellen in Mäusen zu einer erhöhten Produktion des anti- und pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 [433]. Die Produktion des multifunktionellen Zytokins IL-15 wird durch die Gabe eines Synbiotikums (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*; Dextran) in humanen Caco-2 Zellen ausgelöst [434]. Mit Hilfe einer Microarray-Analyse von mRNA konnte gezeigt werden, dass *Lactobacillus casei* DN-114 01 die Expression von Chemokinen reduziert, welche Makrophagen (CXCL1, CXCL2) oder dendritische Zellen (CCL20) als Reaktion auf eine Infektion mit *Shigella flexneri* in Caco-2 Zellen anlocken können [435].

### *Wirkung auf das adaptive Immunsystem:*

In vielen Studien konnte ein Einfluss unterschiedlicher Probiotika auf das IgA-Level im Serum festgestellt werden. Beispielsweise in einer Studie von Isolauri *et al.* (1995). Kinder im Alter von 2 – 5 Jahren bekamen begleitend zu einer Rotavirus-Impfung *Lactobacillus rhamnosus* GG verabreicht. Es konnte eine erhöhte Zahl von IgA-produzierenden Zellen beobachtet werden [436]. Allerdings besteht ein entscheidender Unterschied zwischen der Konzentration von IgA im Serum und der Konzentration, welche im Intestinum vorhanden ist. Um in den Darm zu gelangen benötigt das IgA eine sekretorische Komponente, welche für den Export notwendig ist. Des Weiteren liegen die Immunglobuline A im Intestinum in dimerer oder polymerer Form vor. Deswegen entspricht die gemessene Konzentration von Serum-IgA nicht unbedingt auch der tatsächlichen Konzentration im Darm. Park *et al.* untersuchten die IgA-Produktion durch intestinale Mukosalymphoidzellen in Mäusen [437]. Sie konnten zeigen, dass *Bifidobacterium bifidum* die IgA-Produktion signifikant in den Peyer'schen Platten und mLN erhöht. Der immunstimulierende Effekt von *B. bifidum* geht auf zelluläre und nicht auf vom Bakterium sezernierte Komponenten zurück [437]. *Bifidobacterium bifidum* HN019 erhöht außerdem die spezifische IgA Antikörper Reaktion auf eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* [438] sowie die Gesamtkonzentration von IgA im Intestinum [439]. Darüber hinaus scheint die Wirkung von probiotischen Mikroorganismen auf die humorale Immunantwort teilweise durch ihre Fähigkeit zur Kolonisierung im Darm bedingt zu sein. Es konnte beobachtet werden, dass trotz ähnlicher Adhäsionseffizienz von *Lactobacillus johnsonii* und *Lactobacillus paracasei* an Caco-2 Zellen, *L. johnsonii* den Darm gnotobiotischer Mäuse besser kolonisieren konnte und ein effizienterer Auslöser der intestinalen Produktion von IgA war [440].

In einer weiteren Studie wurden dendritische Zellen, die aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert wurden (*bone-marrow-derived dendritic cells*; BMDCs), mit unterschiedlichen durch Strahlen abgetöteten *Lactobacillus*-Stämmen inkubiert. Alle Stämme führten zu einer Reifung der dendritischen Zellen. *Lactobacillus casei* subsp. *alactus* induzierte die Bildung einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-12, IL-6, TNF $\alpha$ ) in dendritischen Zellen, wohingegen *Lactobacillus reuteri* nur zu einer geringen Stimulierung der IL-12-Bildung in dendritischen Zellen führte. Außerdem inhibierte *L. reuteri* die durch *L. casei* ssp. *alactus* ausgelöste Produktion von IL-12, IL-6 und TNF $\alpha$  sowie die Expression von B7.2 (CD86) in dendritischen Zellen, eine konstante Produktion von IL-10 wurde allerdings beibehalten [414]. Hitzeinaktivierte *Lactobacillus reuteri* 100-23 induzieren die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 [441]. Diese Studie macht deutlich, dass die Ausdifferenzierungsprozesse der dendritischen Zellen im Darm abhängig von der Mikroflora moduliert werden können.

Di Giacinto *et al.* zeigten 2005 in einem Tiermodell zur chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), dass das Probiotikum VSL#3 nach dreiwöchiger täglicher Fütterung zu einer Milderung der Colitis führt. Dieser positive Effekt war mit der Produktion von IL-10 verbunden und teilweise auch mit der Bildung einer höheren Anzahl von regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>), welche TGF $\beta$  exprimieren. VSL#3 wirkt der Th1-Immunreaktion entgegen [442]. Zusammengenommen zeigen diese Studien, dass viele probiotische Mikroorganismen durch die Beeinflussung dendritischer Zellen als anti-inflammatorische Agenzien wirken.

Die Wechselwirkung zwischen CD40 und CD154 auf dendritischen Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu einer Expansion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und nachfolgend zur Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen [443]. Die Immunophänotypen und Funktionen von aus Peyer'schen Platten und der Milz abgeleiteten Immunzellen von BALB/c Mäusen zeigen, dass *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NTU101 wahrscheinlich eine Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auslöst. Die Expression des aktivierten CD154 Oberflächenmarkers auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist signifikant in den Peyer'schen Platten erhöht, nicht aber in der Milz. Dies deutet darauf hin, dass *L. paracasei* ssp. *paracasei* NTU101 die CD154-Aktivität von T-Helferzellen verstärkt und eine Interaktion zwischen CD40 und dendritischen Zellen verursacht [444]. Einige *Lactobacillus*-Stämme haben die Fähigkeit, T-Zellen von einer Th2-Immunantwort in Richtung einer Th1-Immunantwort zu drehen und dadurch die humorale Immunantwort zu fördern [445]. Fast alle Stämme der *Lactobacillus casei*-Gruppe können durch die Stimulierung von Makrophagen zu einem hohen IL-12-Level führen [446]. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der eher anti-inflammatorisch ausgerichteten Zytokin-Muster der dendritischen Zellen, das Expressionsprofil doch vom eingesetzten Stamm abhängig bleibt.

Viele Studien konnten belegen, dass probiotische Mikroorganismen einen pro-inflammatorischen Effekt ausüben, indem sie die Produktion von immunstimulierenden Zytokinen anregen. Auf der anderen Seite konnte eine Vielzahl von Untersuchungen zeigen, dass Probiotika die Produktion von IL-10 begünstigen. IL-10 hat eine anti-inflammatorische Wirkung und inhibiert die Th1-Immunantwort [447]. *Lactobacillus reuteri* und *L. paracasei* mindern die durch *Helicobacter hepaticus* in IL-10-defizienten Mäusen ausgelöste intestinale Inflammation, indem sie die Expression von TNF $\alpha$  und IL-12 im Kolon verringern [448]. Probiotische Mikroorganismen sind in der Lage Darmentzündungen in unterschiedlichen Tiermodellen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung durch Inhibierung der Th1-Immunantwort zu verringern. Hydrolysate von *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NTU101 führen zu einer Proliferation von Makrophagen und Splenozyten, reduzieren die Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$  und IL-6) und veranlassen die Freisetzung der Zytokine IL-10 und IL-12, um die angeborene und adaptive Immunantwort zu modulieren [449]. Des Weiteren konnte in einem Mäusemodell der rheumatoiden Arthritis *Lactobacillus casei* Shirota die Arthritis mildern, indem das Probiotikum die Th1-Immunantwort inhibiert [450].

*Wirkungsweise von probiotischen Mikroorganismen auf Signaltransduktionswege in intestinalen Epithelzellen und Makrophagen:*

Diverse probiotische Mikroorganismen können eine Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B verhindern. Dies geschieht auf ganz unterschiedliche Weise. Durch Inhibierung der Phosphorylierung (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, [451]; *Lactobacillus casei* Shirota; [452]), der Ubiquitinierung (*Lactobacillus rhamnosus* GG; [453]), der proteosomalen Degradation (*Lactobacillus plantarum*; [454]) von I $\kappa$ B $\alpha$  oder durch Inhibierung der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus (Butyrate; [455]). Der probiotische *Escherichia coli*-Stamm M-17 führte bei einer *In-vitro*-Inkubation mit zwei Zelllinien (murine Makrophagen-Zelllinie: RAW 264.7; NF- $\kappa$ B Reporterzelllinie abgeleitet von der embryonalen Nieren-Zelllinie 293T) zu einer Inhibierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und verhinderte die Bindung von p65 (codiert vom RelA-Gen) an den Zellkern. Außerdem führte diese Inkubation zu einer verringerten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen [373].

Aber nicht alle Probiotika inhibieren die Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Vielmehr aktivieren einige NF- $\kappa$ B, um eine erhöhte Sekretion von Zytokinen zu erreichen. Beispielsweise zeigten Ruiz *et al.* (2005), dass *Bifidobacterium lactis* BB12 über den NF- $\kappa$ B- und p38 MAPK-Signaltransduktionsweg die Expression von IL-6 in intestinalen Epithelzellen auslöst. *B. lactis* BB12 führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von RelA (p56), einer Untereinheit von NF- $\kappa$ B [456].

Daneben können Probiotika auch den MAPK(mitogenaktivierte Proteinkinase)-Signaltransduktionsweg unabhängig vom NF- $\kappa$ B-Signalweg beeinflussen. In einer Studie mit VSL#3-DNA konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der p38-Phosphorylierung zwar

mit der Inhibierung der Sekretion von IL-8 verbunden ist, allerdings keinen Einfluss auf das IL-8 mRNA-Level oder die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat [376].

Probiotische Mikroorganismen können ebenfalls Signaltransduktionswege in Makrophagen beeinflussen. Beispielsweise sind einige Probiotika in der Lage, durch Behinderung der LPS-Signaltransduktion die Bindung von LPS an den CD14-Rezeptor zu blockieren. In einer Untersuchung mit *Bifidobacterium bifidum* B536 konnte festgestellt werden, dass Stoffwechselmetabolite zu einer Inhibierung der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Sekretion und allgemein zu einer verringerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen [457]. Des Weiteren kommt es auch hier zu einer Inhibierung der Phosphorylierung und Ubiquitinierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu verhindern. Durch eine Studie mit Lipoteichonsäure (LTA) von *Lactobacillus plantarum* K8 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von LTA mit THP-1 Zellen zu einer Inhibierung der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Sekretion führt. Eine verminderte Degradation von sowohl I $\kappa$ B $\alpha$  als auch I $\kappa$ B $\beta$  führte zu einer abgeschwächten NF- $\kappa$ B-Aktivierung [458]. Im Gegensatz zur Wirkung der Lipoteichonsäure von *L. plantarum* K8, führt eine Inkubation von RAW 264.7 Zellen mit LTA von *Lactobacillus casei* YIT 9019 und *Lactobacillus fermentum* YIT 0159 zu einer Produktion von TNF $\alpha$  und zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges [459]. Probiotische Mikroorganismen sind in der Lage, Signaltransduktionswege in Makrophagen zu modulieren, um die Zytokinproduktion und die Apoptose zu beeinflussen [460].

### **1.2.4. *Enterococcus faecium***

Enterokokken werden zu den Milchsäure-produzierenden Bakterien gezählt und im englischen Sprachraum als "*lactic acid bacteria*" (LAB) bezeichnet [461]. Sie wurden 1899 von Thiercelin zum ersten Mal als Gruppe erwähnt. Wenige Jahre später (1903) wurde die Bezeichnung „Enterokokken“ für grampositive Diplokokken intestinalen Ursprungs von Thiercelin und Jouhaud vorgeschlagen. Durch Rebecca Lancefield wurden die Enterokokken 1933 aufgrund ihrer Morphologie, ihres Gramfärbeverhaltens und des Nachweises des D-Antigens zunächst den Streptokokken zugeteilt. 1937 sprach Sherman von Streptokokken fäkalen Ursprungs [462]. Im Jahr 1984 zeigten Schleifer und Klipper-Bälz durch die Analyse der 16S rRNA, dass sich *Streptococcus faecialis* und *Streptococcus faecium* ausreichend weit von anderen Streptokokken unterschieden, um als eine eigene Gattung angesehen zu werden [463]. 19 Spezies wurden demzufolge 1984 zum Genus *Enterococcus* gezählt. Innerhalb des Genus gibt es vier „Speziesgruppen“, *Enterococcus faecium* wurde dabei der „Faecium-Gruppe“ zugeordnet [464]. 27 verschiedene *Enterococcus*-Spezies sind bisher bekannt, wobei *E. faecium* und *E. faecialis* zu den bedeutsamsten Vertretern zählen. Allerdings gibt es keine phänotypischen Charakteristika, welche die Enterokokken eindeutig von anderen grampositiven, Katalase-negativen kokkenförmigen Bakterien unterscheidet [464].

Enterokokken sind aerotolerant anaerobe Bakterien. Da sie über das für Streptokokken typische Lancefield-Antigen der Gruppe D verfügen, werden sie auch als Streptokokken der Serogruppe D bezeichnet. Enterokokken erzeugen keine  $\beta$ -Hämolyse. Sie sind umweltresistent und widerstehen extremen Bedingungen wie Hitze (45 °C), hohem pH (9,6) sowie hohen Salzkonzentrationen (6,5 % NaCl) [465]. Enterokokken haben den typischen Zellwandaufbau der Streptokokken mit einer mehrschichtigen Peptidoglykanschicht. Die Bakterien sezernieren verschiedene Enzyme, die bei der Invasion, Persistenz und Schädigung eine Rolle spielen, z. B. Zytolysin A, Gelatinase und Hyaluronidase [466].

Enterokokken bilden einen Teil der Mikroflora des Dickdarms und kommen beim Menschen, zahlreichen Säugetieren, aber auch Vögeln vor [467, 468]. Sie können im Darm aufgrund ihrer Resistenz gegen Galle überleben [465]. Enterokokken sind im Allgemeinen nur gering pathogen. Da praktisch alle Menschen Träger von Enterokokken sind, erfolgt die Übertragung endogen über den Darm, von dem aus die Enterokokken nach Perforation (Peritonitis) oder durch Schmierinfektionen (Harnwegsinfektion) zu einer Infektion führen können [469]. Außerdem zählen die Enterokokken zu den Eitererregern, wobei die Lipoteichonsäure (LTA) der Zellwand an der Adhärenz sowie der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt ist. Enterokokken gelten als Erreger von Nosokomialinfektionen (Krankenhausinfektionen), z. B. chronischen Harnwegsinfektionen [470]. Sie sind jedoch auch häufig an Mischinfektionen beteiligt (z. B. Endokarditis, Cholezystitis). Humane Infektionen werden zu 80 – 90 % durch *Enterococcus faecialis* hervorgerufen. Allerdings hat in den letzten Jahren die Zahl der nosokomialen Infektionen mit *Enterococcus faecium* zugenommen. Kürzlich veröffentlichte Kontrolldaten zeigten, dass Enterokokken die dritthäufigsten Verursacher nosokomialer Infektionen sind (12 % aller Krankenhausinfektionen) [471].

In der Lebensmittelindustrie spielen Enterokokken bei Fermentations- und Reifungsprozessen eine entscheidende Rolle. So werden sie z. B. als Starterkulturen für die Herstellung von Camembert oder Büffel-Mozzarella eingesetzt [472]. Enterokokken kommen auch in einigen fermentierten Gemüseprodukten vor, darunter z. B. grüne Oliven. Das universelle Vorkommen von Enterokokken im Gastrointestinaltrakt von Tieren führt zu einem hohen Kontaminationspotential zum Zeitpunkt der Schlachtung. In einer Studie (1994) wurde *Enterococcus faecialis* in Hühnchenproben von Schlachthöfen als dominanter Keim innerhalb der grampositiven Kokken gefunden [473]. Ungewollte Enterokokken-Belastungen gelten als Hinweis auf schlechte hygienische Bedingungen bei der Produktion und Verarbeitung von Fleisch.

Enterokokken werden auch als Probiotika eingesetzt. Zu den besonders gut untersuchten probiotischen *Enterococcus*-Stämmen gehört einerseits der in dieser Arbeit verwendete *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415; produziert von Cerbios Pharma SA, Barbengo, Schweiz) und andererseits *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn,

Deutschland) [474]. Diese *Enterococcus*-Stämme werden in Form von probiotischen Wirkstoffen in pharmazeutischen Präparaten eingesetzt. Zu den Anwendungsgebieten dieser probiotischen Stämme gehören die Behandlung von Durchfallerkrankungen oder dem Reizdarmsyndrom (RDS) [475–477]. Außerdem werden sie zur Senkung des Serumcholesterinspiegels und zur Immunregulation eingesetzt. Für die Anwendung bei Diarrhö wird hauptsächlich *E. faecium* SF68 eingesetzt. Der Stamm wurde ursprünglich in Schweden isoliert und später in der Schweiz und in anderen Ländern patentiert (Lewenstein, 1979). Er ist ein Kommensale des Gastrointestinaltrakts und besitzt eine kurze lag-Phase und Generationszeit (unter optimalen Bedingungen ca. 20 Min.). Außerdem zeigt er in Zellkulturversuchen einen Hemmeffekt auf das Wachstum von *Shigella* spp., *Salmonella* spp. und *E. coli* spp. Daneben ist er resistent gegenüber niedrigen pH-Werten sowie Gallensalzen. Diese Eigenschaften sowie die hohe Verträglichkeit des Menschen gegenüber diesem Stamm, ohne Nebenwirkungen herbei zu führen, machen *E. faecium* SF68 zu einem optimalen Probiotikum [465]. In einer Studie wurde 1996 der therapeutische Nutzen von *E. faecium* SF68 bei Patienten mit akuter Diarrhö untersucht. Bei erwachsenen Patienten kann durch die Behandlung mit dem Probiotikum bei Enteritis die Dauer der Diarrhö sowie die Zeit bis zur Normalisierung des Stuhls verkürzt werden [476]. Allen *et al.* (2004) untersuchten den Nutzen von Probiotika zur Behandlung infektiöser Diarrhö. Bei ihrer Untersuchung stellten sie fest, dass *E. faecium* SF68 sowohl eines der effektivsten als auch eines der bestdokumentiertesten Probiotika für dieses Anwendungsgebiet ist [478].

Nicht nur bei der Anwendung am Menschen ist *E. faecium* SF68 eines der am häufigsten und bestuntersuchteten Probiotika, sondern auch in der Nutztierzucht. In einem interdisziplinären Forschungsprojekt zur Untersuchung der Wirkungsweise von Probiotika im Schwein konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) die pathogene Bakterienlast in gesunden Ferkeln reduziert [19–21, 479]. Dies ist ein sehr wichtiger Befund, da die Gastroenteritis die Hauptkrankheit neugeborener Ferkel ist und zu großen Verlusten führt. Die Verabreichung des probiotischen Stammes *E. faecium* SF68 an Muttertiere und ihre Ferkel führte zu einer reduzierten Vorsäugesterberate und einer verringerten Vor- und Nachsäugediarrhö [19].

In Fütterungsversuchen konnte *E. faecium* SF68 die Übertragungsrate von *Chlamydia* vom Muttertier auf das Ferkel verringern [21]. Eine Vielzahl von Studien hat sich mit dem Einfluss von *E. faecium* auf die Zusammensetzung der Mikroflora im Gastrointestinaltrakt von Schweinen, Affen und Hunden beschäftigt [19, 480, 481]. Weitere Studien mit Hunden haben allerdings auch einen positiven Effekt von *E. faecium* auf die Adhäsion und Kolonisation von *Clostridium jejuni* im Intestinum gezeigt [481].

Szabó *et al.* (2009) zeigten in einer Studie mit Ferkeln, dass die mit *E. faecium* SF68 gefütterten Versuchstiere weniger dazu imstande waren, sich gegen eine Infektion mit *Salmonella* Typhimurium DT104 zu wehren, als die Tiere der Kontrollgruppe. In der



Probiotika-Gruppe wurde im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine erhöhte *Salmonella*-Ausscheidung und eine verstärkte Kolonisation in den Organen detektiert. Allerdings kam es neben der erhöhten intestinalen Bakterienlast und den erhöhten *Salmonella*-Konzentrationen in Gewebe und Lymphorganen zu einer schnelleren und stärkeren humoralen Immunantwort. Erhöhte Spiegel von IgA und IgM konnten im Serum gemessen werden [22]. In einer weiteren Studie konnte ebenfalls eine erhöhte Bakterienlast und Freisetzung von *Salmonella*, vor allem im Lymphgewebe, der infizierten Tiere beobachtet werden [482].

Obwohl in vielen Studien gezeigt wurde, dass *E. faecium* SF68 gesundheitsfördernde Wirkung sowohl im Menschen als auch im Tier hat, ist noch wenig über die eigentliche Wirkungsweise des Probiotikums bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *E. faecium* SF68 ein Enterozin produziert, welches gegen ein eingeschränktes Spektrum von grampositiven Bakterien wirkt. Allerdings konnte für *E. faecium* SF68 kein Effekt auf das Wachstum gramnegativer Bakterien beobachtet werden [483].

### 1.3. Zink

#### 1.3.1. Biologische Bedeutung von Zink

Zink gehört zu den essentiellen Spurenelementen. Dies wurde das erste Mal in den 1960er Jahren von Prasad dokumentiert [484, 485]. Im Jahr 1974 erklärte der National Research Council (NRC) der nationalen Akademie der Wissenschaften in den USA das Spurenelement Zink zu einem essentiellen Nährstoff für den Menschen und legte eine empfohlene Tagesdosis fest. Während der letzten 40 Jahre wurden erhebliche Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet gemacht [486]. Zink ist eine starke Lewisäure und diese Eigenschaft als Elektronenakzeptor bestimmt auch einen Großteil der biochemischen Funktionen.

Der Gesamtgehalt an Zink im menschlichen Körper beträgt zwischen 2 – 4 g [487]. Die Konzentration im Blutplasma liegt zwischen 12 – 16  $\mu\text{M}$  [488, 489]. Im Blutplasma liegt Zink vor allem gebunden an Albumin (60 %),  $\alpha_2$ -Makroglobulin (30 %) und Transferrin (10 %) vor [490]. Ungebundene, freie Zink-Ionen liegen nur zu ca. 0,01 % im Plasma vor. Da Albumin keine starke Affinität für Zink besitzt, im Plasma allerdings ein Überschuss vorliegt, kommt es zu einer Bindung des größten Teils des Zinks. Diese Verbindung wird häufig als „lose“ bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle bei der Zinkaufnahme in die verschiedenen Zielgewebe [491]. Der Zinkpool im Plasma ist zwar klein aber mobil und von immunologischer Bedeutung. Da es kein spezialisiertes Zinkspeicher-System im menschlichen Körper gibt, ist eine tägliche Zufuhr von Zink unerlässlich. Die täglich benötigte Dosis Zink ist auch abhängig vom Gesundheitsstatus, da der Zink-Gleichgewichtszustand im Körper nicht nur durch die Aufnahme sondern ebenfalls durch Schwankungen bei der Zink-Exkretion, welche bei einer großen Anzahl von Erkrankungen vorkommen, beeinflusst wird [492, 493]. In den spezifischen Funktionen von Zink liegt gleichzeitig auch ihr toxisches Potenzial. Biomoleküle können durch unkontrollierte Komplexbildung mit Zink ihre Aktivität

und Wirkung einbüßen [494]. Aus diesem Grund ist es essentiell, die Menge an tatsächlich freiem Zink im Zytosol zu begrenzen. Die Aufrechterhaltung konstanter Konzentrationen erfolgt durch eine homöostatische Regulation dieses Spurenelements [495]. Die Aufnahme von Zink oberhalb des metabolischen Bedarfs wird bereits am Übergang zwischen Darmlumen und Körperinnenseite durch Anpassung der Absorption und der endogenen Exkretion durch eine homöostatische Regulation verhindert. Diese Regulierung wird durch eine bedarfsorientierte Steuerung der Anzahl an hochspezifischen Zink-Transportmolekülen in der Darmmukosa vermittelt [495]. Exogenes Zink dringt innerhalb von Minuten in die Zelle ein [496]. Allerdings kann Zink nicht passiv in die Zelle diffundieren, da es sich um ein stark geladenes Ion handelt [497]. Verschiedene mögliche Mechanismen für die Aufnahme von Zink wie z. B. über unspezifische Calciumkanäle, eine erleichterte Diffusion durch Aminosäuren und Anionenaustausch wurden beschrieben [498, 499]. Die Zinktransporter der Säugetiere gehören zu zwei großen Proteinfamilien. Zum einen gibt es 14 Zip-Proteine (Zrt/Irt-ähnlich; SLC39A), welche Zink aus dem extrazellulären Raum oder den Organellen in das Cytoplasma transportieren [500]. Andererseits gibt es zehn ZnT-Transporter (SLC30A), die im Allgemeinen Zink aus dem Zytosol transportieren. Der ZnT-Transportmechanismus ist unbekannt. Er führt zu einem Export von Zink oder zu einer intrazellulären Sequestration in sogenannte Zinkosomen, bei denen es sich um Vesikel handelt, die in der Lage sind, große Mengen Zink zu akkumulieren [501–503]. Es ist bekannt, dass manche Transporter zellspezifisch exprimiert werden, abhängig vom Zinkstatus [504] und Zytokinmuster [502]. Demgegenüber kann die Expression dieser Transporter über die Regulierung des intrazellulären Zinklevels auch Einfluss auf Signaltransduktionsketten haben [505].

Die Zinkabsorption im Gastrointestinaltrakt wird durch etliche Faktoren, wie z. B. die Verdaulichkeit der Nahrung, die Anwesenheit von Chelatbildnern oder die Passagerate, beeinflusst. Für die Aufnahme von Zink aus dem Darmlumen in die Enterozyten spielt der Zinktransporter Zip4 eine wichtige Rolle [506]. Ein Zinkdefizit führt zu einer Hochregulierung der Expression von Zip4, was die besondere Bedeutung transporterabhängiger Absorptionswege bei geringen Zinkkonzentrationen deutlich macht [507]. Hier wurden für etliche Spezies Mutationen nachgewiesen, die zu einer Beeinträchtigung der Zinkaufnahme führen können. Bei der erblich bedingten Zinkmangelerkrankung *Acrodermatitis enteropathica* wurde beim Menschen ein mutierter Zip4-Transporter als Ursache gefunden [508].

Beim intrazellulären Zinktransport spielt das Metallothionein, dessen Expression im Intestinum direkt mit der Aufnahme von Zink zusammenhängt, eine wichtige Rolle [509]. Das Metallothionein (MT) ist ein 6 – 7 kD Protein, welches Metallionen, insbesondere Zink-Ionen bindet [510]. Metallothioneine binden Zink in den Enterozyten und federn so zu hohe Zinkaufnahmen ab [511]. Die Expression der Metallothioneine ist ubiquitär, allerdings ist sie bei Säugetieren in den Parenchymzellen des Intestinums, in Pankreas, Leber und in den

Nieren erhöht. Die Zinkaffinitäten variieren je nach Bindungsstelle zwischen  $\log K$  7,7 – 11,8 [512]. Dadurch werden pico- bis nanomolare Konzentrationen von freien Zinkionen im Zytosol verfügbar. Die Genexpression der Metallothioneine wird durch den Metal Transcription Factor 1 (MTF-1) gesteuert. MTF-1 ist ein zellulärer Zinkionen-Sensor, welcher die Transkription von Genen reguliert, die in ihrer Promotorsequenz ein „metal responsive element“ (MRE) besitzen [513, 514]. MTF-1 kontrolliert die Expression von Genen, welche essentiell für die Zink-Homöostase sind [515, 516]. Außerdem wurde berichtet, dass MTF-1 die Transkription der Gene für ZIP4 und 10 inhibiert. Für den Zink-Export auf der basolateralen Seite der Enterozyten ist der ZnT-1-Transporter zuständig. Die Expression von ZnT-1 ist dabei zinkabhängig. Liuzzi *et al.* (2001) zeigten bei Ratten, dass Zinkmangel zu einer verringerten Expression des ZnT-1-Transporters im Intestinum führt [517].

Die biologische Bedeutung des Spurenelements Zink beruht auf seinen chemischen Eigenschaften als Übergangsmetall. Aufgrund seiner Elektronenkonfiguration neigt Zink zur Bildung von Ionen aber auch von Chelaten. Es entstehen dadurch Komplexe mit Proteinen, die erst durch den Einbau dieses Metalls ihre biologische Funktion erhalten. Heute sind über 300 Enzyme bekannt, welche für ihre Aktivität Zink benötigen [518, 519]. In manchen Enzymen ist Zink für die strukturelle Integrität von Bedeutung, bei anderen dient es als Zentral-Ion für die enzymatische Aktivität. Bei einigen Enzymen übernimmt Zink auch beide Funktionen, z. B. bei der Alkohol-Dehydrogenase [519]. Außerdem moduliert Zink die Aktivität einer Vielzahl von Enzymen. Mitglieder aus allen sechs Enzymklassen verwenden Zink als Cofaktor. Dementsprechend wird auch eine Vielzahl von Zellfunktionen durch Zink beeinflusst [519]. Daneben wurden mehr als 2000 Transkriptionsfaktoren gefunden, deren strukturelle Stabilität und Bindung an die DNA auf Zink angewiesen ist [520]. Transkriptionsfaktoren wie z. B. TIEG [521], REST [522] oder TFIIIA [523] enthalten in ihrer Proteinstruktur ein Zinkfinger-Motiv, bei dem die Aminosäurekette durch Zinkionen verknüpft ist. Außerdem verbessert Zink die zellvermittelten Immunfunktionen, fungiert als Antioxidans und besitzt anti-inflammatorische Wirkung [520]. Darüber hinaus übernimmt Zink wichtige Aufgaben in Hormonkreisläufen, beispielsweise bei der Synthese, Speicherung und Sekretion von Insulin. Demzufolge ist die Versorgung mit Zink auch ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Typ 1 und 2 Diabetes [524]. Weltweit ist ein Zinkmangel in den Entwicklungsländern verbreitet. Die wichtigsten Erscheinungsformen von Zinkmangel sind Wachstumsretardierung, Hypogonadismus, Magersucht (Anorexia), Unfruchtbarkeit, erhöhte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten und Durchfallerkrankungen [525–527]. Zu deutlichen Veränderungen der Zink-Homöostase kommt es bei entzündlichen Immunreaktionen. Die Zinkkonzentration im Plasma sinkt als Antwort auf Endotoxine wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS) oder pro-inflammatorische Zytokine. Diese reduzierte Zinkkonzentration geht auf eine Translokation von Zink in die Organe, vor allem in die Leber, zurück [528]. In einer Studie konnten Liuzzi *et al.* (2005) zeigen, dass das pro-

inflammatorische Zytokin IL-6 zu einer erhöhten Aktivität von Zip14, einem Zinkimport-Protein, in der Leber von Mäusen führt [529]. Die Expression von Zip8 wird in Monozyten als Antwort auf eine Behandlung mit TNF $\alpha$  und/oder Endotoxinen gesteigert [502, 530].

### 1.3.2. Einfluss des Zinkstatus auf das Immunsystem

Zink spielt eine wichtige Rolle für das Immunsystem. Das angeborene Immunsystem ebenso wie spezifische Teile des Immunsystems werden durch Zink beeinflusst. Zink hat vor allem Einfluss auf Gewebe mit einer hohen Turnoverrate (z. B. im Gastrointestinaltrakt oder auf Zellen des Immunsystems). Hier wird Zink z. B. für die DNA- und Proteinsynthese benötigt. Bei Menschen mit Zinkmangel ist die Anfälligkeit für eine Reihe von Pathogenen erhöht und die Genesungszeit verlängert [531, 532]. Bei Tieren führt ein Zinkmangel ebenfalls zu einer verringerten Immunantwort und erhöhter Anfälligkeit für eine große Bandbreite von Pathogenen, beispielsweise *Herpes simplex* Virus [533], *Salmonella enteritidis* [534], *Mycobacterium tuberculosis* [535], *Toxoplasma gondii* [536], *Trichinella spiralis* [537]. Zink beeinflusst mehrere Aspekte des Immunsystems, von der Hautbarriere über die Genexpression bis hin zur Lymphozytenzahl [195]. Es ist essentiell für die normale Entwicklung und Funktion von Zellen der adaptiven Immunität, von Neutrophilen und natürlichen Killerzellen [195, 538–540].

Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen nehmen Antigene auf und präsentieren sie T-Zellen. Daneben schütten sie Zytokine aus, welche die Immunantworten koordinieren. Wirksame Aktivatoren für beide Zelltypen sind Lipopolysaccharide, die vom Toll-like Rezeptor (TLR-) 4 erkannt werden. Die TLR-4 Signalkaskade führt zu einer Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine durch Monozyten sowie zur Reifung und Antigen-Präsentation von dendritischen Zellen und Makrophagen. LPS stimuliert etliche verschiedene Signalwege, dazu gehören MAPK, Proteinkinase C (PKC), PI3K und NF- $\kappa$ B [541–544]. In einer Studie zeigten Zabel *et al.* (1991), dass die Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA zinkabhängig ist [545]. Beim Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B handelt es sich allerdings nicht um ein Zinkfingerprotein und die Kristallstruktur sowohl vom p50-Homodimer als auch vom p50/p65-Heterodimer enthält kein Zink [546, 547]. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass Zink nicht direkt auf NF- $\kappa$ B wirkt, sondern weiter oben in der Signaltransduktionskette agiert und auf Faktoren wirkt, welche die Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflussen [548].

Zink-Signale sind für die Aktivierung der NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege als Antwort auf eine TLR-4 Stimulierung notwendig. Zink hat allerdings eine zweiseitige Wirkung auf die TLR-4-induzierte Zytokinsekretion in Monozyten. Eine moderate Erhöhung der Konzentration an freiem Zink ist ein physiologisches Signal, welches für die TLR-4 Signalkaskade von Bedeutung ist. Hohe Konzentrationen wirken wiederum inhibitorisch [549]. Vermutete Mechanismen hierbei sind eine direkte Inhibierung der IL-1 Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) sowie eine Hochregulation von A20 (Zinkfinger-Protein), welches den Abbau von

Ubiquitin-Konjugasen an TRAF6 fördert und so dessen Aktivierung verhindert [549, 550]. A20 reguliert eine Entzündungsreaktion, indem es den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in den TNFR(*tumor necrosis factor-receptor*)- und Toll-like Rezeptor-Signalwegen inhibiert [550]. Zu einer erhöhten Konzentration von intrazellulären Zinkionen kommt es nach Stimulierung humaner Leukozyten mit *Escherichia coli*, LPS oder TNF $\alpha$  vor allem in den Monozyten. Bei Zugabe des membranpermeablen zinkspezifischen Chelators TPEN kommt es zu einer Blockierung der LPS-induzierten Signalwege unter Einbezug von p38, MAPK und NF- $\kappa$ B [548]. Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF $\alpha$  wird überdies außer Kraft gesetzt [548, 551]. Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wird in Monozyten durch Zink beeinflusst. Obwohl geringe Konzentrationen synergistisch mit LPS wirken [552, 553], führen hohe Konzentration zur Inhibierung der Produktion dieser Zytokine [554, 555]. Makrophagen werden durch einen Zinkmangel negativ beeinflusst. Die Phagozytose, das intrazelluläre Abtöten von pathogenen Keimen sowie die Zytokinproduktion sind durch ein Zinkdefizit betroffen. Die Konzentrationen von peripheren Blutlymphozyten und Makrophagen werden um > 50 % reduziert [531, 538]. Daneben beeinträchtigt ein Zinkmangel auch das Wachstum und die Funktion von B- und T-Zellen. Eine verringerte Proliferation von Lymphozyten als Antwort auf Mitogene ist sowohl bei Menschen mit Zinkmangel als auch im Tiermodell zu beobachten [531, 556, 557]. Die T-Zellproliferation als Antwort auf eine Mitogen-Stimulierung ist stark verringert, da Zink essentiell für eine T-Zellproliferation nach Stimulierung durch IL-1, Phytohämagglutinin A (PHA), Concanavalin A (Con A) sowie IL-2 ist [195, 531]. Ein Zinkmangel führt zu einem Ungleichgewicht der Th1-Th2-Immunebalance, weil die Produkte der Th1-Immuneantwort (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ ) verringert produziert werden, wohingegen die Produkte der Th2-Immuneantwort (IL-4, IL-6, IL-10) durch ein Zinkdefizit nicht beeinflusst werden [558]. Dieses Ungleichgewicht könnte für die Fehlregulation des Immunsystems und damit für die erhöhte Infektionsanfälligkeit verantwortlich sein [195, 558]. Eine verringerte Expression des IL-2-Rezeptors konnte ebenfalls beobachtet werden [195]. Da ein Mangel an Zink die Produktion von IL-2 negativ beeinflusst und weil der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an die Enhancer-Sequenz im Promotor des IL-2-Gens bindet, wurde der Effekt eines Zinkmangels auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA untersucht [559, 560]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Zinkdefizit in HUT-78 Zellen (Th0 maligne humane T-Zell Lymphom-Zelllinie) zu einer reduzierten Phosphorylierung von I $\kappa$ B und IKK sowie zu einer verringerten Ubiquitinierung von I $\kappa$ B führt. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie konnte ferner beobachtet werden, dass die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus bei Zinkmangel herabgesetzt ist [559]. Zink ist essentiell für die Aktivierung und die biologische Wirkung von Thymulin (Thymus-Hormon, Nicht-Peptid), welches für die Reifung und Differenzierung von T-Zellen von Bedeutung ist [561]. Die Genexpression von IL-2 und IFN- $\gamma$  (Th1-Zytokine) ist zinkabhängig. IL-2 ist wiederum von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung von

zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen [562]. Das Interleukin-12 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen und humanen B-Lymphoblastoidzellen gebildet und ist ebenfalls zinkabhängig. IL-12 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen. IFN- $\gamma$  und IL-12 sind gemeinsam von großer Bedeutung für die Abwehr von Bakterien, Viren und Parasiten [563].

### 1.3.3. Zink als Futterzusatzstoff

Aufgrund der großen Bedeutung für eine Vielzahl von Lebensprozessen wird Zink auch als Futterzusatzmittel eingesetzt. Ein Zinkmangel ist bei Rindern und Schweinen, aber auch Schafen mit einem hohen Getreideanteil in ihrem Futter als Parakeratose bekannt [564–566]. Es kommt zu einer Entzündung der Schleimhäute in Nase und Maul. Diese Krankheit wird mit der Gabe von Zink therapiert. Bei Milchkühen hat eine verbesserte Zinkversorgung positive Effekte auf die Klauenqualität und führt zu einem verringerten Auftreten von Mastitis [567]. Hohe Mengen an Zink sind vor allem bei Schweinen (Ferkel und Mastschwein) für ihre protektive Wirkung gegenüber Durchfallerkrankungen bekannt. Dies führt zu einem verbesserten Gesundheitsstatus und einer gesteigerten täglichen Gewichtszunahme [23, 24, 568]. Zink hat eine inhibitorische oder bakterizide Wirkung auf viele *Staphylococcus aureus*-Stämme [569]. Auch für *Streptococcus mutans* wurde eine signifikante Inhibierung durch ZnO-Nanopartikel beobachtet [570]. Daneben reduziert Zink die Expression einer Vielzahl von wichtigen Virulenzfaktoren in enteropathogenen *E. coli* (EPEC) und reduziert so die durch EPEC ausgelöste Schädigung im Intestinum [571]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Zink die Expression des Shiga-Toxins (Stx) in Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* (STEC) inhibiert [572].

Für Schweine liegen die empfohlenen Zinkmengen im Futter zwischen 50 und 100 ppm [25]. Diese Empfehlungen stellen allerdings nicht den tatsächlichen Bedarf an Zink dar, sondern beinhalten einen sogenannten Sicherheitszuschlag für Schwankungen im metabolischen Bedarf. Bei Ferkeln hängt der Zinkbedarf von vielen endogenen und exogenen Faktoren ab. Die Wachstumsrate spielt dabei eine große Rolle. Je höher diese ist, umso größer ist auch der Zinkbedarf [573]. Folglich ist der Zinkbedarf bezogen auf das Kilogramm Futter bei Aufzuchtbeginn am höchsten und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Exogene Faktoren sind z. B. Infektionen oder Umweltstress [573]. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Beurteilung des Zinkbedarfs ist die Verfügbarkeit von Zink in den verschiedenen Futtermitteln. Insgesamt ist der Bedarf an Zink höher, wenn das Futter aus pflanzlichen Komponenten besteht, da hier die Verfügbarkeit von Zink geringer ist als bei tierischen Komponenten. Außerdem wird die Verfügbarkeit von Zink bei einer zunehmenden Konzentration von Calcium und Phytinsäure schlechter [574].

Ähnlich wie bei anderen Spurenelementen (z. B. Kupfer) wurde Zink in sehr hohen Dosierungen eingesetzt, um spezielle Effekte, wie z. B. eine Durchfallprophylaxe bei Ferkeln

oder eine Mastitisprophylaxe bei Milchkühen zu erreichen. Unter normalen Ernährungsverhältnissen können Überschüsse an Zink im physiologisch adäquaten Rahmen auch durch eine homöostatische Anpassung der Verdauungsvorgänge vollständig kompensiert werden. Allerdings reichert sich das Schwermetall nach Ausscheidung über die Gülle im Boden an. Deswegen wurde in einer EU-Verordnung (VO (EG) Nr. 1334/2003) im Januar 2004 der zulässige Höchstgehalt von Zink im Futter generell für alle Tiere auf 150 mg/kg Alleinfutter festgelegt, mit der Ausnahmen für Milchaustauschfutter, bei dem 200 mg/kg festgesetzt wurde. Dieser Wert liegt immer noch deutlich über dem ernährungsphysiologischen Bedarf mit 20 – 50 mg/kg Trockenmasse (TM). Eine pharmakologische, leistungsfördernde Wirkung von Zink tritt allerdings erst bei Konzentrationen von 4 – 7 g ZnO/kg Futter auf. Dies entspricht 3000 – 6000 ppm Zink. Solche Dosierungen liegen weit über dem Bedarf des Tieres und reichen in den toxischen Bereich des Schwermetalls hinein. Die Verwendung hochdosierter Zinkmengen konzentriert sich auf die Ferkelaufzucht und wird größtenteils mit anorganischem Zinkoxid (ZnO) durchgeführt. Daneben wird auch noch Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) als Futterzusatzstoff eingesetzt. Die protektive und therapeutische Wirkung von Zink gegenüber Durchfallerkrankungen und der wachstumsfördernde Effekt geht wahrscheinlich auf die Stabilisierung der physiologischen Darmflora zurück [27]. Diese Effekte sind besonders bei Absatzferkeln zu beobachten, da das Verdauungssystem noch sehr empfindlich ist. Allerdings sind die genauen Wirkmechanismen von ZnO noch nicht aufgeklärt. Huang *et al.* zeigten (1999), dass bei Ferkeln, die mit hohen Konzentrationen ZnO gefüttert wurden, die bakterielle Translokation aus dem Dünndarm in die ilealen mesenterialen Lymphknoten verringert ist [26]. In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass hohe ZnO-Konzentrationen die Bildung von Metallothioneinen in Enterozyten stimulieren und es dadurch zur Anreicherung von Zink in intestinalen Zellen kommt. Zink wiederum hat einen Einfluss auf die RNA- und DNA-Zellproliferation und reguliert somit die Proteinsynthese und die Zellproliferation hoch [575]. Daneben wurde über eine erhöhte Genexpression antimikrobieller Peptide im Dünndarm berichtet [28]. Eine bakterizide Wirkung [576] sowie eine reduzierte Elektrolyt-Sekretion der Enterozyten wurde ebenfalls beobachtet [577]. Die hohen Zinkkonzentrationen führen aber auch zu einer Akkumulation von Zink im Gewebe, insbesondere in der Leber. Daneben beeinflussen sie den Kupferstoffwechsel [578] und nachfolgend auch den Eisenstoffwechsel [579]. Dies erklärt die Beobachtung, dass bei Fütterung hoher Zinkkonzentrationen bei Ferkeln ein anämisches Erscheinungsbild zu Tage tritt. Darüber hinaus kommt es bei einer längeren Anwendung (mehrere Wochen) zu einer Schädigung der Darmmukosa. Zink vermindert die Resorption von Calcium und Kupfer, was zu Störungen im Knochenwachstum führen kann [29, 580]. Ökologisch bedenklich sind die Akkumulation von Zink durch Wirtschaftsdüngung auf den landwirtschaftlichen Nutzflächen [30] und die mögliche antibakterielle Wirkung auf Umweltbakterien. Eine hohe

Zinkakkumulation in der Erde führt aber beispielsweise auch zu einem reduzierten Pflanzenwachstum [581, 582].

## 1.4. Salmonellen

### 1.4.1. Charakterisierung der Salmonellen – Systematik, Nomenklatur und biochemische Eigenschaften

Salmonellen sind gramnegative Stäbchen, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* zählen. Ihren Namen erhielten sie nach Daniel Elmer Salmon, der 1885 den Erreger der „Schweinecholera“ (*S. choleraesuis*) identifizierte. Im Jahr 1926 veröffentlichte Philip Bruce White ein Schema zur Klassifikation von Salmonellen auf serologischer Basis. Dieses wurde von Fritz Kauffmann in den Jahren 1933 – 1978 ausgebaut und die Salmonellen aufgrund ihrer O- (Zellwand-) und H- (flagellären) Antigene serologisch identifiziert und eingeteilt. Die Aktualisierung des sogenannten Kaufmann-White Schemas findet heute noch statt. Derzeit werden etwa 2500 Erregertypen zu den Salmonellen gerechnet [583]. Diese verteilen sich allerdings nur auf zwei Spezies, *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* [584, 585], wobei erstere wiederum in 6 Subspezies (ssp.) eingeteilt wird: *S. enterica* ssp. *enterica* (I), *S. enterica* ssp. *salamae* (II), *S. enterica* ssp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssp. *houtenae* (IV) und *S. enterica* ssp. *indica* (VI). Die Antigenformel der Serovare wird durch das „World Health Organization (WHO) Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*“ im Institute Pasteur (Paris) festgelegt und neue Serotypen erscheinen in einer jährlichen Aktualisierung des Kaufmann-White Schemas [586]. Nur die Stämme, die der Spezies *S. enterica* und hierbei größtenteils der Subspezies I (ssp. *enterica*), aber auch der Subspezies IIIa und IIIb angehören, sind klinisch und epidemiologisch relevant.

Salmonellen gehören zu den obligat pathogenen Enterobakterien. Sie sind fakultativ anaerob wachsend, oxidasenegativ [587] und glukosefermentierend. Mit Ausnahme von *S. Gallinarum* und *S. Pullorum* sind Salmonellen peritrich begeißelt und somit beweglich. Sie haben eine Größe von 0,7 – 1,5 x 2,0 – 5,0 µm [587] und sind in der Außenwelt relativ anpassungs- und widerstandsfähig. Eine Vermehrung ist in einem Temperaturbereich zwischen 7 °C [588] und 45 °C möglich. In der Umwelt (z. B. im Schlamm, Erdboden, Staub), in oder auf Lebensmitteln können sie monatelang bis einige Jahre überleben [589].

### 1.4.2. Epidemiologie der Salmonellose

Im Jahr 2008 wurden dem RKI in Deutschland gemäß der nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) bestehenden Meldepflicht insgesamt 45.401 *Salmonella*-Infektionen übermittelt, darunter 42.902 Erkrankungen [590]. Bei der Salmonellose handelt es sich um eine klassische Lebensmittelinfektion. Salmonellen sind ubiquitär verbreitet und können eine Vielzahl von ökologischen Nischen besiedeln. Früher sowie heute noch in den



Entwicklungsländern führten die stark an den Menschen adaptierten *Salmonella*-Serovare *S. Typhi* und *S. Paratyphi* A, B und C zu septikämischen Allgemeininfektionen. Gegenwärtig sind vor allem in den Ländern mit hochentwickelter Landwirtschaft die Enteritissalmonellen von Bedeutung [591]. In einer Kalkulation aus dem Jahr 2010 wurde das weltweite Auftreten von nicht-typhoidalen *Salmonella*-Gastroenteritiden auf 93,8 Millionen Fälle, davon 155.000 Todesfälle pro Jahr geschätzt. Es wird davon ausgegangen, dass 80,3 Millionen Fälle auf kontaminierte Lebensmittel zurückgehen [592]. *S. enterica* Serovar Typhimurium ist demzufolge einer der häufigsten Pathogene, welcher zu einer durch Lebensmittel übertragenen Gastroenteritis bei Menschen führt. Diese ist gekennzeichnet durch Fieber, eine akute intestinale Entzündung, Durchfall und die Anwesenheit von Neutrophilen in Fäzesproben [593]. Daneben ist das Serovar ein bedeutendes Pathogen bei fleischproduzierenden Tieren, wie z. B. Schweinen, Hühnern und Rindern [594]. In den landwirtschaftlich genutzten Tierarten persistieren die Enteritissalmonellen subklinisch oder auch symptomlos und werden erst nach Übertragung auf den Menschen zu einem gesundheitlichen Problem. Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme der Erreger [595]. In der Bundesrepublik Deutschland sowie in allen anderen Industriestaaten ist das fleischproduzierende Nutztier das Hauptreservoir. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt über kontaminierte Lebensmittel sowie Wasser, Kontaktinfektionen vom Tier zum Menschen sind sehr selten [595]. Bei der Übertragung handelt es sich meist um geringe Keimdosens. Erst durch küchenhygienische Fehler kommt es zu einer Vermehrung der Salmonellen und damit zu einer für den Menschen kritischen Keimmenge. Die  $ID_{50}$  liegt bei einem gesunden erwachsenen Menschen bei  $\geq 10^5$  Salmonellen [591]. Epidemiologisch und pathogenetisch lassen sich die wirtsadaptierten Salmonellen von den Enteritissalmonellen abgrenzen. Diese rufen ausschließlich systemische Krankheitsbilder beim jeweiligen Wirt hervor (z. B. *S. Typhi* für den Menschen, *S. Choleraesuis* für das Schwein) [596, 597] und sind im Gegensatz zu den nicht-wirtsadaptierten Serovaren auf bestimmte Wachstumsfaktoren angewiesen.

### 1.4.3. Pathogenese der Salmonelleninfektion

Beim Menschen erfolgt die Infektion mit nicht-typhoiden *Salmonella* hauptsächlich über kontaminierte Lebensmittel, vorwiegend tierischen Ursprungs. Nach der oralen Aufnahme überleben die Salmonellen die Passage durch den Magen und den damit verbundenen stark sauren pH-Wert (pH-Wert = 4 – 5) der Magensäure nur dann, wenn sie gleichzeitig mit fett- und proteinhaltiger Nahrung aufgenommen werden [591, 595]. Bei sauren pH-Werten kommt es zur sogenannten *acid tolerance response* (ATR), in deren Rahmen über 50 Säure-Schock Proteine (ASPs) exprimiert werden [598–600]. Ein essentieller Virulenzfaktor von *S. Typhimurium* ist die  $Mg^{2+}$ -abhängige Protonen-translozierende ATPase, welche vom *atp*-Operon codiert wird [598]. Stämme, bei denen dieses Gen mutiert ist, sind sehr sensitiv gegenüber sauren pH-Werten [601–603]. Trotz dieser Mechanismen wird während der

Passage durch den Magen ein großer Teil der Salmonellen abgetötet. In einer Studie mit Mäusen zeigten Carter *et al.* 1974, dass nur etwa 1 % der oral verabreichten *S. Enteritidis* die Magenpassage überlebt [604]. Nachdem die Salmonellen das Darmlumen erreicht haben, müssen sie mit der residenten Mikroflora um vorhandene Nährstoffe konkurrieren. Bei einer Behandlung mit Antibiotika z. B. Streptomycin vor der Infektion mit *Salmonella* kommt er zu einer deutlichen Erniedrigung der ID<sub>50</sub> Infektionsdosis um mehr als das 100.000-Fache [605]. Dies macht die bedeutende Funktion der vorhandenen Darmflora als Barriere für enteropathogene Bakterien wie z. B. *Salmonella* deutlich. *S. Typhimurium* nutzt seine Virulenzfaktoren, um eine akute Entzündung des Darms hervorzurufen und so einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen zu haben. Winter *et al.* (2010) zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies, die während der Entzündungsreaktion entstehen, mit endogenen Schwefelkomponenten (Thiosulfaten) aus dem Darmlumen reagieren und so einen neuen respiratorischen Elektronenakzeptor (Tetrathionat) schaffen. Die Möglichkeit der Salmonellen diesen neuen Elektronenakzeptor zu nutzen, stellt einen Wachstumsvorteil dar [606]. *S. Typhimurium* kolonisiert das terminale Ileum und Kolon und ruft für gewöhnlich in weniger als 24 Stunden die Symptome einer Gastroenteritis hervor [607]. Deutlich längere Inkubationszeiten (60 – 120 Stunden) konnten bei *S. Enteritidis* beobachtet werden. In ihrer Studie konnten Abe *et al.* (2004) zeigen, dass diese lange Inkubationszeit auf eine niedrigere Infektionsdosis und ein vermindertes Wachstum der Bakterien zurückzuführen ist [608].

Salmonellen gelten als fakultativ invasive Bakterien. Die zwei Hauptkomponenten einer Salmonelleninfektion im Intestinum sind die Adhärenz/das Anheften an die Wirtszellen und die nachfolgende Invasion dieser Zellen. Nachdem die Salmonellen den Dünndarm erreicht haben, durchqueren sie die intestinale Mukoschicht, um zur darunterliegenden Epithelschicht zu gelangen und entgehen so z. B. antimikrobiellen Peptiden, Verdauungsenzymen, sekretorischen IgA und anderen angeborenen Abwehrmechanismen des Wirtes [609–611]. Verschiedene Adhesine und Fimbrien sind für die Adhärenz an Epithelzellen des Darms notwendig [612]. Im Anschluss an das Anheften nutzt *Salmonella* unterschiedliche Mechanismen, um das intestinale Epithelium zu durchqueren. Nach Carter *et al.* (1974) schaffen allerdings nur 5 % des Inokulums an Salmonellen eine Invasion durch das intestinale Epithel [604]. Salmonellen verfügen über ein vielfältiges Spektrum an Virulenzfaktoren, die von zwei Typ-III-Sekretionssystemen direkt in die Zielzellen injiziert werden [613]. Die zwei Typ-III-Sekretionssysteme sind im Genom auf zwei chromosomalen Bereichen, die als "*Salmonella* pathogenicity island"-1 und -2 (*Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 und 2 oder SPI1 und SPI2) benannt sind, kodiert [614–616]. Die Effektorproteine sind sowohl im SPI1 und SPI2, als auch vereinzelt oder auf anderen Pathogenitätsinseln kodiert. Diese Effektorproteine können zu pathogenetisch wichtigen Veränderungen der Gewebe führen, aber auch unterschiedliche Stoffwechselvorgänge stören und so z. B. zu einer Fehlregulation des Wasser- und Elektrolythaushalts (Durchfall) führen [402].

Hauptsächlich werden drei Wege der Invasion beschrieben: Transzytose durch M-Zellen, SP1-induzierte Aufnahme und Aufnahme durch CX3CR<sup>+</sup> Makrophagen/dendritische Zellen [617]. Die Transzytose durch die M-Zellen (M engl. für *microfold* oder *membranous*), welche Antigene und Bakterien aus dem Darmlumen zur *Lamina propria* transportieren, stellt hierbei den Haupteintrittsweg dar und erfolgt schnell (10 Min.) [618, 619]. Daneben können Salmonellen ihre Internalisierung in nicht-phagozytierende Enterozyten durch das virulenz-assoziierte Typ-III-Sekretionssystem (T3SS-1) aktiv veranlassen. Typ-III-Sekretionssysteme kommen in vielen gramnegativen Pathogenen vor. Sie formen zylindrische, nadel-ähnliche Organellen ("secretons"), welche Proteine über die innere und äußere Membran der Bakterienzelle transportieren [620]. *Salmonella* codiert innerhalb der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 und 2 für zwei unterschiedliche virulenz-assoziierte T3SS. Diese besitzen eine Vielzahl von Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion [621]. T3SS-1 ist aktiv während des Anheftens an die Wirtszelle/der Kontaktaufnahme zur Wirtszelle und transloziert Proteine (Effektoren) über die Plasmamembran. T3SS-2 wird dagegen intrazellulär innerhalb der Phagosomen exprimiert und transloziert Effektoren über die Vakuolenmembran ins Zytosol [611]. Bei der Invasion injiziert das T3SS-1 Effektoren in die Wirtszelle. Eine kleine Gruppe von T3SS-1 Effektoren (*Salmonella invasion protein*: SipA, SipC; *Salmonella outer protein*: SopA, SopB, SopD, SopE und SopE2) wirken zusammen, um eine Umformung der Membran und damit auch einen Umbau des darunter liegenden  $\beta$ -Aktin-Zytoskeletts der Wirtszelle zu veranlassen. Es entstehen massive lokalisierte Membranausstülpungen (sogenannte "*membrane ruffles*"), welche die Bakterien umschließen und die Invasion in die Enterozyten erleichtern [622–624]. Das T3SS-1 ist auf der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 1 (SPI-1) codiert. Nach erfolgreicher Invasion setzt *Salmonella* das Zytoskelett wieder in den Ursprungszustand zurück.

Daneben erfolgt ebenfalls eine Phagozytose durch CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen/dendritische Zellen, welche sich unterhalb des Epithels in der *Lamina propria* befinden. Sie verfügen über die Fähigkeit Pseudopodien in das Darmlumen zu strecken und so die Salmonellen durch Pinozytose aufzunehmen [94, 625]. Eine Invasion wurde auch auf parazellulärem Weg nach vorheriger Spaltung der *tight junctions* durch *Salmonella* beschrieben [626].

Nach der Internalisierung in nicht-phagozytierende Zellen verbleibt *Salmonella* in einer Vakuole ("*spacious phagosome*", SP). Diese schrumpft über Minuten bis Stunden und bildet eine adhärenente Membran um ein Bakterium oder mehrere Bakterien. Es entsteht ein intrazelluläres phagosomales Kompartiment, die sogenannten "*Salmonella-containing vacuole*" (SCV) [611]. Das SP1-1 T3SS-1 scheint auch am frühen Stadium der Bildung der SCV beteiligt zu sein [627]. Die reife SCV wandert in Richtung des Golgi-Apparates, dabei kommt es zu Interaktionen mit dem endozytischen System [624]. Kurz nach der Internalisierung besitzt die SCV vorübergehend zelluläre Marker früher Endosomen. Dazu gehören z. B. der Transferrin-Rezeptor (TfnR), das frühe endosomale Antigen 1 (EEA1)

sowie die Rab GTPasen Rab5 und Rab11 [628, 629]. Diese frühen Marker werden ca. 60 – 90 Min. *p. i.* immer weniger oder gehen verloren, die SCV wird mit Markern für späte Phagosomen/Lysosomen angereichert (z. B. *lysosomal glycoproteins*, Igps; *vacuolar-ATPase* – V-ATPase) [630]. Die Aktivität der V-ATPase führt zu einer Azidifikation in der SCV. Der pH-Wert sinkt in der ersten Stunde nach der Aufnahme von *Salmonella* auf 4,0 – 5,0 [631]. Diese Beobachtung ist allerdings umstritten, da in anderen Studien keine Hinweise auf eine Ansäuerung gefunden werden konnte. Daneben enthält das phagosomale Milieu ebenfalls antimikrobielle Peptide, Sauerstoff- und Stickstoffradikale sowie 1 mM Magnesium und Calcium [631–633]. Der niedrige pH-Wert sowie die anderen Faktoren, welche das Milieu in der SCV beeinflussen, werden durch verschiedene Sensormoleküle erkannt. Dabei handelt es sich meist um Zweikomponentensysteme wie z. B. OmpR/EnzV, PhoP/PhoQ, RpoS/RpoE, PmrA/PmrB aber auch um zyklisches diGMP. Alle diese regulatorischen Systeme ermöglichen das intrazelluläre Überleben sowie eine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden und oxidativem Stress [634–638]. Die Sensormoleküle induzieren zugleich die Expression einer Reihe von SPI-2 codierter Gene [632, 639].

Die SCV wandert entlang von Mikrotubuli von der Zellperipherie zu einer zellkernnahen Position am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) [640, 641]. Diese Positionierung in direkter Nachbarschaft zum Golgi Netzwerk wird durch drei Effektoren eines zweiten T3SS-2, welches auf der *Salmonella* Pathogenitätsinsel 2 (SPI-2) kodiert ist, (SifA, SseF und SseG) ermöglicht [640, 642]. Dem T3SS-2 kommt eine entscheidende Bedeutung bei der zweiten Phase der Invasion sowie dem Überleben in Makrophagen zu [643]. SifA ist einerseits für die Bildung langer filamentöser Membranstrukturen, der sogenannten "*Salmonella*-induced filaments" (Sifs) erforderlich ( $\geq 3 - 6$  Stunden *p. i.*) [644, 645] und andererseits für die Versorgung der Vakuole, welche die replizierenden Bakterien umgibt [646]. Die intrazelluläre Replikation beginnt mit der Bildung der *Salmonella*-induced filaments [644, 645].

Neben den SPI-1 und SPI-2 T3SS gibt es noch weitere Sekretionssysteme, die während der Salmonelleninfektion eine Funktion einnehmen und zur Virulenz beisteuern. Dazu gehört das *sci*-codierte (*Salmonella enterica* centisome 7 genomic island) Typ-VI-Sekretionssystem [647] sowie der ZirTS-Sekretionsweg [648]. Der ZirTS-Sekretionsweg besteht aus ZirT (*zinc regulated transporter*), einem Protein, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist und seinem sezernierten Partner, ZirS (*zinc regulated secreted*). ZirS wird ZirT-abhängig in die extrazelluläre Umgebung sezerniert [648]. Die genaue Funktion von ZirS ist bisher unklar. Der ZirTS-Sekretionsweg teilt einige wichtige Merkmale mit den Zweipartner-Sekretionssystemen (*two-partner secretion system*, TPS) sowie Mitgliedern der Intimin/Invasin-Familie von Adhäsinen. Im Gastrointestinaltrakt fungiert ZirTS als Virulenz-Regulator. Bei Mäusen kommt es nach Ausscheidung der Salmonellen in diesen zu einer erhöhten Expression von *zirT* [648]. Zusammen können ZirT und ZirS die Virulenz von

Bakterien vermindern, indem sie die bakterielle Kolonisation an systemischen Orten verringern. ZirTS beeinflusst daneben die frühen Stadien der Infektion. Der vollständige Mechanismus ist allerdings noch unklar. Gal-Mor *et al.* (2008) zeigten, dass eine Deletion des *zirTS*-Gens zu einem hypervirulenten Phänotyp führt. In ihrer Studie sank die mittlere Überlebenszeit der BALB/c-Mäuse von 8,5 auf 6 Tage [648]. Salmonellen werden bei Tieren häufig durch die Aufnahme von kontaminiertem Kot übertragen. Es wird spekuliert, dass die Expression von ZirTS in Erwartung auf einen neuen Wirt erfolgt, um die Virulenz bei einer intestinalen Kolonisation zu regulieren [648]. Das ZirTS-Sekretionssystem wird durch OxyR negativ reguliert, einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen als Antwort auf oxidativen Stress kontrolliert [649]. Daneben zeigten Gal-Mor *et al.*, dass die Expression von *zirTS* durch die Anwesenheit von Zink im Medium gehemmt wird. *Salmonella*, welche auf M9-Minimalmedium mit bzw. ohne 0,5 mM ZnSO<sub>4</sub> angezogen wurden, zeigten bei einer Überprüfung mittels quantitativer Real-Time PCR eine 2,0- bis 2,5-fache Reduktion der Expression von *zirT* und *zirS* [648]. Eine mit Zink assoziierte Komponente innerhalb des ZirTS-Sekretionsweges konnte allerdings nicht ermittelt werden. Es wird davon ausgegangen, dass der ZirTS-Weg nicht direkt mit Zink interagiert, sondern das Zn<sup>2+</sup> das Proteinexpressionslevel reguliert [650]. Eine Veränderung der Zink-Konzentration im Medium erlaubt es *Salmonella*, die Expression der *zirTS*-Gene zu kontrollieren. Prehna *et al.* (2012) stellten ein erstes Modell dieses neuen Antivirulenz-Mechanismus auf. Sie konnten noch ein weiteres Protein, ZirU, welches direkt mit dem System interagiert, identifizieren. ZirT sezerniert sowohl ZirS als auch ZirU in den extrazellulären Raum oder möglicherweise auch in die SCV. Dort interagieren ZirS und ZirU miteinander und mit der Immunglobulin-ähnlichen Domäne von ZirT. Laut Prehna *et al.* (2012), handelt es sich um ein Multiprotein-Immunglobulin-Adhäsions-System. Es wird vermutet, dass *Salmonella* das ZirTS-Sekretionssystem verwendet, um die Virulenz zu verringern und so eine erhöhte Wirts-Transmission zu erreichen [650].

Die Replikation von *S. Typhimurium* in Makrophagen führt *in vivo* letztendlich zur Zerstörung der Wirtszelle, gefolgt von einer weiteren Runde aus Internalisation und bakterieller Replikation. Richter-Dahlfors *et al.* (1997) zeigten z. B. mittels Konfokalmikroskopie, dass *S. typhimurium* SL1344 bei BALB/c Mäusen zytotoxisch auf Phagozyten wirkt [651]. Die Akkumulation einer großen Anzahl von Bakterien ist alleine schon ausreichend, um eine unspezifische Zerstörung der Wirtszelle herbeizuführen. Daneben kann *Salmonella* den programmierten Zelltod (Apoptose) in Epithelzellen und Makrophagen auslösen. Es kommt zur Aktivierung einer Caspase-Kaskade und schlussendlich zum Abbau der Wirtszelle. In Makrophagen kann der programmierte Zelltod mindestens durch zwei unabhängige Mechanismen ausgelöst werden. Ein Mechanismus benötigt den SIP-1 Effektor SipB und ist abhängig von Caspase-1 [652, 653]. Dieser Mechanismus ist schnell und tritt vor allem im frühen Krankheitsstadium auf. Zunächst wurde dieser Mechanismus für Apoptose gehalten,

später wurde jedoch festgestellt, dass es sich um eine ungewöhnliche Form der Nekrose, bezeichnet als Pyroptose, handelt [654, 655]. Es kommt hier im Gegensatz zur Apoptose zu einer Bildung und Freisetzung inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ ) und Vesikel. Die entstehende Inflammation sowie die Rekrutierung von Phagozyten könnte für eine systemische Verbreitung von Bedeutung sein [656]. Ein zweiter Mechanismus tritt erst später auf und ist abhängig von OmpR und SPI-2. Die bakterielle Kolonisation von Leber und Milz wird durch die Freisetzung der Bakterien durch Lyse oder durch eine Aufnahme von nekrotischen oder apoptotischen Zellen durch benachbarte Makrophagen erleichtert [656]. Die Salmonellen können sich so intrazellulär innerhalb von apoptotischen Zellen verbreiten. Die Auswirkungen einer Infektion auf den Wirtsorganismus sind je nach Erreger und resultierender Immunantwort unterschiedlich. Nachdem sie die intestinale Barriere überwunden haben, dringen die *Salmonella*-Serotypen, welche eine systemische Infektion auslösen im Bereich der *Lamina propria* durch Induktion einer Makropinozytose in phagozytierende Immunzellen wie Makrophagen ein. Dabei aktivieren sie eine Vielzahl von Virulenzmechanismen, die ihnen das Überleben in den Immunzellen ermöglicht [632, 657]. Es kommt zur Replikation der Bakterien und nachfolgend zur Verbreitung von *Salmonella* durch das Retikuloendotheliale System (RES). Die Bakterien gelangen in mesenteriale Lymphknoten und besiedeln Organe wie Leber und Milz. Erfolgt eine Replikation der Salmonellen im Blut kommt es zum Tod. Dahingegen bleiben Infektionen mit nicht-typhoiden Serovaren normalerweise auf das Intestinum sowie das darmassoziierte Lymphoidgewebe (GALT) begrenzt. Die Bakterien führen hier zu einer frühen entzündlichen Immunantwort, welche eine Einwanderung von polymorphonukleären Zellen (PMNs), vor allem Neutrophilen zur Folge hat [306, 658]. McCormick *et al.* (1995) zeigten unter Verwendung einer Vielzahl von *Salmonella*-Serovaren, dass die transepitheliale Signalübertragung zu PMNs eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Gastroenteritis beim Menschen spielt [658]. Allerdings ist hier nicht das chemotaktische Peptid Interleukin-8 das für die Transmigration verantwortliche Signal. Ein anderer bislang unbekannter chemotaktischer Faktor wird vermutet, welcher die PMN-Migration über das intestinale Epithel dirigiert [293]. Im Anschluss an die Migration kommt es zur Sekretion verschiedener zytotoxischer Stoffe, welche letztendlich zu einer Zerstörung der Darmschleimhaut und zu einer inflammatorischen Diarrhoe führen [306].

#### **1.4.4. Verfügbarkeit von Spurenelementen**

Übergangsmetalle wie z. B. Eisen, Kupfer, Zink, Mangan, Nickel und Cobalt sind essentiell für Bakterien aufgrund ihrer Funktion als Cofaktoren für ungefähr ein Drittel ihrer Proteine [659]. Allerdings können diese Elemente auch toxisch wirken. Daher verfügen alle Bakterien über Mechanismen, mit denen sie Metallkonzentrationen in ihrer unmittelbaren Umgebung messen und schnell auf Veränderungen reagieren können. Die Verfügbarkeit der

Spurenelemente hängt von verschiedenen Faktoren ab. Beispielweise dem pH-Wert. Das Vorhandensein von organischen Substanzen, Sulfaten und Carbonaten aber auch der Sauerstoffgehalt spielen hierbei außerdem eine wichtige Rolle. Während der Infektion ist *Salmonella* mit einer großen Veränderung bez. der Verfügbarkeit von Spurenelementen konfrontiert. Diese Veränderungen werden teilweise durch die Freisetzung antimikrobieller Proteine beeinflusst, welche Metalle binden können, aber größtenteils sind sie auf generelle Veränderungen der Metall-Homöostase als Antwort auf die Infektion zurückzuführen. Beispielsweise kommt es zur Freisetzung des Hormons Hepcidin, welches den Eisenstoffwechsel beeinflusst [660, 661]. Im eukaryotischen Wirt ist die Verfügbarkeit von Eisen abhängig von der Aktivität eisenbindender Proteine wie z. B. Transferrin oder NRAMP1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1* oder Slc11A1) [662]. NRAMP1 ist ein phagolysosomaler Transporter für Protonen und divalente Ionen, welcher in der Milz, Leber und Lunge exprimiert wird. Am reichlichsten ist NRAMP1 in zirkulierenden Makrophagen/Monozyten und in polymorphonuklearen Leukozyten vorhanden [663–665]. So begünstigt NRAMP1 das Abtöten der Bakterien, indem es divalente Metallionen über die phagosomale Membran transportiert. Um diesen Einschränkungen entgegen zu wirken, produzieren Salmonellen bei Eisenmangel zwei Siderophore, Enterobactin und Salmochelin [666, 667].

Zink ist neben Eisen das wichtigste Spurenelement in Prokaryoten, z. B. wurde es in Vertretern aus allen sechs großen Enzymklassen als Cofaktor oder Strukturkomponente gefunden [518, 668, 669]. Zink kann allerdings auch toxisch wirken, wenn es in mikro- oder millimolaren Konzentrationen im Medium vorliegt. Gründe hierfür sind z. B. die Fähigkeit der Bindung an Sulfhydryl- und Imidazolgruppen oder aber auch die Konkurrenz mit anderen Metallionen um den Einbau in aktive Zentren von Proteinen [670]. Dementsprechend ist es wichtig, die Konzentration an Zinkionen innerhalb der Zellen zu kontrollieren. Hierzu existiert ein komplexes System, welches aus Zinkaufnahme und verschiedenen Entgiftungsmechanismen, wie z. B. der Bindung an Metallothionein oder Export aus dem Zellinneren, besteht. Die meisten Prokaryoten besitzen zwei Typen von Aufnahmesystemen: Systeme mit hoher Substratspezifität, welche unter Mangelbedingungen ausgebildet werden und unspezifische, konstitutiv exprimierte Systeme, die über einen chemoosmotischen Gradienten getrieben werden [670]. In der SCV ist die Menge an verfügbarem Zink eingeschränkt [671]. Demzufolge werden hochaffine Zink-Aufnahmesysteme benötigt [671, 672]. Bei dem ZnuABC-Transportsystem von *Salmonella*, welches zu den ABC-Transportern (*ATP-binding-cassette-Transporter*) gehört, handelt es sich um ein hochaffines Zink-Aufnahmesystem. Es besteht aus drei Proteinen: ZnuA ist das periplasmatische Bindeprotein, welches Zink einfängt und an die zweite Komponente, ZnuB, die Komponente in der Cytoplasmamembran weiterleitet und ZnuC, der assoziierten ATPase. Die Energie für die Zinkaufnahme wird durch die Spaltung von ATP gewährleistet. Es wurde gezeigt, dass

das Wachstum von *S. Typhimurium* mit einer Mutation des *znuA* Gens in zinkreichem Medium nicht beeinflusst wird. Allerdings kommt es unter Zinkmangel-Bedingungen zu einer starken Wachstumseinschränkung [671]. Daneben führt ein Verlust von *znuC* oder des gesamten *znuABC*-Operons zu einer verminderten Überlebensrate von *S. Typhimurium* in Mäusen [672, 673]. Dies macht die Bedeutung des ZnuABC-Transportsystems als Zink-Import-Protein in zinkarmen Umgebungen deutlich. Bei Verlust des gesamten *znuABC*-Operons kommt es zu einer starken zellvermittelten Immunantwort, welche einen dauerhaften immunbasierten Schutz gegenüber einer Infektion mit virulenten *S. Typhimurium*-Stämmen bietet. Infolgedessen besitzen diese *znuABC*-Mutantenstämme ein Potential für die Vakzinentwicklung [673]. Das ABC-Transportsystem wird durch den Repressor Zur (*Zn<sup>2+</sup>uptake regulator*) mit Zink als Corepressor reguliert [674]. Daneben spielt die Zinkkonzentration des intrazellulären Milieus eine wichtige Rolle [671, 672]. Der Zink-Sensor Zur ist neben dem Eisen-Sensor Fur das zweite Mitglied der Fur-Familie von Regulatoren in *S. Typhimurium*. Zur verhindert neben der Transkription von *znuABC* auch die Transkription von *zinT*, einem periplasmatischen Protein, welches an der Aufnahme von Zink durch ZnuABC bei vorherrschendem Zink-Mangel beteiligt ist [675]. Zur bindet vermutlich an die bidirektionale Promotor-Region von *znuA* und *znuCB* [676]. Bei Zink-Konzentrationen von  $\geq 1 \mu\text{M}$  im Medium wird die Expression von *znuABC* in *S. Typhimurium* verringert. Die Expression des Operons ist allerdings in Bakterien stark erhöht, welche aus der Milz von infizierten Mäusen isoliert wurden [671]. Die Zink-Konzentration in eukaryotischen Zellen liegt in etwa bei 0,2 mM. Allerdings ist die Menge Zink, welche den Bakterien frei zur Verfügung steht, stark limitiert. Daher wird der ZnuABC-Transporter hier für einen Zink-Import benötigt.

Zu den Zink-Transportern, welche die Aufnahme über einen elektrochemischen Protonengradienten ermöglichen, gehören NRAMP-Homologe [677, 678]. Die NRAMP-Transporter wurden ursprünglich in Eukaryoten identifiziert und spielen bei Säugetieren eine Schlüsselrolle in der Homöostase von Eisen und anderen Ionen. Mittlerweile sind NRAMP-Homologe in allen weiteren untersuchten Organismen (Säugetieren, Vögeln, Fischen, Insekten, Nematoden, Pflanzen, Pilzen und Bakterien) gefunden worden [679–684]. Das ubiquitäre Vorkommen sowie die hohe Sequenz-Konservierung [685] weisen auf eine essentielle Rolle von NRAMP in den unterschiedlichen Organismen hin. Das Säugetier-NRAMP1 ist ein hydrophobes, integrales Membranprotein, dessen Expression auf Makrophagen und polymorphonukleäre Zellen beschränkt ist und artspezifisch in unterschiedlichen Geweben vorkommt [686, 687]. Durch NRAMP1 wird der Befall und die Vermehrung unterschiedlicher Pathogene kontrolliert, so wie *Leishmania*, *Salmonella*, verschiedene Mykobakterien u. v. a. [688–691]. Gruenheid *et al.* (1997) zeigten, dass NRAMP1 im spät-endosomalen/früh-lysosomalen Kompartiment von Makrophagen exprimiert wird [687]. Nach Abschluss der Phagozytose wird NRAMP1 in die Membran der



Phagosomen eingebaut und verbleibt dort während des Reifungsprozesses vom Phagosom zum Phagolysosom [687]. NRAMP1 fungiert hier als bivalenter Kationentransporter, der Metallionen ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) pH-abhängig aus dem Phagosomenlumen in das Cytoplasma ausschleust [692]. Dieses Ausschleusen von einem oder auch mehreren essentiellen Metallionen aus den Phagosomen durch NRAMP1 hat dementsprechend auch Einfluss auf das intrazelluläre Überleben und Wachstum phagozytierter Pathogene (z. B. *Salmonella*). Den Pathogenen werden Metallionen entzogen, welche diese für die Bildung wichtiger Schutzenzyme (Katalase, Peroxidase, Superoxid-Dismutase) benötigen [693]. Somit wird die bakterizide Wirkung der Makrophagen erhöht, indem die Pathogene anfälliger für Sauerstoffradikale gemacht werden [693, 694]. In Säugetieren wurde ein weiteres NRAMP-Homolog, NRAMP2, isoliert, das im Gegensatz zu NRAMP1 in allen Geweben exprimiert wird [686]. Es weist eine 78%ige Homologie zu NRAMP1 auf [695]. Von Gunshin *et al.* (1997) wurde es als Transferrin-unabhängiges Eisenaufnahme-System mit Kationentransporter-Funktion im Säugetierdarm identifiziert [677]. Die Expression von *Nramp2*-mRNA wird bei Eisenmangel drastisch hochreguliert, sodass es zu einer verstärkten Expression im Bürstensaum des Duodenums kommt [696]. Das erste bakterielle NRAMP wurde in *E. coli* identifiziert und charakterisiert. Die Gene werden als *mntH* für „*manganese transporter H<sup>+</sup>-dependent*“ bezeichnet [697]. Bei MntH handelt es sich um einen Transporter der Cytoplasmamembran, welcher vor allem Mangan in die Bakterienzelle transportiert. MntH aus *Salmonella* ist ein protonenabhängiger Kationentransporter mit einem  $K_m$ -Wert von 0,1  $\mu M$  für  $Mn^{2+}$ -Ionen [678]. Daneben werden  $Fe^{2+}$ -,  $Co^{2+}$ -,  $Cd^{2+}$ -,  $Ni^{2+}$ -,  $Cu^{2+}$ - und  $Zn^{2+}$ -Ionen transportiert. Die Regulation erfolgt über die Proteine FurR und MntR [698] sowie über die externe Verfügbarkeit von Metallionen. Daneben wird die Expression von *mntH* durch den Wasserstoffperoxid-Sensor OxyR kontrolliert, welcher die Expression als Antwort auf intrazellulären Stress durch Wasserstoffperoxid auslöst [699]. Säugetier- und bakterieneigene NRAMP-Proteine konkurrieren um bivalente Kationen im intraphagosomalen Bereich, beide pH-abhängig, aber in entgegengesetzte Richtungen [692].

Den Aufnahmesystemen stehen eine Vielzahl von Mechanismen gegenüber, welche die Zelle vor zu hohen Zink- bzw. weiteren Schwermetallionen-Konzentrationen schützen. Zu diesen Mechanismen gehört beispielsweise die Bindung an Polypeptide wie z. B. Metallothionein oder Glutathion [511, 700–703]. In Prokaryoten ist die Kapazität der Zelle zur Speicherung von z. B. Glutathion-Metall-Komplexen allerdings limitiert und der Energieaufwand zur Synthese von Metallothioneinen sehr hoch [670, 704], daher basiert die Resistenz gegenüber Schwermetallen vor allem auf dem Export aus der Zelle. Dazu werden induzierbare Efflux-Systeme verwendet, welche die Konzentration eines bestimmten Ions durch einen aktiven Export vermindern können [704]. In Prokaryoten sind drei weit verbreitete Zink-Efflux-Systeme bekannt: die RND-Familie (*resistance-nodulation-cell*

*division*), CDF-Proteine (*cation diffusion faciliator*) und Zn(II)/Cd(II)/Pb(II)-transportierende CPx-Typ ATPasen [676, 705–709].

Ein weiteres Protein, welches an der Zink-Toleranz beteiligt ist, ist ZraP (*zinc resistance-associated protein*). ZraP (YjaI) wurde in *E. coli* identifiziert und stellt eine wichtige Komponente bei der Zink-Homöostase dar. Noll *et al.* (1998) konnten zeigen, dass es bei erhöhten Zink-Konzentrationen zu einer zinkabhängigen Expression von ZraP kommt. Das Protein lagert sich zur Membran um und bindet Zink C-terminal. Dabei kommt es zu einer selektiven proteolytischen Spaltung und letztendlich zur Freisetzung von Protein-Zink-Komplexen in das Periplasma [710]. Dass ZraP ein periplasmatisches, zinkabhängiges Chaperon ist und zur Regulation des Zweikomponentensystems ZraS/R (HydH/G) beiträgt, wurde von Appia-Ayme *et al.* (2012) gezeigt [711]. Andererseits reguliert ZraS/R die Expression von *zraP*, dessen Expression ebenfalls von RpoN ( $\sigma^{54}$ ) abhängig ist [712].

**Tabelle 6: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Mutantenstämme, Beschreibung des mutierten Gens und dessen Funktion.**

Gen	Interne Nummer	Beschreibung/Funktion
<i>znuA</i>	7030	Periplasmatische Zink-bindende Untereinheit
<i>znuB</i>	7032	Membrankomponente
<i>znuC</i>	7076 ( <i>znuBC</i> )	ATPase
} ZnuABC-Transporter		
<i>zur</i>	7038	ZnuABC-Repressor, Metall-regulatorisches, DNA-bindendes Protein mit femtomolarer Sensivität
<i>zirS</i>	6588	Exoprotein
<i>zirT</i>	6590 6592 ( <i>zirTS</i> )	Membran-Translokator, vermittelt die Sezernierung von ZirS
} ZirTS-Sekretionssystem		
<i>zraP</i>	7036	Bindet Zink, von entscheidender Bedeutung für die Zink-Toleranz
<i>mntH</i>	7028	Protonen-abhängiger Metallionen-Transporter, gehört zur NRAMP-Familie von eukaryotischen Fe <sup>2+</sup> - und Mn <sup>2+</sup> -Transportern, Transport kann durch Zn <sup>2+</sup> inhibiert werden

## 1.5. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit war Teil eines interdisziplinären Forschungsprojektes und wurde im Rahmen des DFG-Sonderforschungsbereichs SFB 852 „Ernährung und intestinale Mikrobiota – Wirtsinteraktion beim Schwein“ erstellt. Ziel der Arbeit war es, die Effekte und Wirkungsweisen von Futterzusätzen (*Enterococcus faecium* SF68 und ZnO) auf die angeborene Immunantwort von Schweinen gegenüber intestinalen Pathogenen im Infektionsmodell zu untersuchen. Als Infektionsmodell wurden die enteropathogenen Salmonellen verwendet. Es wurden vier verschiedene Tierversuche durchgeführt: *Enterococcus faecium* SF68-Fütterungsversuch, *Enterococcus faecium* SF68-Fütterungs-/*Salmonella* Typhimurium DT104 challenge Versuch, Zinkoxid-Fütterungsversuch, Zinkoxid-Fütterungs-/*Salmonella* Typhimurium DT104 challenge Versuch. Während der Tierversuche wurden Blut- und Gewebeproben gewonnen. Die RNA wurde aus den Proben extrahiert und mittels quantitativer Real-time PCR die Genexpression verschiedener immunrelevanter Gene in den Kontroll- und Versuchsgruppen überprüft. Für dieses Projekt ist IL-10 von besonderer Bedeutung, da dieses Interleukin ein wesentlicher Immunmodulator im Intestinaltrakt ist. Neben IL-10 ist Interleukin-8, welches zur Gruppe der CXC-Motiv-Chemokine gehört und funktionell den pro-inflammatorischen Zytokinen zuzuordnen ist, ein bedeutendes Zytokin, dessen Genexpressionsrate ebenfalls untersucht wurde. Daneben wurde CTLA4 als Marker für eine T-Zell-Anergie und Herabregulation der Immunantwort untersucht.

In dieser Arbeit sollten Methoden zum Nachweis bakterieller Bestandteile und/oder der Aktivität von probiotischen Bakterien, die das angeborene Immunsystem von Schweinen beeinflussen können, entwickelt werden. Die Aufklärung des Wirkmechanismus von *Enterococcus faecium* SF68 auf das Immunsystem von Schweinen steht hierbei im Vordergrund. Neben den *In-vivo*-Versuchen zur Untersuchung des Zytokinprofils wurden auch in der Zellkultur Experimente durchgeführt. Dazu wurden verschiedene NF- $\kappa$ B-Reporterzelllinien mit *E. faecium* inkubiert und die Lumineszenz (Luziferase-Aktivität) gemessen. Diese Messung erlaubt eine Aussage über die Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit auch über den Immunstatus. Der Einfluss einer *E. faecium*-Preinkubation auf die durch eine *Salmonella* Infektion ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde ebenfalls überprüft. Neben intakten, lebenden *E. faecium* wurden auch durch Antibiotika getötete oder mittels FastPrep<sup>®</sup> (MP Biomedicals) lysierte *E. faecium* verwendet.

Die Wirkungsweise von Zinkoxid sollte anhand der Genexpression spezifischer Immunproteine aufgeklärt werden. Da PGRP-Formen, die eine Peptidoglykan Amidase-Aktivität besitzen, eine konservierte Zn<sup>2+</sup>-Bindestelle besitzen und Zink als Cofaktor benötigen, soll der Einfluss einer Zink-Zusatzfütterung *in vivo* auf die Expression der porzinen PGLYRPs (PGLYRP-1, PGLYRP-2A, PGLYRP-2B) untersucht werden. Aufgrund der Verbindung zwischen dem PGRP-Signalweg und dem Nod-Signalweg und wegen ihrer

Funktion als intrazelluläre PRRs wurden die Genexpressionsraten der zwei Nod-Proteine, Nod1 und Nod2, ebenfalls überprüft. Für die Untersuchungen der Genexpressionsraten wurden quantitative Real-time PCRs verwendet. Es wurden sowohl *In-vivo*- als auch *In-vitro*-Versuche durchgeführt. *In vitro* wurden neben der schon etablierten Methode (Gentamycin-Protection-Assay) auch Untersuchungen zur Aktivität des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B mit Hilfe von NF- $\kappa$ B-Reporterzelllinien durchgeführt. Durch die Verwendung verschiedener Mutanten von *Salmonella* Typhimurium ( $\Delta znuA$ -, *B*- und *BC*,  $\Delta zur$ ,  $\Delta zraP$ ,  $\Delta mntH$ ,  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$ ) sollte aufgeklärt werden, welchen Effekt diese Mutationen auf die Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz von *Salmonella* haben. Diese Gene codieren entweder für ein Zink-Aufnahmesystem (*ZnuABC*) und dessen Repressor (*Zur*), ein zinkabhängiges NRAMP-Homolog *MntH*, welches ein Metallionen-Transporter ist, ein Protein (*ZraP*), dass in die Zink-Toleranz involviert ist sowie ein alternatives von der Zink-Konzentration im umgebenden Medium anhängiges Sekretionssystem (*ZirTS*), welches eine Rolle als Antivirulenz-Mechanismus für eine erhöhte Transmission von *Salmonella* spielt. Alle Untersuchungen dienen letztendlich dazu, die Mechanismen hinter den verschiedenen Wirkungen von *E. faecium* und ZnO zu identifizieren.

## 2. Material

### 2.1. Zelllinien

Für die Infektions- und Bakterienlysatversuche wurden insgesamt fünf unterschiedliche porcine und humane Zelllinien aus epithelialeem bzw. monozytärem Ursprung verwendet.

**Tabelle 7: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.**

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Herkunft/Referenz
LoVo	<i>H. sapiens</i>	Epithelzellen	ATCC, Manassas, USA
THP-1	<i>H. sapiens</i>	Monozyten/ Makrophagen	DSMZ, Braunschweig
3D4/31	<i>S. scrofa</i>	Monozyten/ Makrophagen	L. Babiuk, Univ. of Saskatchewan, VIDO, CDN
PLN/C2	<i>S. scrofa</i>	Monozyten/ Makrophagen	K. Tedin, IMT, FU Berlin
IPEC-J2	<i>S. scrofa</i>	Epithelzellen	A. Blikslager, NCSU, USA

#### LoVo

Als einzige humane Epithelzelllinie wurde die Zelllinie LoVo (ATCC-Nr. CCL-229) verwendet, die 1971 aus einem metastasierenden Tumor des Kolons eines 56-jährigen Mannes mit colorektalem Adenokarzinom isoliert wurde [713].

#### THP-1

Die humanen THP-1 Zellen (ATCC-Nr. TIB-202, DSMZ Nr. ACC 16) wurden aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert. Die Zellen weisen Merkmale von Monozyten auf, zum Beispiel auch die Fähigkeit zur Phagozytose und zur Produktion von Lysozymen. Die Zellen wachsen normalerweise in Suspension, wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Tedin allerdings auf eine Adhärenz hin selektiert. Dementsprechend können die in dieser Arbeit verwendeten THP-1-Zellen als adhärente Zelllinie angesehen werden. Durch eine Behandlung mit Phorbolestern differenzieren die Zellen zu reifen Makrophagen [714].

#### IPEC-J2

Die porcine Epithelzelllinie IPEC-J2 (für: *Intestinal Porcine Epithelial Cell – Jejunum 2*) wurde 1989 aus dem Jejunum eines neonatalen Ferkels gewonnen (H.M. Berschneider, 1989). Die Zelllinie wurde von Schierack *et al.* als Modell für Untersuchungen zu Interaktionen zwischen Bakterien und intestinalen Epithelzellen des Schweins weiter charakterisiert und etabliert [715]. Aufgrund ihrer Herkunft eignet sich diese Zelllinie besonders gut für die Untersuchung der Effekte der Futterzusätze auf das Dünndarmepithel. Die IPEC-J2 Zellen exprimieren

viele wichtige TLRs (z. B.: TLR-2, TLR-4) und NLRs sowie Zytokine und Chemokine wie zum Beispiel IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$ . Des Weiteren verfügt die Zelllinie über intestinal-epitheliale Merkmale, wie beispielsweise die Bildung von Mikrovilli [716–719]. Aus diesen Gründen eignen sich die IPEC-J2 Zellen auch für Untersuchungen der intestinalen Immunabwehr. Die Effekte von *E. faecium* SF68 bzw. Zinkoxid können mit diesem *In-vitro*-Modell sehr gut untersucht werden.

### 3D4/31

Als porcine Makrophagen-ähnliche Zelllinie wurden 3D4/31 Zellen verwendet, die 1998 durch die Transfektion primärer Alveolarmakrophagen, welche aus zwölf Wochen alten Ferkeln isoliert wurden, entstanden sind. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pSV3-neo (ATCC<sup>®</sup> 37150<sup>™</sup>) transfiziert [720]. 3D4/31 Zellen sind in der Lage wichtige Zytokine bzw. Chemokine wie z. B. IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie einige Oberflächenproteine zu exprimieren (MHCII, CD14) [721].

### PLN/C2

Als zweite porcine Makrophagen-ähnliche Zelllinie wurden PLN/C2 Zellen verwendet. Sie dienen hauptsächlich dazu, einige Ergebnisse aus den 3D4/31 Zellen durch Verwendung einer zweiten Zelllinie zu unterstützen. Die Zellen sind 2007 durch Transformation von aufgereinigten peripheren Blut-Monozyten (PBMCs) mit dem Plasmid pSV3-neo entstanden (C. Tölke, FU Berlin). Die PLN/C2 Zellen sind bis heute kaum charakterisiert und wurden noch nicht veröffentlicht. Nachgewiesen ist die Expression einiger Oberflächenmarker wie z. B. MHC I und II, CD14, CD45. Des Weiteren weist die Zelllinie den "Swine Workshop Cluster 9" (SWC9) auf, welcher als Marker für ausgereifte porcine Makrophagen gilt.

## 2.2. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende *Salmonella*-Stämme verwendet:

**Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten *Salmonella*-Stämme.**

Bezeichnung	Interne Nummer	Beschreibung	Eigenschaften	Referenz/ Quelle
Wildtypstamm				
S. Typhimurium SL1344	2958	<i>Salmonella enterica enterica</i> serovar Typhimurium SL1344	Serotyp 1,4,[5],12:i:1,2; Reisolation aus BALB/c Maus (Milz), His auxotroph, Str <sup>R</sup>	Hoiseh and Stocker, 1981
Mutanten				
$\Delta znuA$	7030	SL1344 $\Delta znuA::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie

$\Delta znuB$	7032	SL1344 $\Delta znuB::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta znuBC$	7076	SL1344 $\Delta znuBC::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta zirS$	6588	SL1344 $\Delta zirS::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta zirT$	6590	SL1344 $\Delta zirT::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta zirTS$	6592	SL1344 $\Delta zirTS::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta zur$	7038	SL1344 $\Delta zur::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta zraP$	7036	SL1344 $\Delta zraP::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie
$\Delta mntH$	7028	SL1344 $\Delta mntH::kan$	Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	diese Studie

Weitere Bakterienstämme:

**Tabelle 9: Übersicht über die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

Bezeichnung	Interne Nummer	Beschreibung	Eigenschaften	Referenz/Quelle
<i>E. faecium</i> SF68	4258	<i>Enterococcus faecium</i> SF68 (NCIMB 10415)	isoliert aus Cylactin <sup>®</sup> LBC ME10	Cerbios-Pharma
<i>E. faecium</i> TX0016	4259	<i>Enterococcus faecium</i> TX0016	humanes Isolat	B. Murray University of Texas Health Science Center, Houston, Texas
<i>E. coli</i> Nissle 1917	1294	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (Handelsname Mutaflor <sup>®</sup> )	apathogen, probiotischer Stamm	P. Schierack, IMT, Berlin
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	6202	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655 <i>rph-1</i>	Laborstamm	C. A. Gross, UCSF, USA
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	213	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach ATCC 25904	hämolytisch	IMT
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	214	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach ATCC 25923	nicht hämolytisch	IMT
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	215	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach ATCC 29213	hämolytisch	IMT

### 2.3. Plasmide und Vektoren

Folgende Plasmide und Vektoren wurden für die Herstellung der einzelnen *Salmonella*-Mutanten nach Wanner & Datsenko [722] verwendet:

**Tabelle 10: Plasmide, die für die Mutagenese nach Wanner und Datsenko verwendet wurden.**

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle/Referenz
pCP20	<i>bla cat repA101(ts) cl857(ts) λP<sub>L</sub>-FLP+</i>	[723]
pKD4	pANTS <sub>γ</sub> , <i>kan</i> FRT-flankiert, Km <sup>R</sup>	[722]
pKD46	pINT-ts, <i>araC, bla, oriR101, repA101(ts), λred (gam<sup>+</sup>bet<sup>+</sup>exo<sup>+</sup>)</i> , Amp <sup>R</sup>	[722]
P22 HT105/1 <i>int-201</i>	"High-transforming" P22 Bakteriophage, integrase-negative	[724]

## 2.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt und die entsprechenden DNA-Sequenzen aus Veröffentlichungen entnommen, im Rahmen früherer Arbeiten in der Arbeitsgruppe etabliert oder selbstständig generiert. In Tabelle 11 sind die DNA-Sequenzen der Primer dargestellt. Tabelle 12 zeigt die für die Mutagenese nach Wanner und Datsenko verwendeten Primer.

**Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.**

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
Porzines β-Aktin	b-actinF	5' GGA <sup>CTT</sup> CGAGCAGGAGATGG	IMT
	b-actinR	5' GCACCGTGTGGCGTAGAGG	
Porzines IL-8	poIL8F-2	5' TTCGATGCCAGTGCATAAAT	[725]
	poIL8R-2	5' CTGTACAACCTTCTGCACCCA	
Porzines IL-10	poIL-10F3	5' GCGGCGCTGTCATCAATTC	[726]
	poIL-10R3	5' CGGGAACCTTGGAGCAGATTT	
Porzines CD86 (B7.2)	pCD86F	5'TTTGGCAGGACCAGGATAAC	[727]
	pCD86R	5'GCCCTTGTCTTGATTTGAA	
Porzines CTLA4	poCTLA4F	5' TGTACAGCTCTGTTTTCTCTTCTCT	[728]
	poCTLA4R	5' GTAGAGTCATCAAGGAAGGTCAACT	
Porzines Nod1	pNOD1-VII-F1	5' TAGGCTGCGTCCTGTTCA	[717]
	pNOD1-VII-R1	5' GGTGACCCTGACCGATGT	
Porzines Nod2	poNOD2ex3F3	5' GCAGCTGCAGGCAGCACACGTCG	IMT Walk
	pNOD2_ex3R	5' ATGACGGTGGCACGTCAGCACTG	IMT Tedin
Porzines PGLYRP-1	PGRPS1F1	5' ACCTGCGATAACCCGGCCTCA	diese Arbeit
	PGRPS1R1	5' AGCGTTGGCTGCACATCCCG	



Porzines PGRYRP-2A	poPGRP-LAF1	5' GTAGCCCAAAGCCACTGAAG	diese Arbeit
	poPGRP-LAR1	5' CCCTCGTACACGTAGCCATC	
Porzines PGLYRP-2B	pPGRPL2F2	5' AGCCCAGAGTTTCAAGGCCTGATT	[184]
	pPGRPL2R2	5' TCAGGAAGTGTGGCTCCAATGTCT	

**Tabelle 12: Primer, die zur Herstellung und Überprüfung der *Salmonella*-Mutanten im Rahmen der Mutagenese nach Wanner & Datsenko verwendet wurden.**

Ziel	Bezeichnung	Sequenz (5' →3')	Referenz
<i>kan</i> (pKD4)	k1 (pKD4)	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT	IMT Tedin
	k2 (pKD4)	5' CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
<i>znuA</i>	ZNUAF	5' TGAGACCGAGACGTTTTTCCA	
	ZNUAR	5' CAGATTATTAATGCCAGGG	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>znuA</i>	ZNUAH1P1	5' GTCGCTTCGCTTAAACCGCTTGGGTTTCATCG CTTCCGCCATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	
	ZNUAH2P2	5' AGCGGGCTATCTGTTGCACGTATTCCT TCCTCGTTAATCTCCCATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>znuB</i>	ZNUBF	5' TCATAATCATCGCCACGATT	
	ZNUBR	5' TCATCAGACCTGGGCGATT	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>znuB</i>	ZNUBH1P1	5' TACAGGGTCGTATTGTAAGTGCAGCCGGGGA AATGGTCACTCATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	
	ZNUBH2P2	5' GTAAGCGCAGCGCCACCGGGCAACACACG CTTAGCTTGCTGCATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>znuC</i>	ZNUCF	5' TGCTGCGAAAAGAAGCGTAT	
	ZNUCR	5' AAGGACCAGCGGCGCAGGCC	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>znuC</i>	ZNUCH1P1	5' ATTTTTCTGTAACATAATGCGACTAATC ATCGTAATGAATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA	
	ZNUCH2P2	5' CCAGCCAGCCGGGCAGTAATAATTCAA TCATGAGTGACCATTCATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>zirS</i>	1668F	5' AAATGCTAAGGGTAATACCG	
	1668R	5' ATCCATAATAAGATGATGGT	
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>zirS</i>	1668H1P1	5' GCAACCTCTGATGCGAATTAATGTTTTAAA AAGGATCAACAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCT TCGA	
	1668H2P2	5' GAATTATATTAGACATAATAATTAATATAGTT TTATAGTCTTCCCATATGAATATCCTCCTTAG	
<i>zirT</i>	1669F	5' TAAACATCTTATTTAAATAC	
	1669R	5' GCAGGCTATAGATAATAAGA	

<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>zirT</i>	1669H1P1	5'CTCCCTCTGCCAGGCAGGGGGATATAGCA GGAGACAATACAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC GA
	1669H2P2	5'TGTTGATCCTTTTTAAAACATTAATTCGCAT CAGAGGTTGCGGTCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>zur</i>	ZURF	5' AGTCTTAAGCAGCTCGTGGT
	ZURR	5'CCCTGTTTGCTTATGAATGC
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>zur</i>	ZURH1P1	5' AAAGTAACGGATTAGACTTTCATGCCATTC GAGGTGCTACATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	ZURH2P2	5' GCCCCTCTCTACTGCCGCCCGTTTTCCGT TCAGGCTAACGTGGCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>zraP</i>	ZRAPF	5' TAGTTACCTGGCACGGAAGA
	ZRAPR	5' GCAAGCGAAAAGCTTTTGAT
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>zraP</i>	ZRAPH1P1	5' TGCAAGAGAGAGGATAAGATGAGCAACAG GAGAACGCAAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG A
	ZRAPH2P2	5' ATGGCGAAGCCGCCATTCGGCAAACATGC TTTACCAGTTTCCCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>mntH</i>	MNTHF	5' TACCCATTGAAATGCACTTG
	MNTHR	5' GCCTCCTGCTGAATAACAGC
<i>kan</i> (pKD4) mit homologer Flanke zu <i>mntH</i>	MNTHH1P1	5' AGCATGAAACATAGCAAAGGCTATGTTTTT GAGGCAAAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGA
	MNTHH2P2	5' ATGACGCCACGCATCGGGCCTGCTATCT TTCTGTCTTTATGACATATGAATATCCTCCTTAG

## 2.5. Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Agar Agar	Roth, Karlsruhe, D
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Biotherm™ Taq DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin, D
Catalase (from bovine Liver)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
dNTP-Mix (2 mM)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol absolut (99 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, D
Fötale Kälberserum (FKS) HyClone	Perbio Science, Bonn, D
Glycerin ≥ 98 %, wasserfrei	Roth, Karlsruhe, D

## Material

---

Hefeextrakt, pulv.	Roth, Karlsruhe, D
Kanamycin	Biochrom, Berlin, D
Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK)	InvivoGen, San Diego, USA
LPS-SM ( <i>Salmonella</i> )	InvivoGen, San Diego, USA
LPS-EK ( <i>E. coli</i> )	InvivoGen, San Diego, USA
Lysozyme (from chicken egg white)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
MG-132	InvivoGen, San Diego, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin, D
Puromycin	Biochrom, Berlin, D
RNasin <sup>®</sup> RNase Inhibitor (40 u/µl)	Promega, Madison, USA
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden, D
Salzsäure (HCl, 37 %)	Roth, Karlsruhe, D
TRIS PUFFERAN <sup>®</sup> Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Biochrom, Berlin, D
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe, D
Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ , rekombinant, porzin)	Biochrom, Berlin, D
Wasser Rotisolv <sup>®</sup> (H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe, D
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## 2.6. Lösungen und Medien

Wasser:

Zur Herstellung der Lösungen und Medien wurde grundsätzlich bidestilliertes Wasser verwendet. Für RNA-Arbeiten wurde mit DEPC-behandeltes Wasser benutzt. Das bidestillierte Wasser wurde hierzu mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (v/v, DEPC) versetzt, kurz geschüttelt, über Nacht inkubiert und im Anschluss autoklaviert. Für die PCR-Reaktionen wurde ausschließlich Rotisolv<sup>®</sup>-Wasser (HPLC Gradient Grade, Roth) verwendet. Zur Sterilisation wurden die Lösungen und Medien für 20 Min. bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, thermolabilen Lösungen wurden durch Einmalfilter mit einer Porengröße von 0,45 bzw. 0,22 µm steril filtriert.

Allgemeine Lösungen:

1 x PBS	8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4 aus einer 10 x PBS-Lösung (Biochrom)
1M Tris-HCL	121,14 g/l Tris; pH 7,5 mit ca. 70 ml HCl (37 %) eingestellt

### Zellkulturmedien:

DMEM/Ham's F12	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)/HAM'S F-12 Salts (1:1); Biochrom, Berlin, D
Basal Iscove's	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Iscove's/IMDM); Biochrom, Berlin, D

### Nährmedien für die Bakteriologie:

Für die Arbeiten mit *S. enterica* wurde LB nach Lennox (1955), für Arbeiten mit *E. coli* oder *E. faecium* wurde LB nach Miller verwendet.

LB-Medium (nach Lennox)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
LB-Agar (nach Lennox)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar
LB-Medium (nach Miller)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar (nach Miller)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar

## 2.7. Kits

Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
CellTiter-96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega, Madison, USA
PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden, D
PAXgene Blood RNA Tubes	Becton Dickinson, USA
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
RNase-freies DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

## 2.8. Verbrauchsmaterialien

Chirurgisches Besteck	Roth, Karlsruhe, D
Halbmikroküvetten	Theodor Karow, Berlin, D
Kanülen Sterican® (Gr. 2)	B. Braun, Melsungen, D
Lysing Matrix B oder D	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Objektträger (76x26 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, D
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen (PP, 50 ml oder 15 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (braun, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (klar 1,5 ml oder 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (Stripette, 10 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, NL

## Material

---

Spritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen, D
Spritzenfilter (0,22 µm oder 0,45 µm Porengröße)	Roth, Karlsruhe, D
Verschlussfolie (RT qPCR) MicroAmp <sup>®</sup> Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> - oder 75 cm <sup>2</sup> - Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
24-well Zellkulturplatten (CellBIND <sup>®</sup> )	Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-well Mikrottestplatten (CellBIND <sup>®</sup> Surface, schwarz/weiß, klarer Boden)	Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-well Reaktionsplatte (RT qPCR) MicroAmp <sup>®</sup> Optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, D

### 2.9. Geräte

Absauger Vacuboy	neolab, Heidelberg, D
Halbautomatisches Absaugesystem	Integra Biosciences, Fernwald, D
Absaugpumpe N735 AN18	KNF Neuberger, Freiburg, D
Agarosegelelektrophoresekammer B1A oder GE-B2	AGS, Heidelberg, D
Autoklav Varioklav 500 EP-Z-MT-FA	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, D
FastPrep <sup>®</sup> -24 Instrument	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Feinwaage BP210S	Sartorius, Göttingen, D
Fotodrucker Geldokumentation P93E	Mitsubishi Electric, Ratingen, D
Geldokumentation UV-Transilluminator UVT 28 MP, Kamera E.A.S.Y. 429 K, Dokumentationssystem RM6	Herolab, Wiesloch, D
Grobwaage Kern 440-47N	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D
Inkubationsschränke CB150	Binder, Tutlingen, D
Koloniezählgerät 50971	Fisher Scientific, Schwerte, D
Luminometer Synergy <sup>™</sup> HT	Bio-Tek, Bad Friedrichshall, D
Magnetrührer Variomag Monotherm	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, D
Mehrkanalpipette mLINE	Biohit, Rosbach, D
NanoDrop 1000	peqLab, Erlangen, D
pH-Meter 740	Knick, Berlin, D
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Real-time PCR System StepOnePlus <sup>™</sup>	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Reinraumwerkbank LaminAir HB2448 und LB-48-C	Heraeus, Hanau, D
Reinstwassersystem Millipore Simplicity	Millipore, Schwalbach, D
Schüttelinkubator GFL3031	GFL, Burgwedel, D

Spektrophotometer Ultrospec 3000 pro	Amersham, Freiburg, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, D
Umkehrmikroskop Telval 31	Zeiss, Jena, D
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbäder Grant OLS 200	CLF Laborgeräte, Emersacker, D
D3006	GFL, Burgwedel, D
E-5	Julabo, Seelbach, D
Wippe Roto-Shake Genie	Scientific Industries, New York, USA
Zählkammer (Neubauer)	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifugen Rotina 46R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
3K30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D
5415D	Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf, D
Avanti J-25	Beckmann Coulter, Krefeld, D

### 2.10. Software

Citavi 3 Pro	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH
KC4™ Data Analysis Software Vers. 3.6	Bio-Tek, Bad Friedrichshall, D
Microsoft® Office Excel 2003/2010	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft® Office Powerpoint 2003/2010	Microsoft, Redmont, USA
Microsoft® Office Word 2003/2010	Microsoft, Redmont, USA
ND-1000 Vers. 3.6 (Nanodrop)	peqLab, Erlangen, D
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Erkrath, D
StepOne™ Software Vers. 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt, D

### 2.11. Studiendesign

Bei dieser Arbeit handelt es sich um ein Teilprojekt (B8) eines interdisziplinären Forschungsprojektes. Sie wurde im Rahmen des DFG-Sonderforschungsbereich SFB 852 „Ernährung und intestinale Mikrobiota – Wirtsinteraktion beim Schwein“ erstellt. Untersucht wurde zum einen der Einfluss des probiotischen Futterzusatzes *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415, Cyclactin®; Cerbios Pharma SA), zum anderen die Wirkung von Zinkoxid auf die angeborene Immunantwort im Schwein. Die Versuchstiere für die beiden Fütterungsversuche wurden im Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin gehalten und getötet. Die *Salmonella* challenge Versuche (*Salmonella* challenge *E. faecium* SF68; *Salmonella* challenge Zinkoxid) fanden am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) statt. Als Versuchstiere dienten Sauen der Rasse Deutsche Landrasse, die im Alter von 237 Tagen (Mittelwert) von Ebern der Deutschen Landrasse gedeckt wurden, und ihre Ferkel. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für

Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) genehmigt. Die Antragsnummern der verschiedenen Tierversuche sind in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13: Antragsnummern der in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche.**

Tierversuch	Antragsnummer
<i>Enterococcus faecium</i> SF68-Fütterungsversuch	G0347/09
<i>Salmonella</i> challenge <i>Enterococcus faecium</i> SF68-Versuch	G0348/09
Zinkoxid-Fütterungsversuch	G0347/09
<i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch	G0348/09

### 2.11.1. *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415)

Der in dieser Arbeit als Probiotikum verwendete *E. faecium* SF68 Stamm ist auch deklariert als NCIMB 10415 [729, 730]. *E. faecium* SF68 wurde unter dem Handelsnamen Cylactin<sup>®</sup> LBC ME10 von Cerbios-Pharma SA (Batch-Nr. AG0551, Barbengo, Schweiz) als Futterzusatz bezogen und den Diäten der Sauen, säugenden und abgesetzten Ferkeln in Form von Mikrokapseln bei einer Temperatur von 50 °C beigemischt. Die Konzentrationen lagen dabei zwischen 1 und 5 x 10<sup>9</sup> KbE/kg Futter. Für die *In-vitro*-Versuche wurde der *E. faecium* SF68-Stamm aus dem Futter-Zusatzstoff Cylactin<sup>®</sup> isoliert und routinemäßig auf LB-Miller angezogen. Neben dem probiotischen *E. faecium* wurde in dieser Arbeit für die *In-vitro*-Versuche auch ein pathogener *E. faecium*-Stamm (*E. faecium* TX0016, auch bekannt als *E. faecium* DO, ATCC<sup>®</sup> BAA-472<sup>™</sup>) verwendet [731]; [732]. Bei diesem pathogenen *E. faecium*-Stamm handelt es sich um ein humanes Isolat.

### 2.11.2. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104/Infektion der Versuchstiere mit *Salmonella*

Für die *Salmonella* challenge Tierversuche wurde eine gentechnisch veränderte Variante von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 (BB440) verwendet. Dieser Bakterienstamm ist eine nalidixinsäureresistente Variante von BB439. Die Nalidixinsäureresistenz wird für eine selektive Anzucht des Stammes verwendet. Der Wildtypstamm ist ein multiresistenter *S. typhimurium* Stamm (DT104), welcher aus Schweinen mit Sepsis am Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig isoliert wurde. Am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin) wurde die Nalidixinsäureresistenz zusätzlich eingefügt. Für die Infektionskultur wurde der *Salmonella*-Stamm einen Tag vor der Infektion der Tiere in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 1 ml der Starterkultur beimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD = 0,69 – 0,72 wachsen gelassen (entspricht in etwa 2 – 3 x 10<sup>9</sup> KbE/ml). Für die Infektion der Ferkel wurden 7 ml dieser Kultur (1,4 - 2,1 x 10<sup>10</sup> KbE insgesamt) verwendet. Die Tiere wurden

sediert und per Magenschlundsonde mit der vorbereiteten Bakteriensuspension infiziert. Weitere Details sind in den Veröffentlichungen von Szabó *et al.* (2009) und Kreuzer *et al.* (2012) beschrieben [22, 733].

### **2.11.3. *Enterococcus faecium* SF68-Fütterungsversuch**

Für diesen Versuch wurden die Sauen zunächst zufällig in eine Kontrollgruppe (N = 13) und eine *E. faecium* SF68-Versuchsgruppe (N = 12) aufgeteilt. Die Sauen der beiden Gruppen wurden unter gleichen Bedingungen in zwei separaten Gebäuden gehalten. So konnte ein Transfer des probiotischen Bakteriums zwischen den Gruppen vermieden werden. Die tragenden Sauen wurden bis sieben Tage vor dem erwarteten Geburtstermin in Gruppen und anschließend bis zum Absetzen der Ferkel im Alter von 28 Tagen ( $26 \pm 2$  d) in Einzelboxen gehalten. Alle Ferkel wurden einmal in der Woche gewogen und ihre gesundheitliche Verfassung regelmäßig überprüft. Nach dem Absetzen wurden die Ferkel bis zum Alter von 56 Tagen in Zweiergruppen gehalten. Auch die Ferkel der Kontroll- bzw. Probiotikagruppe wurden in unterschiedlichen Gebäuden gehalten. Die Futterraufnahme pro Laufstall und das Gewicht der einzelnen Ferkel wurden wöchentlich bestimmt. Die Tiere wurden nicht geimpft oder mit Antibiotika behandelt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Versuchsdiäten:

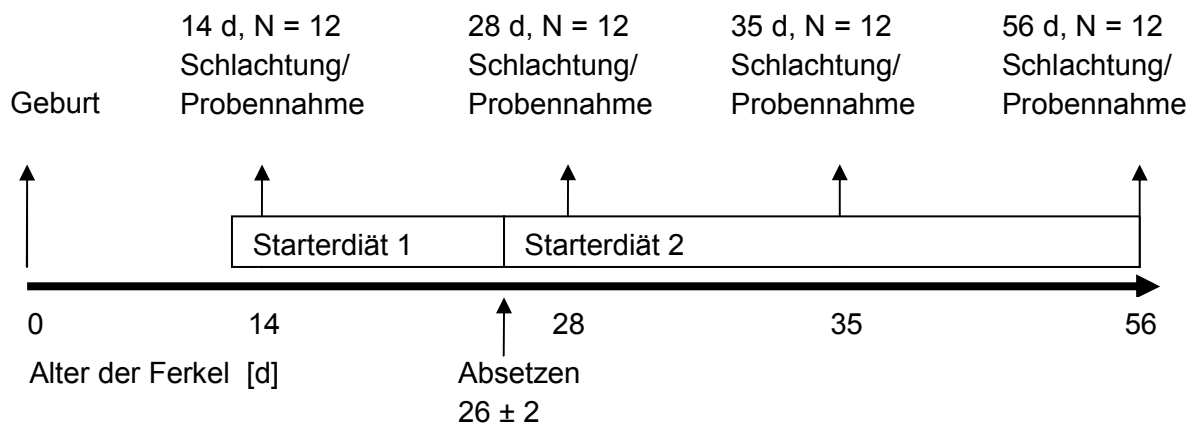
Die verwendeten Grundfutter der Sauen wurden nach deutschen Richtlinien zusammengestellt (GfE, 2006) und von einem kommerziellen Futterhersteller (UNA-HAKRA GmbH, Hamburg) bezogen. Der probiotische Bakterienstamm wurde in einer Konzentration von  $4,3 \times 10^6$  KbE/g in die Diät der tragenden Sauen und in einer Konzentration von  $4,2 \times 10^6$  KbE/g in die Diät der laktierende Sauen gemischt. Auf das Futter mit probiotischem Zusatz wurde 28 Tage vor der Geburt der Ferkel umgestellt und es wurde bis zum Absetzen beibehalten. Ab dem 12. Lebenstag hatten die Ferkel Zugang zu einer Starterdiät (Starterdiät 1), welche auf die Bedürfnisse von Ferkeln mit einem Körpergewicht von 5 – 10 kg ausgerichtet ist (GfE, 2006). Nach dem Absetzen bekamen die Ferkel bis zum Alter von 56 Tagen eine zweite Starterdiät (Starterdiät 2). Die Starterdiäten der Ferkel aus der Probiotikagruppe enthielten  $5,1 \times 10^6$  KbE/g (Starterdiät 1) bzw.  $3,6 \times 10^6$  KbE/g (Starterdiät 2) *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415, Cyclactin<sup>®</sup>; Cerbios Pharma SA). Die Tiere wurden zweimal täglich gefüttert und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

Schlachtung/Probennahme:

Im Alter von 14 bzw. 28 Tagen (vor dem Absetzen) und im Alter von 35 bzw. 56 Tagen (nach dem Absetzen) wurden sechs Ferkel pro Gruppe getötet und die Blut- und Gewebeproben entnommen. Die Sedierung erfolgte mit 25 mg/kg KG Ketamin (Ursotamin<sup>®</sup>, Serumwerk Bernburg) und 2 mg/kg KG Azaperon (Stresnil<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH). Das Blut wurde



mittels Herz-Einstichs entnommen und die Ferkel sofort mit 60 mg/kg KG Embutramid (T61<sup>®</sup>, Intervet) eingeschläfert. Innerhalb dieses Tierversuches wurden Proben aus folgenden Geweben gesammelt: den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten, Milz, Leber und mesenteriale jejunale Lymphknoten. Die Proben wurden sofort in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) transferiert und nach dem Transport zum Institut für Mikrobiologie und Tiersuchen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Das Blut wurde direkt in Gefäße appliziert, welche ein RNA-stabilisierendes Reagenz enthielten (PAXgene RNA Blood Tubes, Becton-Dickenson) und mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden die Röhrchen ebenfalls bei -20 °C eingefroren.



Entnommene Proben:

ileale und jejunale Peyer'sche Platten, mesenteriale Lymphknoten, Milz, Leber, Blut

**Abbildung 5: Übersicht über den Versuchsaufbau des *Enterococcus faecium* SF68-Fütterungsversuches.**

#### 2.11.4. *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch

Für den *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch wurden die Ferkel nach dem Absetzen, im Alter von 28 Tagen, an das Bundesinstitut für Risikobewertung transportiert. Dort wurden die Tiere unter Berücksichtigung des Geschlechts zufällig in eine Kontroll- (N = 16) und eine Probiotikagruppe (N = 16) aufgeteilt. Nach zehntägiger Akklimatisierung, im Alter von 35 Tagen, wurden die Ferkel mit Hilfe einer Magenschlundsonde mit *S. Typhimurium* DT104 infiziert (siehe Abschnitt 2.11.2). Zwei Tage nach der Infektion (2 d *post-infectionem*, 2 d *p. i.*) wurden sechs Ferkel aus jeder Gruppe und 28 d *p. i.* wurden zehn Ferkel pro Gruppe getötet. Neben Blutproben wurden auch Gewebeproben aus den jejunalen und ilealen Peyer'schen Platten, Milz und Leber sowie mesenteriale jejunale Lymphknoten entnommen. Mit den Proben wurde wie in 2.11.3 beschrieben verfahren.

#### 2.11.5. Zinkoxid-Fütterungsversuch

Für diesen Tierversuch dienten 48 Ferkel der Rasse Deutsche Landrasse als Versuchstiere. Sie wurden im Alter von 26 ± 1 Tag abgesetzt und hatten im Mittel ein Körpergewicht von 7,2 ± 1,2 kg. Die Ferkel wurden zufällig unter Einbezug des Geschlechts in drei

Versuchsgruppen (50, 150 und 2500 mg Zinkoxid/kg Futter) aufgeteilt und in Zweiergruppen gehalten.

Versuchsdiäten:

Ab dem 12. Lebenstag hatten die Ferkel Zugang zur Starterdiät 1 (siehe 2.11.3). Nach dem Absetzen erhielten die Ferkel die Starterdiät 2 (siehe 2.11.3). Beide Starterdiäten wurden im Institut für Tierernährung, FU Berlin, zusammen gemischt. Das Zinklevel der Starterdiäten wurde auf ca. 50, 150 oder 2500 mg/kg Futter eingestellt. Die genauen Zinkoxid-Konzentrationen wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Sie lagen bei 57, 164 und 2425 mg ZnO/kg Futter. Die in den Starterdiäten enthaltene Maisstärke wurde je nach Versuchsgruppe durch solche mit entsprechender Zinkoxid-Konzentration ersetzt. Das für diesen Versuch verwendete Zinkoxid wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

Schlachtung/Probennahme:

Je acht Tiere pro Gruppe wurden im Alter von  $32 \pm 1$  und  $53 \pm 1$  Tagen getötet und die Gewebeproben entnommen. Die Sedierung und das Einschläfern der Ferkel erfolgten wie unter 2.11.3 beschrieben. Neben den Blutproben (PAXgene Blood Tubes) wurden Gewebeproben aus den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten, der Milz sowie jejunale Lymphknoten entnommen. Mit den Proben wurde wie in 2.11.3 beschrieben verfahren.

### **2.11.6. *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch**

Als Versuchstiere dienten Ferkel der Rasse Deutsche Landrasse (N = 72). Die Ferkel wurden im Alter von 28 Tagen abgesetzt und ans Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) transportiert. Dort wurden die Tiere zufällig in drei Versuchsgruppen aufgeteilt und in Vierergruppen eingestallt. Als Versuchsdiät wurde ein übliches Mais-Weizen-Gerste-Sojabohnen-Gemisch mit drei unterschiedlichen Zinkoxidkonzentrationen (50, 150 und 2500 mg ZnO/kg Futter) verwendet. Ab dem Absetzen wurden die Ferkel zweimal täglich mit einer Mischung aus Wasser und Versuchsdiät gefüttert. Nach vier Tagen Akklimatisierung im BfR wurden alle Ferkel im Alter von 32 Tagen mittels Magenschlundsonde mit *S. Typhimurium* DT104 (siehe 2.11.2) infiziert. Zwei Tage nach der Infektion (2 d *p. i.*) wurden zwölf Ferkel je Gruppe zunächst mit Azoperon und Ketamin betäubt (siehe auch Abschnitt 2.11.3), anschließend mit einer Überdosis Narcoren (Pentobarbiturat, Merial GmbH) getötet. Wiederrum zwölf Ferkel je Versuchsgruppe wurden sechs Wochen nach der Infektion mit *S. Typhimurium* DT104 (42 d *p. i.*) getötet. Während der Schlachtungen wurden Gewebeproben aus den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten, der Milz sowie mesenteriale jejunale Lymphknoten entnommen und in RNAlater gegeben. Das Blut wurde direkt in PAXgene Blood Tubes gefüllt und 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Alle Proben wurden langfristig bei -20 °C eingefroren.

### 3. Methoden

#### 3.1. Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1. Bakterienkultur

Für die Versuche wurden die Bakterienstämme immer direkt aus dem Kryostock (-80 °C) auf entsprechende LB-Agarplatten überimpft und über Nacht (ca. 16 Stunden für *Salmonella*, *E. coli* und *Staphylococcus aureus* und ca. 20 Stunden für *Enterococcus faecium*) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 – 4 Kolonien für *Salmonella*, *E. coli* und *Staphylococcus aureus* in LB-Bouillon angeimpft. Zur selektiven Anzucht von Mutanten wurde 50 µg/ml Kanamycin zur LB-Bouillon hinzugefügt. Für die Enterokokken wurden ca. 20 Kolonien zum Animpfen benötigt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Bakterienstämme wurde das Volumen der LB-Bouillon angepasst. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm. Für die verschiedenen *Salmonella*-Stämme erfolgte dies bis zu einer optischen Dichte von 2,0 – 3,0 bei  $\lambda = 600$  nm ( $OD_{600}$ ), für die *E. coli*- und *Staphylococcus*-Stämme bis zu einer  $OD_{600} = 1$  und für die *Enterococcus faecium*-Stämme bis zu einer  $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ .

##### 3.1.2. Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Für eine langfristige Lagerung der verschiedenen Bakterienstämme wurde 1 ml einer Flüssigkultur in der spät-exponentiellen Phase ( $OD > 2,5$ ) mit 300 µl 80 % Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren und gelagert.

##### 3.1.3. Bakterienzellzahlbestimmung für Infektionsversuche

Für die Ermittlung der Bakteriendichte im LB-Bouillon wurde 1 ml der Flüssigkultur in ein Eppendorfgesäß überführt und die Bakterien bei 16100 x g und Raumtemperatur 5 Min. pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 1 ml des entsprechenden Zellkulturmediums (je nach den verwendeten Wirtszellen DMEM/Ham's oder Iscove's) resuspendiert. Die optische Dichte einer 1:20 Verdünnung wurde photometrisch bei  $OD = 600$  bestimmt. Durch Messen der  $OD_{600}$  und paralleles Ausplattieren auf LB-Agarplatten wurde in der Arbeitsgruppe ermittelt, dass eine Flüssigkultur von *Salmonella enterica enterica* bei einer  $OD_{600} = 1$  ungefähr  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml enthielt. Die Bakteriendichte  $n$  ließ sich demnach wie folgt bestimmen:

$$n = 1 \times 10^9 \text{ Bakterien / ml} / OD_{600} \times OD_{600} \times 20$$

Für die verwendeten *Enterococcus*-Stämme wurde ermittelt, dass eine Flüssigkultur bei einer  $OD_{600} = 0,6$  in etwa  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml enthielt und eine Flüssigkultur der *E. coli*- und *Staphylococcus*-Stämme bei einer  $OD_{600} = 1$  ungefähr  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml. Zur exakten

Ermittlung der Bakterienzellzahl pro Milliliter wurden parallel zur photometrischen OD-Messung Verdünnungen der Ausgangssuspension in 150 mM NaCl erstellt und auf fünf LB-Agarplatten je 100 µl ausplattiert. Die Platten wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) gezählt. Die Bakterienzellzahl/ml der Ausgangskonzentration wurde wie folgt ermittelt:

Bakterienzellzahl / ml = Mittelwert LB-Platten x Verdünnungsfaktor

### 3.1.4. Mutagenese nach Wanner und Datsenko

Für die Deletion ausgewählter Gene in *Salmonella* wurde die ortsspezifische Mutagenese nach Wanner und Datsenko verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand des Protokolls [722]. Die Deletion des Zielgens und das Einfügen der Kanamycin-Kassette wurde zunächst in *S. Typhimurium* LT2 erstellt und anschließend mit Hilfe eines *Salmonella*-spezifischen Bakteriophagen P22 in den Stamm SL1344 überführt. Die Kanamycin-Resistenzkassette wurde mittels PCR aus dem Plasmid pKD4, unter Verwendung spezifischer Primer-Paare (siehe Tabelle 12; Primer für *znuA* z. B. ZNUAH2P1, ZNUAH2P2) amplifiziert, die komplementäre 5' bzw. 3'-Überhänge zu Sequenzen des zu deletierenden Gens besaßen. Die Kanamycin-Resistenzkassette, welche von FRT (*flp recognition sites*) flankiert ist, kann später durch die FLP-Rekombinase eines Helferplasmids pCP20 [723] entfernt werden. Das pCP20 Helferplasmid ist temperatursensitiv und kann nach Temperaturerhöhung auf ca. 37 – 43 °C wieder aus den Bakterien entfernt werden. Nachdem das pCP20 Helferplasmid mittels Elektroporation in den Kanamycin-resistenten Deletionsstamm eingeschleust wurde, kommt es bei einer Plattierung auf LB-Platten ohne Kanamycin-Zusatz und nachfolgender Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C zu einer Inaktivierung des *ci857* Proteins, der  $\lambda$  P<sub>L</sub> Promotor wird aktiviert und die FLP-Rekombinase exprimiert. Die FLP-Rekombinase entfernt die DNA-Sequenz zwischen den beiden FRT Sequenzen (Kanamycin-Kassette) und das Plasmid geht verloren. So konnte ortsspezifisch ein ganz bestimmtes Gen im Bakterium deletiert werden.

### 3.1.5. Zellfreie Bakterienlysate

Zur Herstellung der zellfreien Lysate wurden die Bakterien am Vortag auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Lysate wurden die Bakterien direkt von der Platte verwendet und in 50 mM Tris HCl, pH 7,5 resuspendiert. Die optische Dichte einer 1:20 Verdünnung der Bakteriensuspension wurde bei  $\lambda = 460$  nm (OD<sub>460</sub>) photometrisch bestimmt. Die Suspension wurde für die *Enterococcus*-Stämme auf eine OD von 0,7 – 0,8 eingestellt und für die *E. coli* und *Staphylococcus*-Stämme auf eine OD = 1 – 1,3, was in etwa 10<sup>9</sup> Bakterien/ml entspricht. Die Bakteriensuspension wurde anschließend in Lysing Matrix B-Röhrchen transferiert (0,1 mm Silika-Kugeln, MP Biomedicals). Die Lyse erfolgte mittels eines Fast-Prep<sup>®</sup> 24-Instrumentes (MP Biomedicals)

durch zweimaliges Schütteln für jeweils 40 s bei 6 m/s. Die entstandenen Lysate wurden in neue, sterile Eppendorfgefäße überführt und ein zweites Mal die optische Dichte bei  $\lambda = 460$  nm bestimmt. Die Differenz zwischen der optischen Dichte vor und nach der Lyse entspricht der Bakterienzahl, die tatsächlich lysiert wurden und so konnte ein OD- oder KbE-Äquivalent festgesetzt werden. Die Lysate entsprechen also einem bestimmten OD-Wert, welcher in KbE umgerechnet werden kann. Im Anschluss wurden die Lysate unter Verwendung eines 0,22  $\mu\text{m}$  Filters steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Die zellfreien Lysate wurden für die Zellkulturversuche in entsprechendem Zellkulturmedium, je nach verwendeter Zelllinie, bis zu den Konzentrationen  $1 \times 10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$  Bakterien/ml verdünnt. In den zellfreien Bakterienlysaten sind keine Bakterienkulturüberstände mehr vorhanden, nur Zellwand- und intrazelluläre Bestandteile.

### **3.1.5.1. Hitzeinaktivierung der zellfreien Bakterienlysate**

Für die Hitzeinaktivierung der zellfreien Bakterienlysate von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 wurden die Lysate 5 bzw. 30 Min. bei 99 °C auf einem Thermomixer (Eppendorf) gekocht. Anschließend wurden die Lysate bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.1.5.2. Proteinase K-Behandlung der zellfreien Bakterienlysate bzw. der intakten Bakterien**

Zur Behandlung der zellfreien Bakterienlysate von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 mit Proteinase K wurden 1,25 g Proteinase K (Qiagen)/ml Lysat verwendet und die Lysate für eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer mit Proteinase K inkubiert. Teilweise erfolgte anschließend eine Inaktivierung der Proteinase K mittels Hitze für 30 Min. bei 99 °C im Thermomixer. Die Lysate wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Behandlung der intakten, lebenden *E. faecium* mit Proteinase K wurde zunächst eine Bakteriensuspension mit Kolonien, die direkt von der Platte gepickt wurden, erstellt. Die  $\text{OD}_{460}$  dieser Suspension lag zwischen 0,7 und 0,8 (entspricht  $10^9$  Bakterien/ml). Auch hier wurden 1,25 g Proteinase K/ml Bakteriensuspension verwendet und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Bakteriensuspensionen in Fast-Prep-Röhrchen überführt und wie in 3.1.5 beschrieben weiter verfahren. Teilweise erfolgte nach der Lyse noch eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K und damit auch der im Lysat enthaltenen Proteine.

### **3.1.5.3. Herstellung Gentamycin-abgetöteter *E. faecium* SF68-Suspensionen**

Die Bakterien wurden hierfür einen Tag vor der Herstellung der Suspensionen auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 15 – 20 Kolonien in 5 ml LB-Bouillon angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,7 – 0,8 im Schüttelinkubator bei 37 °C angezogen. Die optische Dichte wurde bei  $\lambda = 600$  nm in LB-Bouillon bestimmt und anschließend 200  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin zur

Bakteriensuspension hinzugefügt. Die Bakteriensuspension wurde eine weitere Stunde bei 37 °C geschüttelt und ein zweites Mal die OD<sub>460</sub> ermittelt, um sicher zu gehen, dass die Bakterien nicht mehr wachsen. Von der Bakteriensuspension wurden Verdünnungen gemacht ( $1 \times 10^8$  –  $1 \times 10^6$  Bakterien/ml) und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

### **3.2. Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1. Kultur und Subkultivierung eukaryotischer Zellen**

In dieser Arbeit wurde sowohl mit Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, PLN/C2, THP-1) als auch mit Epithelzellen (IPEC-J2, LoVo) gearbeitet. Die Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen wurden in Basal Iscove's Medium mit 10 % FKS und die Epithelzellen in DMEM/Ham's F12 Medium mit 10 % FKS angezogen. Das FKS wurde vor der Verwendung mindestens 30 Min. bei 56 °C inaktiviert, um z. B. hitzeempfindliche Komplement-Proteine zu zerstören und so Komplement-Reaktionen zu verhindern. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. Eine Passage der Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:100 erfolgte alle vier bis sieben Tage. Dafür wurde das Zellkulturmedium zunächst mit Hilfe einer an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt. Der Zellrasen wurde anschließend zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 5 ml einer 0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA-Lösung hinzugegeben, um die Zell-Matrix und die Zell-Zell-Kontakte proteolytisch zu spalten. Es wurde für etwa 5 – 10 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um die zellschädigende Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung zu lindern, wurden die Zellen nach dem Abspülen vom Flaschenboden in ein 15 ml Falcon mit 5 ml des jeweiligen Zellkulturmediums (Iscove's oder DMEM mit 10 % FKS) gegeben. Die Zellen wurden für 5 Min. bei 155 x g, Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 1:10 bis 1:100 verdünnt in eine neue 25 cm<sup>2</sup>-Flasche mit 5 ml Medium (Iscove's oder DMEM + 10 % FKS) so eingesät, dass sie nach einer bestimmten Wachstumszeit wieder eine konfluente Zellschicht bildeten. Für die verschiedenen Infektions-, Bakterienlysat-, Zellviabilitäts-, Zellvitalitäts- und Zytotoxizitätsversuche wurden die Zellen in 24- bzw. 96-well Platten eingesät.

#### **3.2.2. Zellzahlbestimmung**

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension wurde die Neubauer Zählkammer verwendet. Dazu wurde zunächst eine 1:10 bzw. 1:100 Verdünnung der Suspension in Zellkulturmedium erstellt und 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Es wurden die Zellen in den vier Eckquadraten gezählt. Der Mittelwert wurde gebildet und mit Kammerfaktor ( $1 \times 10^4$

Zellen/ml) und Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Zelldichte (Zellen/ml) in der Ausgangssuspension zu ermitteln.

### **3.2.3. Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen**

Für eine langfristige Lagerung der verschiedenen Zelllinien wurden in unterschiedlichen Zeitabständen Zellen eingefroren (je nach Verwendung der Zelllinie 3 – 4 x im Jahr). Dies geschah am Ende einer Subkultivierung. Je 1 ml der Zellsuspension wurden mit 100 µl DMSO gemischt (nur mit der Pipette) und in Kryoröhrchen zunächst bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt (-196 °C). Für das Auftauen der Zellen wurde ein 37 °C warmes Wasserbad verwendet. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in eine mit 5 ml warmem Zellkulturmedium vorbereitete 25 cm<sup>2</sup>-Flasche gegeben und bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **3.2.4. Gentamycin-Protection-Assay/Infektionsversuch**

Der Infektionsversuch oder auch Gentamycin-Protection-Assay wurde dazu verwendet, die Invasionsraten und die intrazelluläre Persistenz der verschiedenen *Salmonella*-Stämme in den Wirtszellen zu bestimmen. Die eukaryotischen Zellen wurden in 24- bzw. 96-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz angezogen. Am Vortag der Infektion wurden die Bakterienstämme auf LB-Agarplatten (teilweise mit Antibiotikum zur Selektion) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für die Infektion wurden die verschiedenen Bakterienstämme am Tag der Infektion als Flüssigkultur bis zu einer OD zwischen 2,0 und 2,5 angezogen. Bei den eukaryotischen Zellen wurde am Morgen, mindestens aber 1 Std. vor der Infektion, das Kulturmedium (Iscove's bzw. DMEM mit 10 % FKS) gegen frisches, 37 °C warmes Medium gewechselt (500 µl/well für die 24-well Platten; 50 µl/well für die 96-well Platten). Die ungefähre Bakterienzah/ml in der Ausgangssuspension wurde ermittelt und auf  $1 \times 10^9$  Bakterien/ml eingestellt. Ausgehend von dieser Bakteriensuspension wurde in Verdünnungsschritten von 1:10 die für den Infektionsversuch benötigte Bakteriendichte hergestellt. So kann ein bestimmtes, definiertes Bakterien/Wirtszellverhältnis (*multiplicity of infection*, MOI) sichergestellt werden. Von den so eingestellten Bakteriensuspensionen wurden 100 µl/well auf die Zellen pipettiert. Für die unifizierten Proben wurde anstelle der Bakteriensuspensionen 100 µl Kulturmedium/well verwendet. Zur tatsächlichen Bestimmung der eingesetzten Bakterienzahl wurden weitere Verdünnungen der Bakteriensuspension hergestellt und je Bakterienstamm auf fünf LB-Agarplatten 100 µl ausplattiert, über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und am Folgetag ausgezählt.

Die infizierten Platten wurden direkt nach der Infektion für 10 Min. bei 250 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, um zu erreichen, dass die Bakterien direkt auf den konfluenten Zellrasen gelangen; und so eine gleichzeitige Infektion sicherzustellen. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank

inkubiert. Nach 60 Min. wurde das Kulturmedium gegen warmes Medium mit 50 µg/ml Gentamycin gewechselt. Die verbliebenen extrazellulären Bakterien wurden so abgetötet. Nach weiteren 60 Min. Inkubation wurde ein zweites Mal das Medium gegen Kulturmedium mit 10 µg/ml Gentamycin gewechselt, um sicherzustellen, dass wieder freigesetzte Bakterien auch während der Inkubation über Nacht abgetötet werden.

Die intrazelluläre Keimzahl wurde 2, 4 und 24 Stunden nach der Infektion ermittelt. Dazu wurden die betreffenden wells zunächst mit PBS gewaschen (500 µl für die 24-well Platten bzw. 100 µl für die 96-well Platten) und die eukaryotischen Zellen durch Zugabe von 0,1 % Triton X-100 lysiert (500 µl für die 24-well Platten bzw. 100 µl für die 96-well Platten). Abhängig von der zu erwartenden Keimzahl wurden die Lysate in 150 mM NaCl-Lösung 1:10 bis 1:10.000 verdünnt und je 100 µl der Verdünnung auf fünf LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 30 °C inkubiert und am Folgetag die Zahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Unter Einbeziehung des jeweiligen Verdünnungsfaktors kann die Zahl der intrazellulären Bakterien pro ml Lysat ermittelt werden. Zur Untersuchung des Einflusses von Zink auf die Invasionsrate und das intrazelluläre Überleben der *Salmonella*-Mutanten wurden die Zellen auf unterschiedliche Weise mit Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) bzw. Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ ) behandelt. Für die Behandlung der Zellen wurde das jeweilige Zellkulturmedium mit 0,5 mM bzw. 1 mM Zinksulfat oder -chlorid versetzt. Als Stocklösung diente jeweils eine 1 M Lösung, deren exakte Konzentration durch eine Atomabsorptionsspektroskopie-Messung ermittelt wurde. Die Zellen wurden entweder zwei Stunden lang mit dem Zellkulturmedium mit entsprechendem Zinkzusatz vorbehandelt und anschließend mit *Salmonella* infiziert oder die Zinkbehandlung fand parallel mit der *Salmonella*-Infektion statt. Außerdem wurden die Zellen in einer weiteren Versuchsreihe erst zwei Stunden nach der Infektion mit den *Salmonella*-Mutanten mit dem Zellkulturmedium plus Zinkzusatz behandelt.

Der Aufbau des Gentamycin-Protection-Assays diente als Grundlage für die NF-κB-Aktivierungsassays, verschiedene Zellviabilitäts-, Zellvitalitäts- und Zytotoxizitätsmessungen.

**Tabelle 14: Übersicht über die für die verschiedenen Assays verwendeten MOIs.**

Versuch	Plattentyp	MOI	eingesetzte Bakteriendichte
Gentamycin-Protection-Assay	24-well	0,2 – 1 bzw. 2 – 10	$1 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^7/\text{ml}$
Gentamycin-Protection-Assay	96-well	2 – 10 bzw. 20 – 100	$1 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^7/\text{ml}$
NF-κB-Aktivierungsassay	96-well	2 – 10 bzw. 20 – 100	$1 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^7/\text{ml}$
Zellviabilitäts-Zellvitalitäts- und Zytotoxizitätsassay	96-well	2 – 10 bzw. 20 – 100	$1 \times 10^6/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^7/\text{ml}$



### 3.2.5. Herstellung von NF- $\kappa$ B-Reporterzelllinien

Um die NF- $\kappa$ B-Aktivierung *in vitro* untersuchen zu können, wurden lentivirale Vektoren zur Integration eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Luziferase Reporterkonstruktes in das Wirtszellgenom verwendet. Die Transduktion der eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe eines Cignal™ Lenti NF- $\kappa$ B Reporter Systems von S.A. Biosciences durchgeführt. Stabile NF- $\kappa$ B-Reporterzelllinien konnten so hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Reporterzelllinien von PLN/C2 und Caco-2, einer humanen epithelialen Zelllinie erstellt. Beim Cignal™ Lenti NF- $\kappa$ B Reporter System handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Kit, welches lentivirale, replikationsunfähige Partikel enthält. Das Reporterkonstrukt beinhaltet neben dem Reporter-Gen (Luziferase) ein TRE (*transcription responsive element*), welches hintereinander folgende Wiederholungen einer NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle enthält. Des Weiteren besitzt der Vektor einen eukaryotischen Promotor (hPGK) und ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion. Für die Transduktion wurden die Zellen zunächst in 96-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 60 – 80 % bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl im well bestimmt (siehe Zellzahlbestimmung 3.2.2), um die Menge an einzusetzenden lentiviralen Partikel bestimmen zu können. Die Zellen wurden mit einer MOI von 10 – 50 (Viren/Wirtszelle) infiziert. Dazu wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und das ermittelte Volumen der Virusstocklösung hinzugefügt. Im Anschluss wurden die wells bis zu einem Endvolumen von 50  $\mu$ l mit frischem Zellkulturmedium (Iscove's oder DMEM + 10 % FKS) aufgefüllt. Während der nun folgenden Inkubation über 20 Stunden im Brutschrank erfolgte die Transduktion der Wirtszellen. Am nächsten Tag wurde das Transduktionsmedium entfernt und gegen 100  $\mu$ l/well frisches Zellkulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden über weitere zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Danach wurde das alte Zellkulturmedium gegen Medium mit 5  $\mu$ g/ml Puromycin getauscht. So erfolgte die Selektion der transduzierten Zellen. Zellen ohne Puromycin-Resistenz wurden abgetötet und eine homogene Population transduzierter Zellen erhalten. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit je 100  $\mu$ l PBS/well gewaschen, anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l 0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA-Lösung/well. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert (5 Min., 200 g) und nach dem Resuspendieren in 100  $\mu$ l Medium in die Zellkulturflasche gegeben und dort wieder bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach der Passage (siehe 3.2.1) wurden die Zellen zunächst als „Mischkultur“ in Kyroröhrchen zur langfristigen Lagerung eingefroren (siehe 3.2.3). Um aus der „Mischkultur“ Einzelklone anzuziehen, wurden die transduzierten Zellen in einer 96-well Platte so ausgesät, dass je 20  $\mu$ l der Zellsuspension in 10 wells pipettiert und auf 100  $\mu$ l mit dem jeweiligen Zellkulturmedium aufgefüllt wurden. Diese Zellen wurden in der Platte zehnmal in Schritten von 1:20 weiter verdünnt (ergibt 10 Einzelklone). Die Zellen wurden nun im Brutschrank solange inkubiert, bis auch im letzten well der zehn

Verdünnungsreihen ein Klon konfluent angewachsen war. Die Klone wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen überführt (s. o.) und weiterhin in Puromycin-Medium kultiviert. Klone, die sehr langsam wuchsen, also ein Wachstumsdefizit aufwiesen, wurden verworfen. Die restlichen Klone wurden in Bezug auf ihre Reporterfunktion hin getestet, um 2 – 3 Einzelklone zu isolieren, die besonders geeignet waren für die nachfolgenden NF-κB-Aktivierungsassays. Für diese Tests wurden die Zellen, wie unter 3.2.4 (Gentamycin-Protection-Assay) beschrieben, mit 1 x 10<sup>6</sup> S. Typhimurium SL1344/ml infiziert. Die NF-κB-Aktivierung wurde 4 und 24 Stunden nach der *Salmonella*-Infektion gemessen. Das Verhältnis der NF-κB-Aktivierung in den infizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen wurde bestimmt und 2 – 3 Klone mit den besten Differenzen ausgewählt. Diese Klone wurden für die nachfolgenden NF-κB-Aktivierungsassays zur Überprüfung des Einflusses von *E. faecium* bzw. Zink auf die NF-κB-Aktivierung verwendet. Die permanenten 3D4/31-, IPEC-J2-, THP-1 und LoVo-Reporterzelllinien wurden in der Arbeitsgruppe IZM des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen hergestellt und etabliert und standen für Versuche zur NF-κB-Aktivierung zur Verfügung.

### **3.2.6. NF-κB-Aktivierungsassay**

Zur Untersuchung der Aktivierung von NF-κB *in vitro*, wurden NF-κB-Reporterzelllinien verwendet (Herstellung der Reporterzelllinien siehe 3.2.5). Mit Hilfe der NF-κB-Aktivierungsassays konnten die Effekte von lebenden bzw. abgetöteten (z. B. durch Gentamycin) *E. faecium* auf die Aktivierung von NF-κB bzw. die durch *Salmonella* oder andere bakterielle Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, z. B. LPS) ausgelöste NF-κB-Aktivierung detektiert werden. Der NF-κB-Aktivierungsassay dient auch als Grundlage für die Bakterienlysatversuche. Des Weiteren wurde die NF-κB-Aktivierung infolge einer Infektion mit verschiedenen *Salmonella*-Mutanten untersucht. Auch der Einfluss von Zink auf die durch die *Salmonella*-Mutanten ausgelöste NF-κB-Aktivierung wurde detektiert. Grundlage der Messung ist das NF-κB responsive element, welches wie oben erwähnt Bindungsstellen für NF-κB besitzt. Nach Bindung von NF-κB wird die Transkription einer Firefly-Luziferase ausgelöst, deren Aktivität sich mit Hilfe des Bright-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Systems (Luziferase-Substrat, Promega) und dem Luminometer Synergy<sup>TM</sup> HT nach der Lyse der Zellen messen lässt.

Für die Messung der NF-κB-Aktivierung, indirekt durch die Messung der Luziferase-Aktivität, wurde das Volumen der zu messenden wells zunächst auf 25 µl reduziert und die gleiche Menge an Bright-Glo<sup>TM</sup> Luziferase Reagenz hinzugegeben. Anschließend wurden alle Luftblasen entfernt und 10 s auf einem Plattenschüttler gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zunächst eine Testmessung durchgeführt, um die Sensitivität (optimale Verstärkung des Signals) festzulegen, nach fünf Minuten erfolgte die

eigentliche Messung der Chemilumineszenz, welche als *relative light units* (RLU) ausgegeben wird. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte im Dunkeln.

Parallel zur Untersuchung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde teilweise eine weitere 96-well Platte eingesät, um die intrazelluläre Keimzahl bestimmen zu können. Jeweils zwei wells pro Behandlungsvariante und Zeitpunkt wurden entsprechend eines Gentamycin-Protection-Assays (siehe 3.2.4) infiziert. Die Probennahme erfolgte 2, 4 und 24 Stunden nach der Infektion. Die Bestimmung der intrazellulären Keimzahl erfolgte wie in 3.2.4. beschrieben.

Für die *In-vitro*-NF- $\kappa$ B-Aktivierungsassays wurden die Zellen in je vier wells pro Behandlungsvariante und Zeitpunkt einer 96-well Platte (CellBIND<sup>®</sup> Surface, weiß, Corning) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Am Versuchstag wurde mindestens eine Stunde vor der Infektion das Medium in der ganzen Platte gegen frisches Medium ohne Puromycin-Zusatz ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen für die verschiedenen Versuche wie folgt behandelt:

### *Untersuchung der Salmonella-Mutanten:*

Hier wurde parallel zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung auch die intrazelluläre Keimzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 2 – 10 bzw. einer MOI von 20 – 100 entsprechend des Protokolls für den Gentamycin-Protection-Assay (Beschreibung unter 3.2.4) 60 Min. mit *Salmonella* infiziert. Die Messung der NF- $\kappa$ B-induzierten Luziferase-Aktivität sowie die Probennahmen für die intrazelluläre Keimzahlbestimmung erfolgte 2, 4 und 24 Stunden nach der Infektion. Die Wirkung von Zink auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie die Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der *Salmonella*-Mutanten wurde in dieser Arbeit ermittelt. Dazu wurde dem Zellkulturmedium 0,5 bzw. 1 mM ZnCl<sub>2</sub> hinzugefügt und die Zellen zwei Stunden vor bzw. nach der Infektion mit dem zinkhaltigen Medium behandelt.

### *Behandlung der Zellen über 2, 4 und 6 Stunden mit intakten, lebenden E. faecium:*

In diesen Versuch wurde die NF- $\kappa$ B-Aktivierung infolge einer Infektion der Zellen mit  $1 \times 10^6$  *E. faecium* SF68, *E. faecium* TX0016 bzw. *S. Typhimurium* SL1344/ml untersucht. Die Effekte der drei Bakterienstämme konnten so verglichen werden. Die extrazellulär übrig gebliebenen Salmonellen wurden entsprechend des Gentamycin-Protection-Assay-Protokolls nach einstündiger Infektion mit 50 µg/ml Gentamycin abgetötet und nach einer weiteren Stunde das Medium gegen solches mit nur noch 10 µg/ml Gentamycin ausgetauscht. Die Infektion mit *E. faecium* erfolgte über 2, 4 bzw. 6 Stunden. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde 2, 4 und 6 Stunden nach der Infektion quantifiziert.

### *Behandlung der Zellen über 2 Stunden mit intakten, lebenden E. faecium und anschließende Infektion mit S. Typhimurium SL1344:*

Für diesen Versuch wurden die Zellen zunächst zwei Stunden mit intakten, lebenden *E. faecium* ( $1 \times 10^6$  Bakterien/ml) behandelt. Anschließend wurde in der gesamten Platte das

Medium gewechselt und einmal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Infektion mit  $1 \times 10^6$  S. Typhimurium SL1344/ml entsprechend dem Protokoll für den Gentamycin-Protection-Assay (siehe 3.2.4). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wurde 2, 4 und 24 Stunden nach der Infektion mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT detektiert.

*Behandlung der Zellen mit Gentamycin-abgetöteten E. faecium SF68 und anschließende Infektion mit S. Typhimurium SL1344:*

Zur Untersuchung des Einflusses von abgetöteten *E. faecium* SF68 auf die durch S. Typhimurium SL1344 induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurden die Zellen über 4, 24 und 48 Stunden mit einer Bakteriensuspension aus durch Gentamycin abgetöteten *E. faecium* behandelt ( $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml, Herstellung siehe 3.1.5.2). Nach 4-, 24- bzw. 48-stündiger Behandlung wurde das alte Medium in der Platte entfernt, einmal mit PBS gewaschen und ein Teil der wells mit  $1 \times 10^6$  S. Typhimurium SL1344/ml entsprechend Abschnitt 3.2.4 (Protokoll Gentamycin-Protection-Assay) infiziert. Vier Stunden nach der Infektion mit *Salmonella* wurde in der ganzen Platte die NF- $\kappa$ B-Aktivierung gemessen.

### 3.2.7. Bakterienlysatversuche

Um zu untersuchen, welchen Einfluss zellfreie Bakterienlysate auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung haben, wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume (2, 4, 24 und 48 Stunden) mit den zellfreien Bakterienlysaten unterschiedlicher Bakterienstämme (*Enterococcus faecium* SF68, *Enterococcus faecium* TX0016, *E. coli* Nissle, *E. coli* K-12 MG1655, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) behandelt und im Anschluss die NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert. Zunächst wurden die Zellen in 96-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienlysate wurden frisch bzw. einen bis drei Tage vor dem Versuch hergestellt (siehe 3.1.5). Am Tag der ersten Bakterienlysatzugabe wurde mindestens eine Stunde vor Lysatzugabe das Zellkulturmedium in der Platte gegen 50  $\mu$ l frisches, 37 °C warmes Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ l/well der entsprechenden Bakterienlysatzugabe behandelt. Es wurden Verdünnungen zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^8$  lysierte Bakterien/ml für die Behandlung verwendet.

**Tabelle 15: Für die Bakterienlysatzugabe eingesetzte MOIs.**

Eingesetzte Bakteriendichte	MOI ausgehend von $2,2 \times 10^4$ Zellen (IPEC-J2)/well	MOI ausgehend von $6,1 \times 10^4$ Zellen (3D4/31)/well
$1 \times 10^6$ lysierte Bakterien/ml	4,5	2
$1 \times 10^7$ lysierte Bakterien/ml	45	20
$1 \times 10^8$ lysierte Bakterien/ml	450	200

Teilweise wurde nach der Bakterienlysat-Behandlung noch mit *S. Typhimurium* SL1344 infiziert, um den Einfluss auf die *Salmonella*-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu detektieren. Die Handhabung ist unter 3.2.4 (Gentamycin-Protection-Assay/Infektionsversuch) beschrieben. Infiziert wurde mit  $1 \times 10^6$  *S. Typhimurium* SL1344/ml, bezogen auf die Zellzahl in der 96-well Platte mit einer MOI zwischen 2 und 10. Für alle Bakterienlysatversuche wurden die Luziferase-Reporterzelllinien verwendet. Die Grundstruktur entspricht der eines NF- $\kappa$ B-Aktivierungsassays. Es wurden verschiedene Versuchsansätze verwendet:

### *Hitzeinaktiviertes zellfreies Bakterienlysat:*

Neben dem unbehandelten zellfreien Bakterienlysat wurde auch hitzeinaktiviertes Lysat von *E. faecium* verwendet. Die zellfreien Bakterienlysate wurden hierfür zunächst wie in 3.1.5.1 erläutert 30 Min. bei 99 °C inaktiviert, um im Lysat enthaltene Enzyme und Proteine zu denaturieren und den Verlust ihrer biologischen Funktion herbeizuführen.

### *Proteinase K-Behandlung des zellfreien Bakterienlysates:*

Um Proteine, welche entweder im Lysat enthalten sind oder solche, die sich auf der Oberfläche von *E. faecium* befinden, abzubauen wurden die Lysate bzw. die intakten *E. faecium* SF68 mit Proteinase K behandelt (siehe 3.1.5.2).

### *Lysozym-Behandlung des zellfreien Bakterienlysates:*

Für die enzymatische Lyse bakterieller Zellen bzw. den Verdau von grampositivem Peptidoglykan aus *E. faecium* wurde Lysozym aus Hühnereiern eingesetzt. Lysozym ist ein Enzym, welches die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglucosaminresten (NAG) in Peptidoglykanen hydrolysiert und somit optimal für die Lyse grampositiver Bakterien ist. Das Lysozym wurde in einer Arbeitskonzentration von 0,2  $\mu$ g/ml verwendet.

### *Inhibierung der Caspase-Aktivierung:*

Um zu untersuchen ob die Behandlungen eine Apoptose hervorgerufen haben, wurde der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK verwendet. Dieser bindet irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspase Proteasen und verhindert so die Apoptose. Dazu wurden die Zellen gleichzeitig zur Behandlung mit zellfreiem Lysat mit 10  $\mu$ g/ml Z-VAD-FMK behandelt.

### *Katalase-Behandlung:*

Für die Inaktivierung von zellschädigendem Wasserstoffperoxid, welches womöglich durch *E. faecium* produziert werden könnte, wurde Katalase aus der Rinderleber eingesetzt. Hier wurden die Zellen gleichzeitig mit zellfreiem Bakterienlysat und 2500 U Katalase/100  $\mu$ l well (3,7  $\mu$ l der 20.000 U Stocklösung/100  $\mu$ l Zellkulturmedium) inkubiert.

### *Aminosäure-Zusatz:*

Um zu überprüfen, ob durch Bestandteile des Bakterienlysates wichtige Nährstoffe wie z. B. Aminosäuren verbraucht bzw. umgewandelt werden und so für die Zellen nicht mehr zugänglich sind, wurde die Konzentration im Zellkulturmedium erhöht. Dazu wurde 2 x MEM (MEM amino acids 50 x without L-glutamine, Biochrom) sowie 50 µM L-Alanyl-L-Glutamine zum Zellkulturmedium hinzugefügt.

### **3.2.7.1. Verschiedene Varianten der Bakterienlysatversuche**

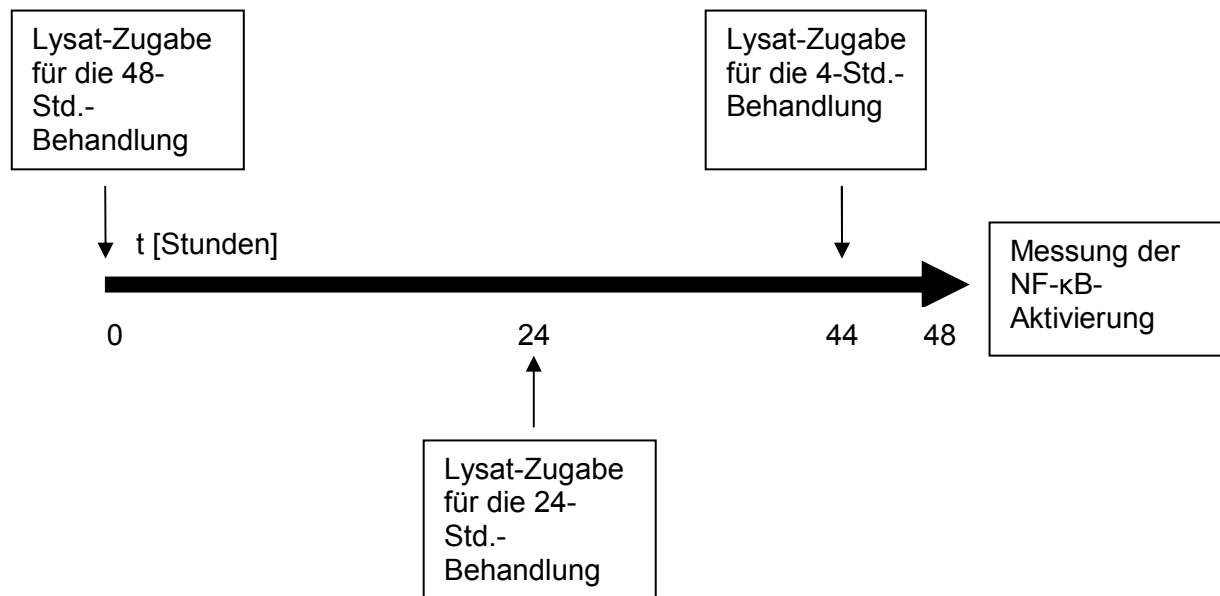
#### *Inkubation der Zellen über 2 Stunden mit zellfreiem Bakterienlysat, anschließend Infektion mit S. Typhimurium SL1344:*

Für diese Versuche wurden die Zellen (IPEC-J2, 3D4/31) über zwei Stunden mit zellfreiem LySAT von *E. faecium* SF68 behandelt und anschließend, wie in Abschnitt 3.2.4 (Gentamycin-Protection-Assay) beschrieben, mit *S. Typhimurium* SL1344 infiziert. Eine Stunde nach der Infektion mit *Salmonella* wurde das Zellkulturmedium gegen solches mit 50 µg/ml Gentamycin ausgetauscht. Eine weitere Stunde später wurde das Medium gegen Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Gentamycin getauscht und die NF-κB-induzierte Luziferase-Aktivität gemessen. Weitere Messungen erfolgten nach 4 und 24 Stunden.

#### *Inkubation der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden mit zellfreiem Bakterienlysat:*

Neben der Preinkubation über zwei Stunden wurde untersucht, welchen Einfluss eine längere Inkubation (4, 24 und 48 Stunden) der Zellen (IPEC-J2, 3D4/31) mit den Lysaten der unterschiedlichen Bakterien auf die NF-κB-Aktivierung hat. Dieser Versuch lief über drei Tage. An Tag 1 wurden die Zellen mit LySAT behandelt, die insgesamt 48 Stunden behandelt werden sollten. Einen Tag (24 Stunden) später, an Tag 2, wurde den wells das LySAT zugefügt, welche für die 24-Stunden-Behandlung vorgesehen waren und weitere 20 Stunden danach (Tag 3) wurden die wells in der Platte behandelt, die für die 4-Stunden-Behandlung gedacht waren (Schema siehe Abbildung 6). An Tag 3, nach 48, 24 bzw. 4 Stunden Behandlung mit dem entsprechenden zellfreien Bakterienlysat wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT gemessen. Dieser Versuchsaufbau wurde auch für folgende Behandlungen verwendet:

- Proteinase K-Behandlung
- Caspase-Inhibitor Zugabe
- Katalase-Behandlung
- Aminosäure-Zusatz



**Abbildung 6: Versuchsaufbau für einen Bakterienlysatversuch mit Behandlung der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden.**

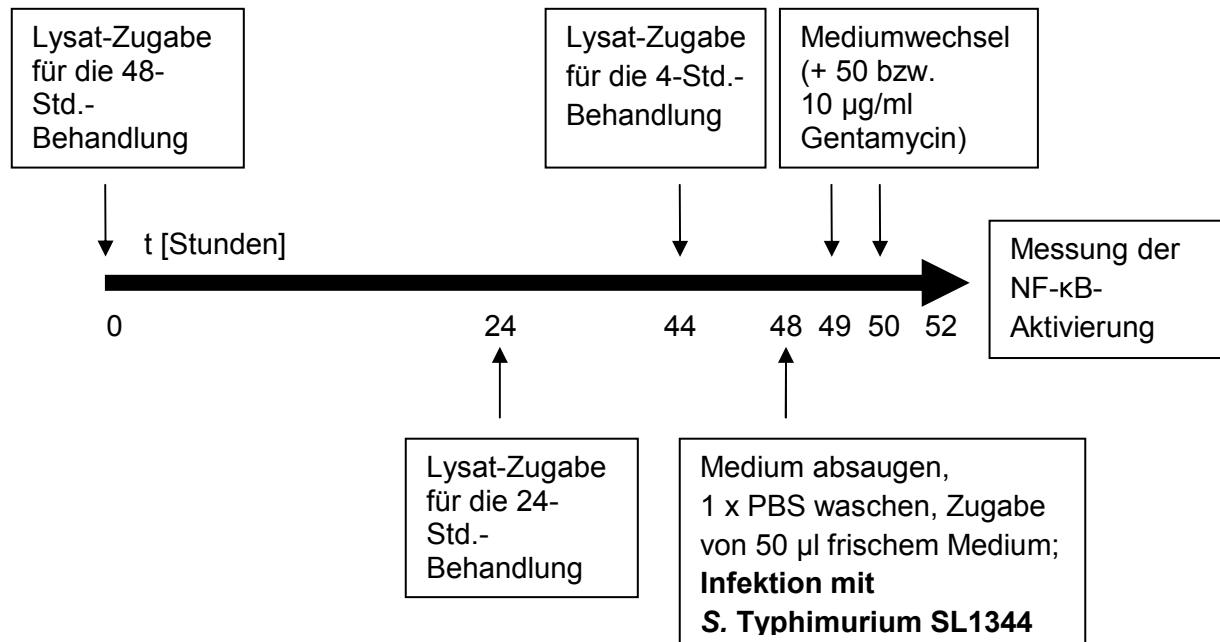
*Inkubation der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden mit zellfreiem Bakterienlysat, anschließend Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344:*

Um den Einfluss der Bakterienlysate nach Inkubation über 48, 24 und 4 Stunden auf die *Salmonella*-induzierte NF-κB-Aktivierung in den verschiedenen Zelllinien (IPEC-J2, 3D4/31, LoVo) überprüfen zu können, wurden die Zellen für diesen Versuch wie in 3.2.7 angegeben zunächst mit zellfreiem Bakterienlysat behandelt. Am dritten Tag der Behandlung, nach 48 Stunden, wurde in der ganzen Platte zur Entfernung des Bakterienlysates das Medium abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die vorbehandelten Zellen mit 100 µl je well  $1 \times 10^6$  *S. Typhimurium* SL1344/ml infiziert und weiter verfahren wie in Abschnitt 3.2.4. (Gentamycin-Protection-Assay/Infektionsversuch) angegeben. Die NF-κB-Aktivierung wurde indirekt durch die Messung der Luziferase-Aktivität vier Stunden nach der *Salmonella*-Infektion gemessen. Der Versuchsaufbau, gegliedert in Lysat-Behandlung (48, 24, 4 Stunden), anschließende Infektion mit *Salmonella* über eine Stunde und Messung der NF-κB-Aktivierung drei Stunden später, diente für folgende Behandlungen als Vorlage:

- 30 Min. hitzeinaktiviertes Bakterienlysat
- Lysozym-Behandlung

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

Um zu untersuchen, ob Bestandteile des zellfreien Bakterienlysates Nährstoffe aus dem Zellkulturmedium umwandeln und sie so unzugänglich für die Zellen machen, wurde in einer Versuchsreihe bei den dreitägigen Untersuchungen jeden Tag das alte Lysat-Medium-Gemisch abgesaugt und gegen neues ausgetauscht.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau für einen Bakterienlysatversuch mit Behandlung der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden und nachfolgender Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344.**

*Inkubation der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden mit zellfreiem Bakterienlysat, anschließend Behandlung mit LPS:*

Um zu untersuchen, wie sich eine Vorbehandlung der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden auf die durch bakterielle Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) ausgelöste NF-κB-Aktivierung auswirkt, wurden die Zellen (IPEC-J2, 3D4/31) zunächst, wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, mit zellfreiem Lysat behandelt. Anstelle der *Salmonella*-Infektion erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml LPS (IPEC-J2). Es wurde einerseits LPS aus *Salmonella* (LPS-SM, Ultrapure from *Salmonella minnesota* R595, InvivoGen) verwendet und andererseits solches, das aus *E. coli* stammt (LPS-EK, InvivoGen). Nach vierstündiger Inkubation wurde die NF-κB-Aktivierung gemessen.

*Inkubation der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden mit zellfreiem Bakterienlysat, anschließend Behandlung mit porzinem TNF-α:*

Die Zellen (IPEC-J2, 3D4/31) wurden wie in 3.2.7 erläutert mit zellfreiem Bakterienlysat behandelt, allerdings erfolgte anschließend keine Infektion mit *Salmonella*. Stattdessen wurden die Zellen über vier Stunden mit 100 ng/µl porzinem Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α, rekombinant, Biochrom) behandelt. Nach vier Stunden wurde die NF-κB-Aktivierung mit Hilfe des Luminometer Synergy™ HT gemessen.

### 3.2.8. Zytotoxizitätsassay

Für die Untersuchung der zytotoxischen Effekte der zellfreien Bakterienlysate von *E. faecium* SF68 auf die eukaryotischen Zellen wurde der CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega) verwendet. Dieser Assay basiert auf der Messung der



Membranintegrität behandelter und unbehandelter Zellen. Die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) aus Zellen mit zerstörter und somit permeabler Membran wird nach Akkumulation im Zellüberstand fluorimetrisch gemessen. Diese Messung beruht auf der Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die LDH unter Verwendung von  $\text{NAD}^+$  und Bildung von NADH. Gleichzeitig kommt es in Anwesenheit von NADH zum reduktiven Umsatz des Farbstoffs Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin, wobei die Bildung des fluoreszierenden Resorufins proportional zur Menge an LDH ist.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.7 beschrieben mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 über 48, 24 und 4 Stunden behandelt. Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurden zunächst 2  $\mu\text{l}$  der Positivkontrolle (Lysispuffer)/100  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium in vier Wells pipettiert. Die Platte wurde im Anschluss für ca. 10 s auf einem Plattenschüttler gemischt und für 20 – 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Akkumulation wurde das Volumen in den Wells auf 50  $\mu\text{l}$ /Well gebracht und ab diesem Zeitpunkt im Dunklen gearbeitet. Es wurden nun 50  $\mu\text{l}$ /Well CytoTox-ONE™ Reagenz hinzugefügt und die Platte ein weiteres Mal geschüttelt (ca. 30 s). Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 25  $\mu\text{l}$ /Well Stop-Lösung, um die Redoxreaktion zu stoppen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 560 \text{ nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 590 \text{ nm}$ . Die Fluoreszenz wurde als RLU (*relative light units*) ausgegeben. Die prozentuale Anzahl abgestorbener Zellen bezogen auf die mit Lysispuffer-behandelten Zellen (Positivkontrolle) konnte ermittelt werden, nachdem zunächst die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen abgezogen wurde.

### **3.2.9. Zellviabilitätsassay**

Neben den Untersuchungen zu möglichen zytotoxischen Effekten der zellfreien Bakterienlysate von *E. faecium* SF68 wurde die Wirkung der Lysate auf die Zellviabilität mit Hilfe des CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays (Promega) untersucht. Dieser Assay misst eine Proteaseaktivität, welche auf intakte, lebende Zellen beschränkt ist. Die relative Zahl lebender Zellen in einer Zellpopulation kann bestimmt werden. Das CellTiter-Fluor™ Reagenz enthält ein zellpermeables Peptidsubstrat (GF-AFC, glycyl-phenylalanyl-aminofluorcoumarin), welches in intakte, lebende Zellen eindringt und dort durch die Protease gespalten wird. Es entsteht das fluoreszierende AFC. Die Menge an gebildetem AFC ist dabei proportional zur Anzahl der viablen Zellen. Die Protease wird bei Verlust der Membranintegrität und zerstörter Membran inaktiv. Dementsprechend kann so die Zellviabilität der behandelten in Bezug auf die unbehandelten Zellen bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte anhand des Protokolls: "4.B. Example Viability Assay Protocol". Allerdings wurde nicht wie im Protokoll angegeben 100  $\mu\text{l}$  CellTiter-Fluor™ Reagenz verwendet, sondern es wurde zunächst das Volumen im Well auf 25  $\mu\text{l}$  reduziert und ebenfalls 25  $\mu\text{l}$  des Reagenz hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde der Lysispuffer aus

dem CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay Kit (Promega) verwendet. Die zellfreien Lysate wurden entsprechend 3.1.5 hergestellt.

### **3.2.10. Zellvitalitätsassay – MTS-Assay**

Bei diesem Test handelt es sich um die Abwandlung eines MTT-Assays, welcher auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan beruht. In dieser Arbeit wurde der CellTiter-6® AQUEOUS One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) verwendet. Mit Hilfe des Assays kann die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt werden. Die Grundlage dieses Assays ist ebenfalls die reduktive Umwandlung einer Tetrazolium-Komponente (MTS) in ein farbiges Formazan-Produkt, welches jedoch im Zellkulturmedium löslich ist. Die Reduktion geht höchstwahrscheinlich auf die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zurück, welche durch Dehydrogenasen in vitalen Zellen produziert werden. Die Menge der umgesetzten Tetrazolium-Komponente wird indirekt durch die Menge des gemessenen Formazan-Farbstoffs detektiert. Die Menge des Formazan-Produktes, welche direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen in Kultur ist, wird durch die Absorptionsmessung bei  $\lambda = 490 \text{ nm}$  mit Hilfe des Luminometers Synergy™ HT ermittelt. Die Durchführung des Zellvitalitätstests erfolgte anhand des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokolls: "3.A. General Protocol".

## **3.3. Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1. RNA-Extraktion (Organproben)**

Für die Extraktion der RNA aus den Organproben wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand des im RNeasy Mini Handbuchs angegebenen Protokolls "Purification of Total RNA from Animal Tissues" unter Einbeziehung des Appendix D: "Optional On-Column DNase Digestion with RNase-Free DNase Set". Die Extraktion setzt sich aus den Schritten Lysis/Homogenisierung, RNA-Bindung, Waschen und Elution zusammen. Zur Homogenisierung der Organproben wurde ein FastPrep®-24 Instrument der Firma MP Biomedicals und die entsprechenden Schraubröhrchen (Lysing Matrix D, 1,4 mm Keramikkügelchen, MP Biomedicals) verwendet. Alle Arbeiten und Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Je Probe wurden etwa 25 mg Organ verwendet, von der Milz nur je etwa 10 mg. Die Organproben wurden in die Schraubröhrchen überführt und jeweils mit 600  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer versehen. Anschließend wurden die Röhrchen in das FastPrep®-24 Instrument gestellt und bei einer Geschwindigkeit von 4,5 m/s zweimal 25 s lang homogenisiert. Um den entstandenen Schaum zu entfernen wurde 1 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zu jeder homogenisierten Probe wurde entsprechend ihres Volumens 700  $\mu\text{l}$  70 % EtOH gegeben und mit der Pipette gemischt. Es wurden jeweils 700  $\mu\text{l}$  der homogenisierten und mit 70 % EtOH versehenen Probe auf die

RNeasy-Säule transferiert. Ab diesem Schritt erfolgte die weitere Aufreinigung laut angegebenem Protokoll. Eluiert wurde zweimal mit jeweils 50 µl 70 °C warmen RNase-freiem Wasser. 3 µl des Eluats wurden für die Konzentrationsbestimmung abgenommen und die RNA kurzfristig bei 4 °C und längerfristig bei -80 °C gelagert. Die jeweilige Nukleinsäurekonzentration wurde mittels Nanodrop ermittelt. Es wurde die Absorption bei einer Wellenlänge  $\lambda = 260, 280$  und  $230$  nm gemessen. Der A260/A280 Quotienten gibt eine Aussage über den Grad der Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Phenol, der A260/A230 Quotient zeigt Verunreinigungen mit Kohlenhydraten, Peptiden, Phenol oder auch aromatischen Verbindungen an. RNA-Lösungen mit A260/A280 > 2,0 sowie A260/A230 > 2,0 wurden als rein angesehen.

### 3.3.2. RNA-Extraktion (Blut)

Zur Extraktion der RNA aus Vollblut wurde das PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurden die PAXgene Blood RNA Tubes aufgetaut, auf Raumtemperatur äquilibriert und min. zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die RNA-Aufreinigung anhand des Protokolls „Manuelle Reinigung von Gesamt-RNA aus humanem Vollblut in PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)“. Eluiert wurde nur einmal mit 40 µl Puffer BR5. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte siehe 3.3.1.

### 3.3.3. Reverse Transkription

Zur Herstellung der cDNA aus der extrahierten Gesamt-RNA wurden zunächst je 2 µg RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl eingestellt. Jeweils 2 µl Random Primer wurden beigefügt und der Ansatz für 5 Min. bei 70 °C in einem Thermocycler denaturiert. Im Anschluss wurde der auf Eis pipettierte Reaktionsansatz (Pipettierschema siehe Tabelle 16) hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C im Thermocycler. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 16: Pipettierschema cDNA-Synthese.**

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
M-MLV RT 5 x Puffer (Promega)	5 x	5
dNTP-Mix (Roth)	2 mM	6,75
RNasin <sup>®</sup> RNase Inhibitor (Promega)	40 u/µl	0,625
M-MLV RT (Promega)	200 u/µl	1 µl

### 3.3.4. Real-time quantitative PCR

Die quantitative Real-time PCR ermöglicht, im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten

Fluoreszenzfarbstoffe steht dabei quantitativ im Zusammenhang mit der Menge an PCR-Produkt und kann in Echtzeit (also Real-time) dargestellt werden. Eine typische PCR-Kurve gliedert sich in exponentielle, lineare und Plateau-Phase. Ein großer Vorteil der quantitativen PCR ist die Messung der Daten während der exponentiellen Phase [734]. Hier kommt es zu einer exakten Verdopplung der Produkte in jedem Zyklus. Dementsprechend ist die Messung während dieser Phase sehr präzise. Bei traditionellen PCR-Methoden werden die Daten am Endpunkt (Plateau) der PCR-Reaktion gemessen, zu diesem Zeitpunkt kann es jedoch schon zur Degradation der PCR-Produkte kommen, was diese Messung weniger spezifisch macht [734]. Mit der quantitative Real-time PCR ist eine Quantifizierung der Genexpression (cDNA als Kopie der RNA) möglich. Hierbei können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden verwendet werden. In dieser Arbeit wurde mit SYBR Green (Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) gearbeitet. Dies ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff, der generell an jede doppelsträngige DNA bindet mit einer Präferenz zu Amplikons mit einem hohen G/C-Gehalt [734, 735]. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR sind Aussagen über die Expression verschiedener immunrelevanter Gene in den während der verschiedenen Tierversuche gesammelten Proben möglich. Für jede Probe wurden zwei technische Replikate eingesetzt. Das Pipettierschema des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Pipettierschema für die quantitative Real-time PCR.**

Komponente	Konzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
Power SYBR <sup>®</sup> Green Master Mix	2 x	10
je Primer F/R	10 pmol/µl	1,8
Wasser (Rotisolv <sup>™</sup> )		4,4

Zunächst wurden 18 µl Reaktionsansatz/well in eine 96-well Reaktionsplatte (Applied Biosystems) vorgelegt. Für jede Reaktion wurden anschließend 2 µl der Template-cDNA an den oberen Rand der Reaktionsplatte pipettiert. Die Platte wurde durch eine adhäsive Folie (MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) verschlossen und 1 Min. bei 1000 x g zentrifugiert. Für den PCR-Lauf im StepOnePlus<sup>™</sup> System (Applied Biosystems) wurden folgende Bedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min.
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	55 – 58 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	55 °C	1 Min.
Schmelzpunktbestimmung	0,5 °C/s auf 95 °C	

Die Messung der Fluoreszenz, welche durch die Einlagerung des SYBR<sup>®</sup> Green I Farbstoffes in die gebildete doppelsträngige DNA zustande kommt, erfolgt am Ende jedes Zyklus nach der Elongation. Am Ende der PCR wurde eine Schmelzpunktbestimmung durchgeführt, bei der die Temperatur schrittweise (0,5 °C/s) von 55 °C auf 95 °C erhöht wurde.

Um die relativen Änderungen der Expressionsraten der untersuchten Gene zu analysieren, wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode verwendet [736]. Hierzu wird zunächst ein Schwellenwert (Threshold) festgesetzt, der den Beginn der exponentiellen Phase markiert. Dabei stellt die Threshold-Linie den Wert dar, ab dem die Reaktion eine Fluoreszenzintensität erreicht, die signifikant über dem Hintergrund liegt. Der Zyklus an dem eine Probe diesen Punkt erreicht, wird als Cycle Threshold (Ct) bezeichnet. Je kleiner der Ct-Wert einer Probe ist, desto größer ist die Ausgangsmenge. Zur Auswertung wurden zunächst die beiden Werte der technischen Replikate gemittelt und die  $\Delta Ct$ -Werte relativ zum endogenen Referenzgen ( $\beta$ -Aktin) für jedes Gen bestimmt. Hierdurch wird eine Normalisierung der Werte erreicht. Die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurden für die Proben aus den Tierversuchen durch Subtraktion des Mittelwerts der  $\Delta Ct$ -Werte der jeweiligen Kontrollgruppe ermittelt. Der erhaltene  $\Delta\Delta Ct$ -Wert diente zur Berechnung der relativen Genexpression nach  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Dadurch konnten die x-fachen Unterschiede in der Expression eines bestimmten Zielgens in den Proben der Versuchsrelativ zur Kontrollgruppe bestimmt werden.

### **3.4. Statistische Auswertung**

#### **3.4.1. Zellkulturversuche**

Allgemein wurden die in dieser Arbeit gezeigten Daten, wenn nicht anders angegeben, aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen ermittelt. Dabei wurden bei den Gentamycin-Protection-Assays zweifache und bei den NF- $\kappa$ B-Aktivierungsassays sowie den Zellviabilitäts-, Zellvitalitäts- und Zytotoxizitätsassays vierfache Ansätze verwendet. Die arithmetischen Mittelwerte sowie die jeweiligen Standardabweichungen wurden mit Microsoft Office Excell 2003/2010 ermittelt und mit SigmaPlot 10.0 die dazugehörigen Graphen erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit R (Version 2.15.2) [737]. Zur Analyse der Datensätze aus den Zellkultur-Versuchen wurden zweifaktorielle Varianzanalysen (zweiseitige ANOVA) mit zwei festen Faktoren (Behandlung und Zeitpunkt) und einem Interaktionsfaktor (Behandlung x Zeitpunkt) durchgeführt. Im Fall von Signifikanzen wurde der Turkey HSD Post-hoc-Test durchgeführt. Teilweise erfolgte zusätzlich auch eine Signifikanzanalyse mit Hilfe des Students t-Test für zwei ungepaarte Stichproben in Bezug auf *S. Typhimurium* SL1344 (Wildtyp-Stamm). Statistische Unterschiede mit einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) bzw.  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*) wurden als signifikant, hoch signifikant bzw. sehr hoch signifikant angesehen.

### 3.4.2. Tierversuche - Quantitative Real-time PCR

Bei der quantitativen Real-time PCR wurden immer zweifache Ansätze pipettiert. Für die statistische Auswertung der quantitativen Real-time PCRs der Proben aus den vier Tierversuchen (*E. faecium* SF68-Fütterungsversuch, *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch, Zinkoxid-Fütterungsversuch, *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch) wurde IBM SPSS 21 verwendet. Die  $\Delta C_t$ -Werte wurden mit Hilfe eines linearen Modells mit zwei festen Faktoren (Alter und Gruppe) sowie einem Wechselwirkungsfaktor (Alter x Gruppe) analysiert. Least Significance Difference (LSD) Analysen wurden im Fall von statistisch signifikanten Werten durchgeführt. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Test wurde die Normalverteilung der Werte überprüft. Statistische Unterschiede mit einem Signifikanzwert von  $p \leq 0,05$  (\*) bzw.  $p \leq 0,001$  (\*\*) wurden als signifikant bzw. hoch signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Tierversuche

Für die Untersuchung immunologischer Parameter, welche durch den Einsatz von Futterzusatzstoffen bei Ferkeln beeinflusst werden könnten, wurden die Genexpressionsprofile von pro- (IL-8/CXCL8) und anti-inflammatorischen (IL-10) Zytokinen während entsprechender Fütterungsversuche überprüft. Daneben wurde aufgrund von Beobachtungen in früheren Studien, die zwar eine reduzierte Population von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aber auch einen verbesserten zytotoxischen Effekt von isolierten PBMCs in der späten Phase eines *Salmonella* challenge Experiments zeigen konnten [20, 738], auch die Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2) untersucht. Im Gegensatz zu einem weiteren ko-stimulatorischen Molekül, CD80 (B7.1), zeigt CD86 zwar eine geringere aber dafür auch anhaltende Stimulierung von T-Zellen. Darüber hinaus ist die Expression von CD86 in aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen hochreguliert [739]. Neben dem Ko-Stimulator CD86 wurde ebenfalls ein negativer Regulator für die T-Zell-Stimulierung, CTLA4, überprüft. Aufgrund der engen Verwandtschaft mit CD28 kommt es nach Expression von CTLA4 auf den T-Zellen zu einer Konkurrenzsituation um die Ligandenbindungsstellen auf den Antigen-präsentierenden Zellen. Eine reversible T-Zell-Anergie ist das Resultat. CTLA4 gilt als Marker für die T-Zell-Anergie und die Herabregulierung des Immunsystems [266, 740]. Dementsprechend wurde die Genexpression im Rahmen des *E. faecium*-Fütterungsversuches sowie des *Salmonella* DT104 challenge *E. faecium* SF68-Versuches detektiert.

Neben den Zytokinen und Oberflächenmolekülen, welche für die T-Zell-Stimulierung von entscheidender Bedeutung sind, wurden auch intrazelluläre Erkennungsproteine für Peptidoglykan, Nod1 und Nod2, untersucht. Außerdem wurde die Expression der sezernierten Peptidoglykan-Erkennungsmoleküle, der PGLYRPs, überprüft. Sowohl die Nod-Proteine als auch die PGLYRPs spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von pathogenen Mikroorganismen [104, 156]. Die beiden Signalwege sind miteinander verbunden [104]. Die PGLYRPs mit Amidase-Aktivität produzieren Liganden für die Nod-Proteine, das Nod-Signaling führt letztendlich zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und seinen Zielgenen, die beispielsweise für pro-inflammatorische Zytokine codieren. Diese gesteigerte Produktion von Zytokinen führt zu einer erhöhten Expression der PGLYRPs, die neben einer Amidase-Aktivität auch direkt bakterizid wirken können [104]. Da Zink für die PGLYRPs eine entscheidende Bedeutung für die Aktivität z. B. als Cofaktor einnimmt [191], stehen diese Proteine besonders bei den Zink-Versuchen im Fokus.

Als „housekeeping gene“ fungierte das Gen für  $\beta$ -Aktin. Die Auswahl der endogenen Kontrolle erfolgte nach qRT-PCR mit Proben aus allen zu untersuchenden Geweben durch

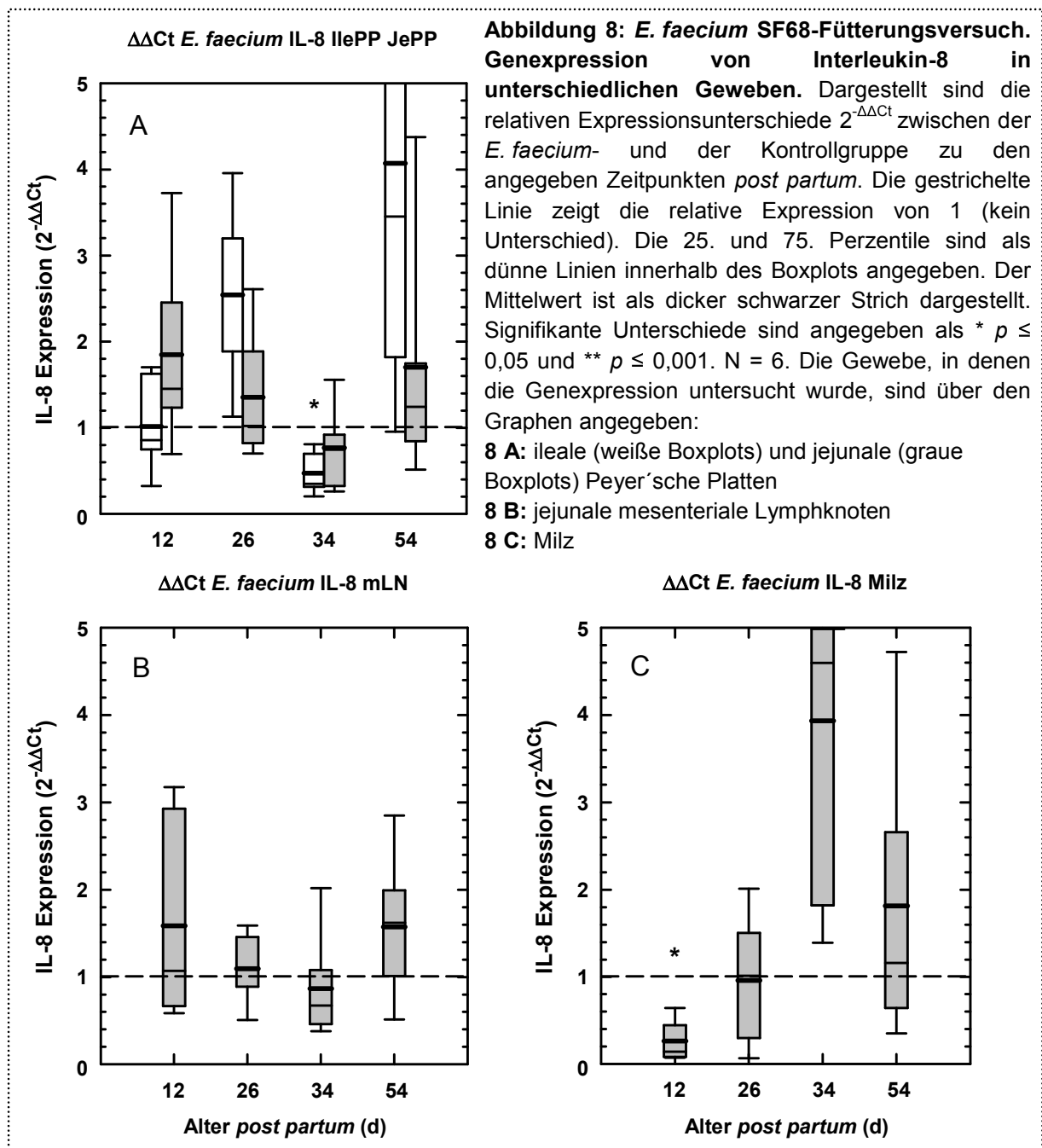
Vergleich der Schwellenwert-Zyklen (Ct-Werte). Diese Werte wurden sowohl für  $\beta$ -Aktin als auch für ein weiteres in Frage kommendes „housekeeping gene“, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ermittelt. Die Ct-Werte für  $\beta$ -Aktin waren homogen und stabil in den untersuchten Geweben und dementsprechend wurde dieses Gen als endogene Kontrolle ausgewählt.  $\beta$ -Aktin ist ein Strukturprotein, ein wichtiger Bestandteil von Mikrofilamenten und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Diese essentielle Bedeutung bedingt eine hohe mRNA-Expressionsrate des ubiquitär exprimierten  $\beta$ -Aktins. Nygard *et al.* (2007) konnten durch qRT-PCRs mit Proben aus 17 verschiedenen porcinen Geweben (u. a. Dünndarm, Leber, Lymphknoten) zeigen, dass  $\beta$ -Aktin stabil exprimiert wird und sich somit gut als Referenzgen für die Normalisierung der Daten eignet [741]. Weitere Studien von McCulloch *et al.* (2012) und Duvigneau *et al.* (2005) konnten bestätigen, dass das Gen für  $\beta$ -Aktin zu den vier am stabilsten exprimierten Genen im porcinen Gewebe gehört [742, 743]. Es wurde eine breite Palette von immunologisch-bedeutsamen Molekülen untersucht. Dabei wird von den Erkennungsproteinen für Bakterien (Nod-Proteine, PGLYRPs), über den T-Zell Ko-Stimulator (CD86) und den negativen Regulator der T-Zell-Aktivierung (CTLA4) bis hin zu inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-8, IL-10) die jeweilige Genexpression in unterschiedlichen Geweben detektiert. Die Genexpressionsprofile wurden im Blut, sowie in Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP), mesenterialen Lymphknoten, der Milz und der Leber je nach Expressionsort des einzelnen Gens bestimmt.

### **4.1.1. *Enterococcus faecium* SF68-Fütterungsversuch**

Eine Fütterung von Ferkeln mit *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) führte zu einer frühen inflammatorischen Reaktion auf niedrigem Level, gefolgt von einer anti-inflammatorischen Reaktion nach dem Absetzen. Auch wenn keine statistischen Signifikanzen während der Periode vor dem Absetzen (12 und 26 Tage *p. p.*) in der intestinalen Wand (IlePP, JePP) und den mLN festgestellt werden konnten, so scheinen die Genexpressionslevel von IL-8 in den jejunalen und ilealen Peyer'schen Platten erhöht zu sein (siehe Abbildung 8 A). Vor dem Absetzen, im Alter von 12 Tagen, waren die relativen Genexpressionsraten in der Milz für die *E. faecium*-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 8 C, 3,8-fache Reduzierung, \*  $p = 0,051$ ). Allerdings war in den Ferkeln im Alter von 26 Tagen die Genexpression von IL-8 wieder vergleichbar mit der in der Kontrollgruppe. In der Periode nach dem Absetzen (26 – 34 Tage *p. p.*) konnte im intestinalen Gewebe eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduzierte Genexpression von IL-8 festgestellt werden (IlePP, \*\*  $p = 0,016$ ). Dahingegen konnten in den Milzproben aus der *E. faecium*-Gruppe zwar stark variierende aber erhöhte Expressionslevel für IL-8 beobachtet werden. Für die mLN konnten sowohl in der Periode vor als auch in der Zeit nach dem Absetzen keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe für das Genexpressionslevel von IL-8 detektiert werden (Abbildung 8 B).

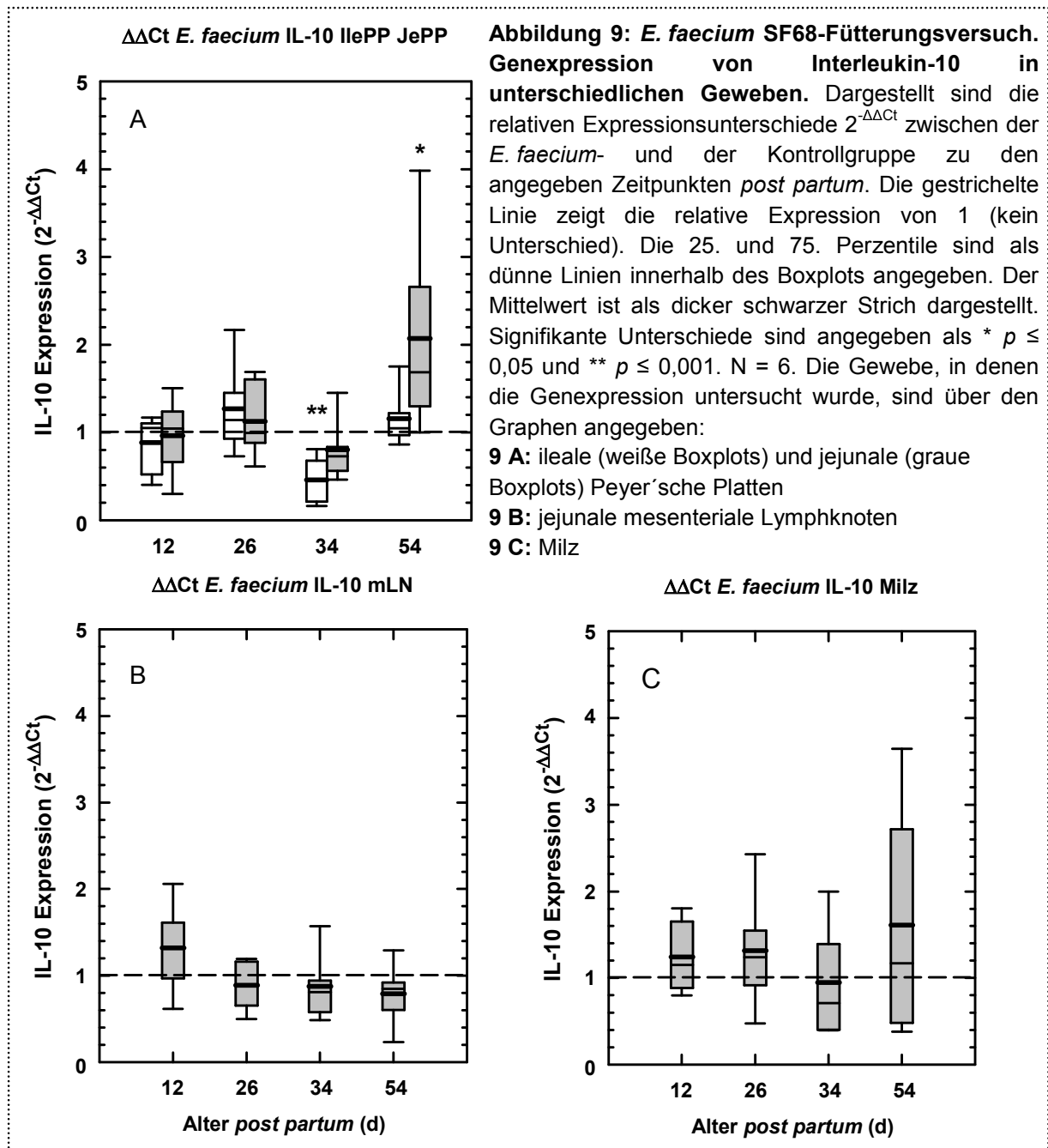


Zusammenfassend, wie in Abbildung 8 A und C dargestellt, zeigten Proben aus intestinale Gewebe und der Milz eine altersabhängige Verschiebung der Genexpression des proinflammatorischen Chemokins IL-8: von einer erhöhten Genexpression im intestinalen Gewebe und einer erniedrigten Genexpression in der Milz während der Periode vor dem Absetzen hin zu einer verringerten Genexpressionsrate im intestinalen Gewebe und einer erhöhten in der Milz nach dem Absetzen. Mit einem Alter von 54 Tagen kehrte sich das Muster wieder zu dem vor dem Absetzen zurück.



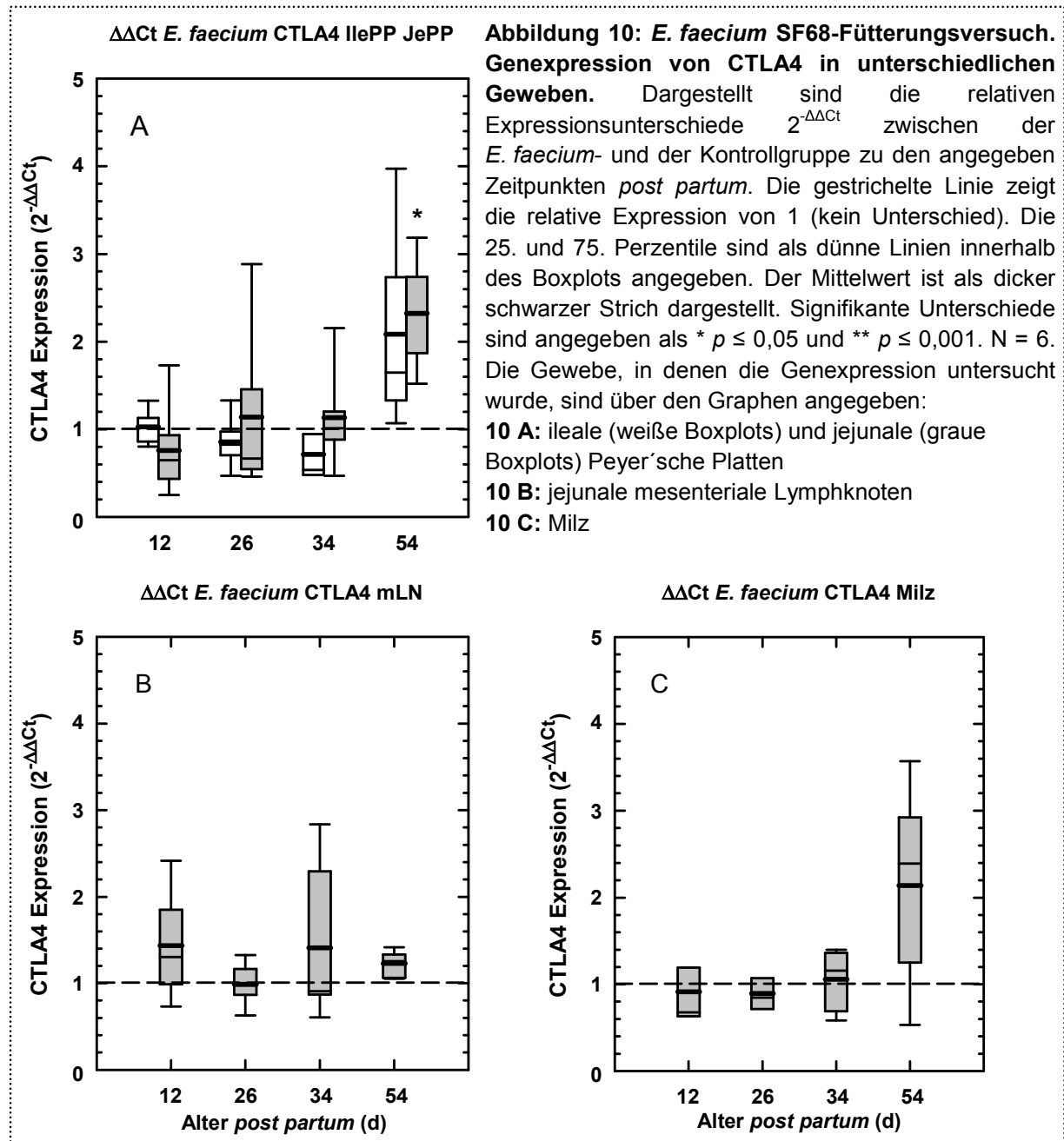
Das Genexpressionsprofil des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Geweben der intestinalen Wand entsprach während der Periode vor dem Absetzen (12 und 26 Tage *p. p.*) dem in der Kontrollgruppe (Abbildung 9 A). Nach dem Absetzen der Ferkel konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-10 in der *E. faecium*-Gruppe gegenüber der

Kontrollgruppe für die ilealen Peyer'schen Platten ermittelt werden (34 Tage *post partum*, 2,2-fache Reduktion, \*\*  $p \leq 0,001$ ). Daneben konnte eine erhöhte Genexpressionsrate von IL-10 in den jejunalen Peyer'schen Platten bei den Ferkeln im Alter von 54 Tagen beobachtet werden (Abbildung 9 A, \*  $p = 0,042$ ). Im Gegensatz zur signifikanten Reduktion der Genexpression von IL-8 in den Milzproben der 12 Tage alten Ferkel der *E. faecium*-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe konnten für IL-10 keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden (Abbildung 9 C). Auch in den mLN konnte für die Genexpressionsrate von IL-10 kein signifikanter Unterschied zwischen *E. faecium*- und Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 9 B).



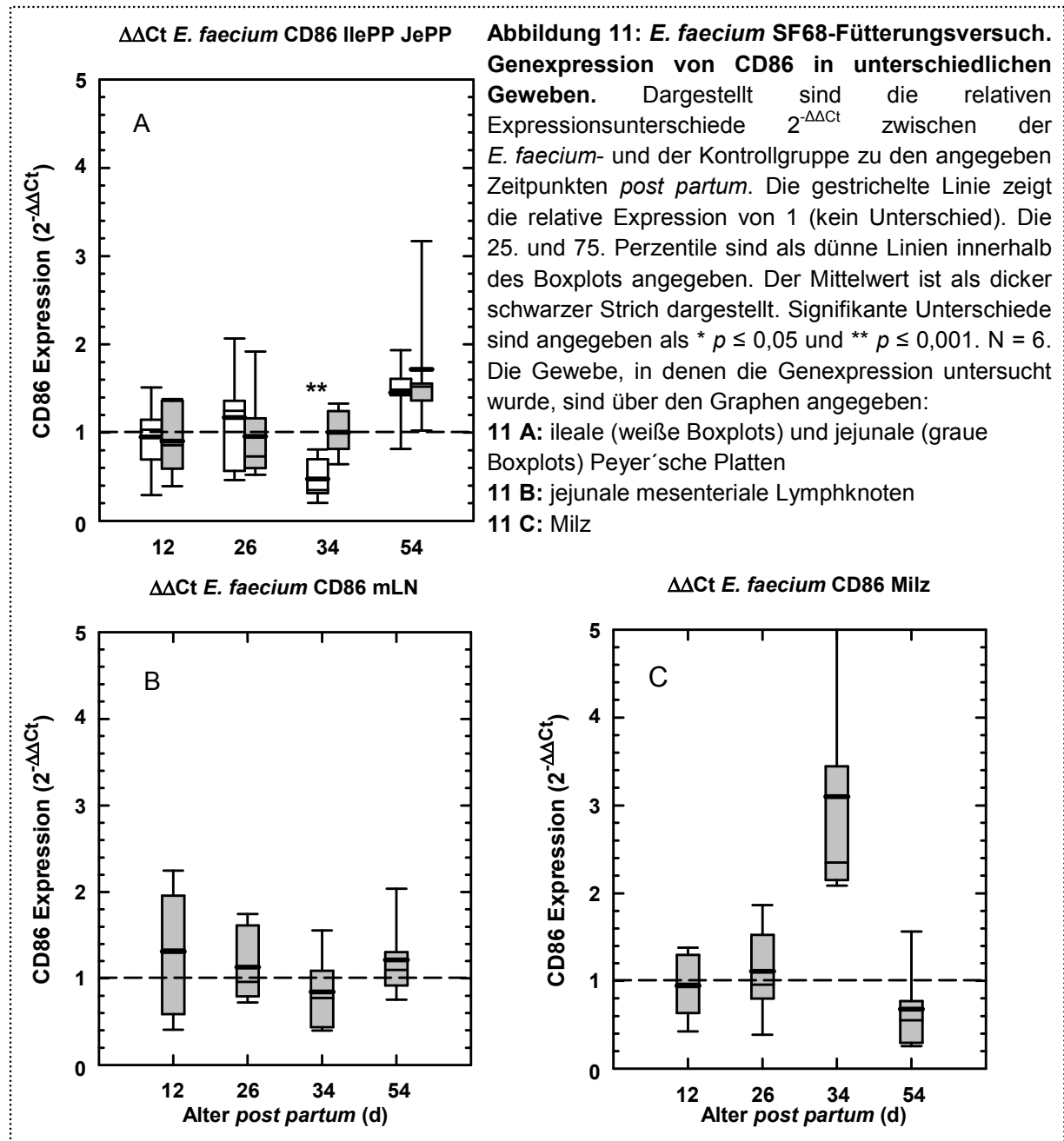
Das Genexpressionsprofil von CTLA4, dem Marker für T-Zell-Anergie und der Herabregulierung des Immunsystems ähnelte dem des anti-inflammatorischen Zytokins IL-

10. Dazu gehörte eine erhöhte Genexpressionsrate in der späten Phase nach dem Absetzen (54 Tage *post partum*) in Geweben der intestinalen Wand (Abbildung 10 A, IlePP und JePP, \*  $p = 0,017$ ) sowie in der Milz (Abbildung 10 C). In den mLN scheint die Expression von CTLA4 nach dem Absetzen (34 Tage *post partum*) ähnlich bzw. leicht erhöht gegenüber der Kontrollgruppe zu sein (Abbildung 10 B). Interessanterweise war CTLA4 auch das einzige untersuchte Gen, welches keine signifikante Reduktion der Genexpressionsrate in den Geweben der Peyer'schen Platten nach dem Absetzen in der *E. faecium*-Gruppe gezeigt hat (Abbildung 10 A; 1,4-fache Reduktion,  $p = 0,065$ ).



Für das ko-stimulierende Molekül CD86 (B7.2) konnte mit Ausnahme einer signifikanten Reduktion des Genexpressionslevels ähnlich der von IL-8 und IL-10 in den ilealen Peyer'schen Platten in der Periode nach dem Absetzen (34 Tage *post partum*) kein

gegenüber der Kontrollgruppe verändertes Genexpressionsprofil beobachtet werden (Abbildung 11 A und B). Es scheint so, als würde das Genexpressionsprofil von CD86 in der Milz mit einer Tendenz zu einer erhöhten Genexpression nach dem Absetzen (34 Tage *post partum*) und einer Rückkehr zum Expressionslevel der Kontrollgruppe an Tag 54 dem von IL-8 entsprechen (vergleiche Abbildung 8 C und Abbildung 11 C). Allgemein scheinen die Genexpressionsprofile von IL-10, CTLA4 und CD86 im Gegensatz zum proinflammatorischen Zytokin IL-8 während der Periode vor dem Absetzen in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten (beides extraintestinal) denen in der Kontrollgruppe zu ähneln.

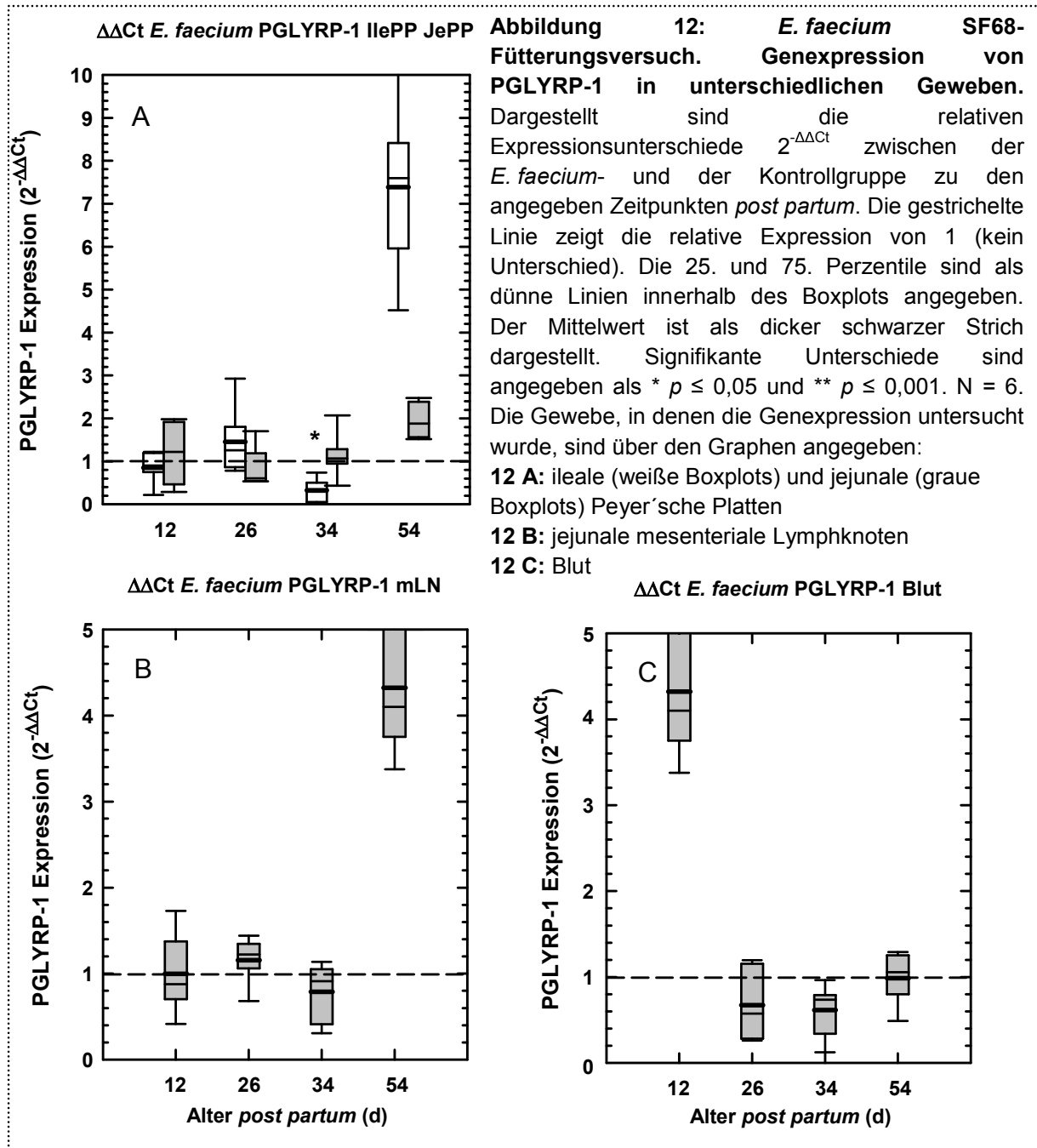


Zusammenfassend konnte im *E. faecium* SF68-Fütterungsversuch mit Sauen und Ferkeln eine inflammatorische Immunantwort, angezeigt durch eine erhöhte Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-8, auf niedrigem Level in Geweben der intestinalen Wand

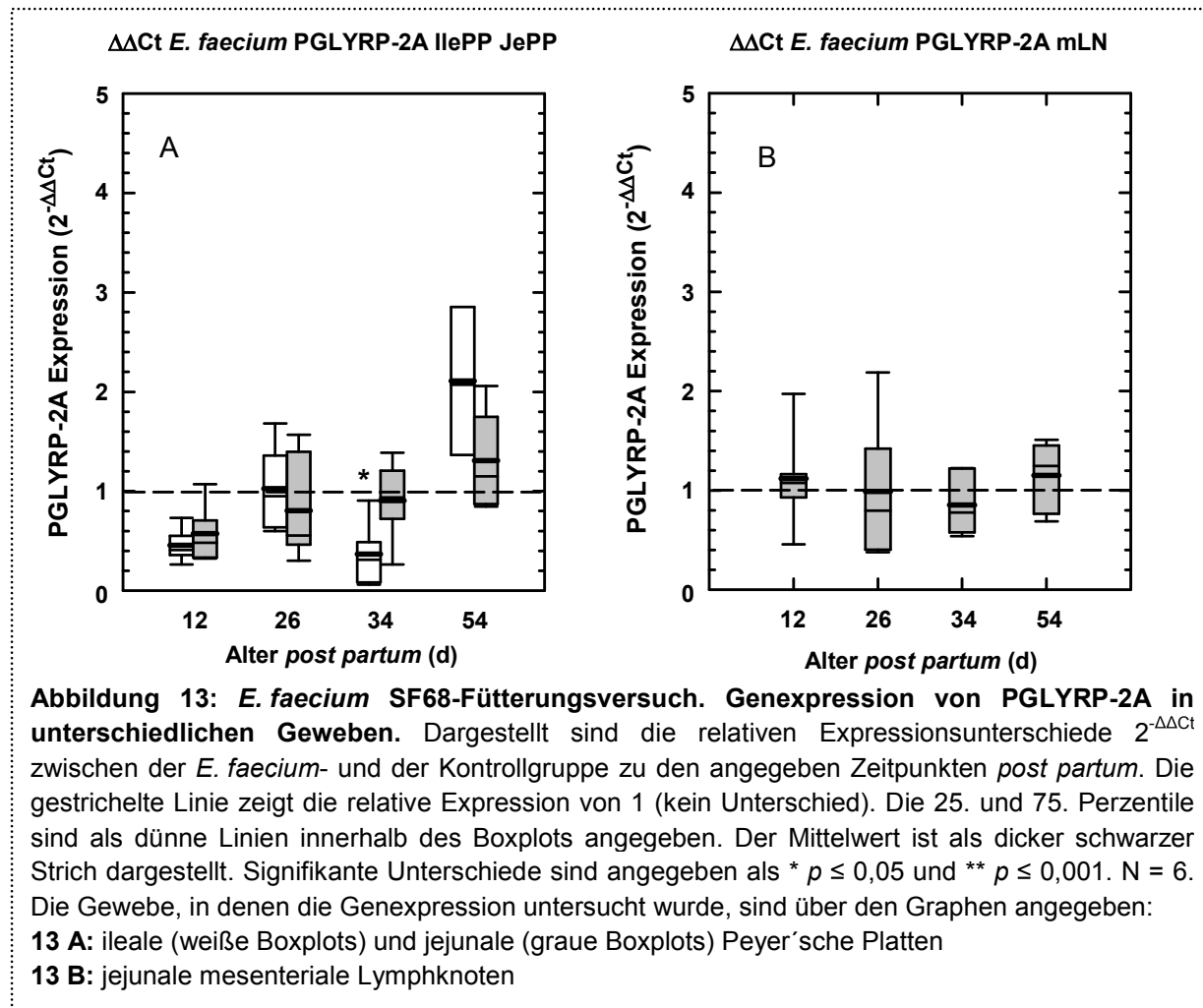
(IlePP und JePP) bei Ferkeln der *E. faecium*-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe vor dem Absetzen im Alter von 12 bis 26 Tagen festgestellt werden. Nach dem Absetzen wurde eine Umkehr hin zu einer Immunsuppression, charakterisiert durch signifikant reduzierte Genexpressionsraten von IL-8 und CD86 in den ilealen Peyer'schen Platten verglichen mit der Kontrollgruppe, beobachtet.

Neben den Zytokinen und Molekülen, die für eine T-Zell-Aktivierung sowie -Regulierung bedeutsam sind, wurde während des *E. faecium*-Fütterungsversuches auch die Genexpression von Proteinen untersucht, die für die Erkennung von pathogenen Bakterien bzw. bakteriellem Peptidoglykan verantwortlich sind. Intrazelluläre Sensoren sind die beiden Nod-Proteine, Nod1 und Nod2, zu den löslichen gehören die Peptidoglykan Recognition Proteine (PGLYRPs). Bei allen untersuchten Genen konnte direkt nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) für die ilealen Peyer'schen Platten eine signifikant reduzierte Genexpression in der *E. faecium*-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 12 - Abbildung 14 A, Abbildung 15 A und C).

Das Genexpressionsprofil von PGLYRP-1 zeigte in der Periode vor dem Absetzen verglichen mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Nach dem Absetzen, im Alter von 34 Tagen, konnte eine signifikant verringerte Genexpression in der *E. faecium*-Gruppe in den IlePP festgestellt werden (Abbildung 12 A; 3,1-fache Reduktion, \*  $p = 0,039$ ). Zum späten Zeitpunkt nach dem Absetzen (54 Tage *post partum*) wurde eine nicht signifikante, aber doch deutlich erhöhte Genexpression in den ilealen Peyer'schen Platten der Probiotika-gefütterten Ferkel gegenüber den Kontrolltieren detektiert (Abbildung 12 A). Für die Genexpression in den mLN konnte in der Periode vor dem Absetzen (12 und 26 Tage *post partum*) sowie direkt nach dem Absetzen, im Alter von 34 Tagen, kein Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Eine tendenziell, aber nicht signifikant erhöhte Genexpression von PGLYRP-1 konnte allerdings zum späten Zeitpunkt nach dem Absetzen (54 Tage *post partum*) festgestellt werden (Abbildung 12 B). Wie Abbildung 12 C zeigt, konnte für die Genexpressionsrate im Vollblut nur zum frühesten Zeitpunkt (12 Tage *post partum*) eine erhöhte Tendenz nachgewiesen werden. Diese war jedoch nicht signifikant. Für die weiteren Zeitpunkte konnten keine Veränderungen der Genexpression von PGLYRP-1 gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden.



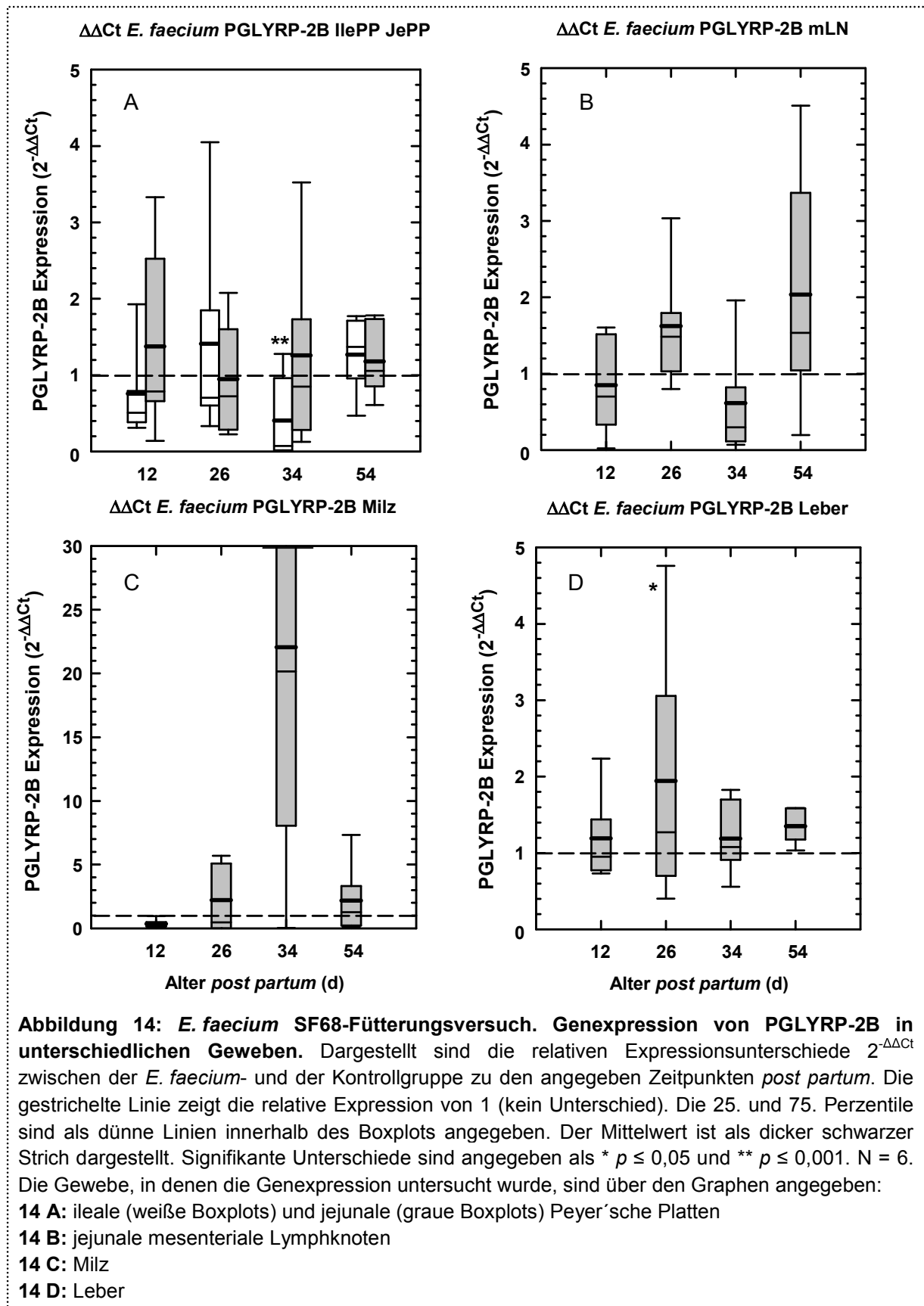
Für die Genexpression von PGLYRP-2A in Geweben der intestinalen Wand (IlePP und JePP) konnte für die 12 Tage alten Ferkel eine tendenziell reduzierte Genexpression gefunden werden, die jedoch nicht signifikant war. Nach dem Absetzen wurde eine signifikant reduzierte Genexpression in den ilealen Peyer'schen Platten detektiert (Abbildung 13 A, 2,7-fache Reduktion, \*  $p = 0,023$ ). Zum späten Zeitpunkt (54 Tage *post partum*) war die Genexpression von PGLYRP-2A in den IlePP leicht erhöht gegenüber den Werten, die für die Kontrollgruppe gefunden wurden. In den mesenterialen Lymphknoten konnte sowohl in der Periode vor als auch nach dem Absetzen kein gegenüber der Kontrollgruppe verändertes Genexpressionsprofil beobachtet werden (Abbildung 13 B).



Die relative Genexpression von PGLYRP-2B zeigte in Geweben der intestinalen Wand eine relativ große Varianz (Abbildung 14 A). Für die Zeitpunkte vor dem Absetzen der Ferkel (12 und 26 Tage *p. p.*) konnten sowohl für die ilealen als auch die jejunalen Peyer'schen Platten keine signifikanten Unterschiede zwischen der *E. faecium*- und der Kontrollgruppe ermittelt werden. Nach dem Absetzen, 34 Tage *p. p.*, war die Genexpression von PGLYRP-2B in den ilealen Peyer'schen Platten signifikant erniedrigt verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 14 A, 2,4-fache Reduktion, \*\*  $p = 0,001$ ). Im Alter von 54 Tagen konnte bei den Ferkeln der Probiotika-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe kein Unterschied bezüglich der Genexpression von PGLYRP-2B ermittelt werden (Abbildung 14 A). Für das Genexpressionsprofil von PGLYRP-2B in den mLN konnten zwar keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe detektiert werden, allerdings war das Genexpressionslevel 34 Tage *p. p.* erniedrigt und stieg zum späten Zeitpunkt (54 Tage *p. p.*) wieder an, sodass es gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht war. Die Werte variierten allerdings stark (Abbildung 14 B). Aufgrund der konstitutiven Expression von PGLYRP-2B in der Leber wurde auch hier die Genexpression relativ zur Expression in der Kontrollgruppe betrachtet. Für den Zeitpunkt kurz vor dem Absetzen (24 Tage *p. p.*) konnte eine signifikant erhöhte Expression von PGLYRP-2B gemessen werden (Abbildung 14 D, 1,94-fache

Erhöhung, \*  $p = 0,025$ ). In Abbildung 14 C ist das Genexpressionsprofil von PGLYRP-2B in der Milz dargestellt. Zwar konnte kein signifikanter Unterschied zur Genexpression in der Kontrollgruppe festgestellt werden, allerdings war die relative Expression zum frühesten Zeitpunkt (12 Tage *p. p.*) um das 2,6-Fache gegenüber der Kontrollgruppe reduziert und nach dem Absetzen, 34 Tage *p. p.*, deutlich erhöht (22-fach,  $p = 0,059$ ). Dieses Genexpressionsprofil in der Milz ähnelt dem des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 (vergleiche Abbildung 8 C und Abbildung 14 C). Die Expressionsprofile von IL-8 und PGLYRP-2 zeigen ein paralleles Bild. Kommt es zu einer reduzierten Genexpression von IL-8 in der Milz bei Ferkeln im Alter von 12 Tagen (3,8-fach, siehe Abbildung 8 C), ist das Expressionslevel von PGLYRP-2B ebenfalls deutlich erniedrigt (2,6-fach, Abbildung 14 C). Eine Erhöhung der IL-8-Genexpression, welche in den *E. faecium*-gefütterten Ferkeln in der Milz 34 Tage *p. p.* gefunden werden konnte, spiegelt sich in einer 22-fach erhöhten Genexpression von PGLYRP-2B im Milzgewebe wider (siehe Abbildung 8 C und Abbildung 14 C). Dementsprechend führte eine verstärkte Expression von IL-8 zu einer gesteigerten Genexpressionsrate von PGLYRP-2B.

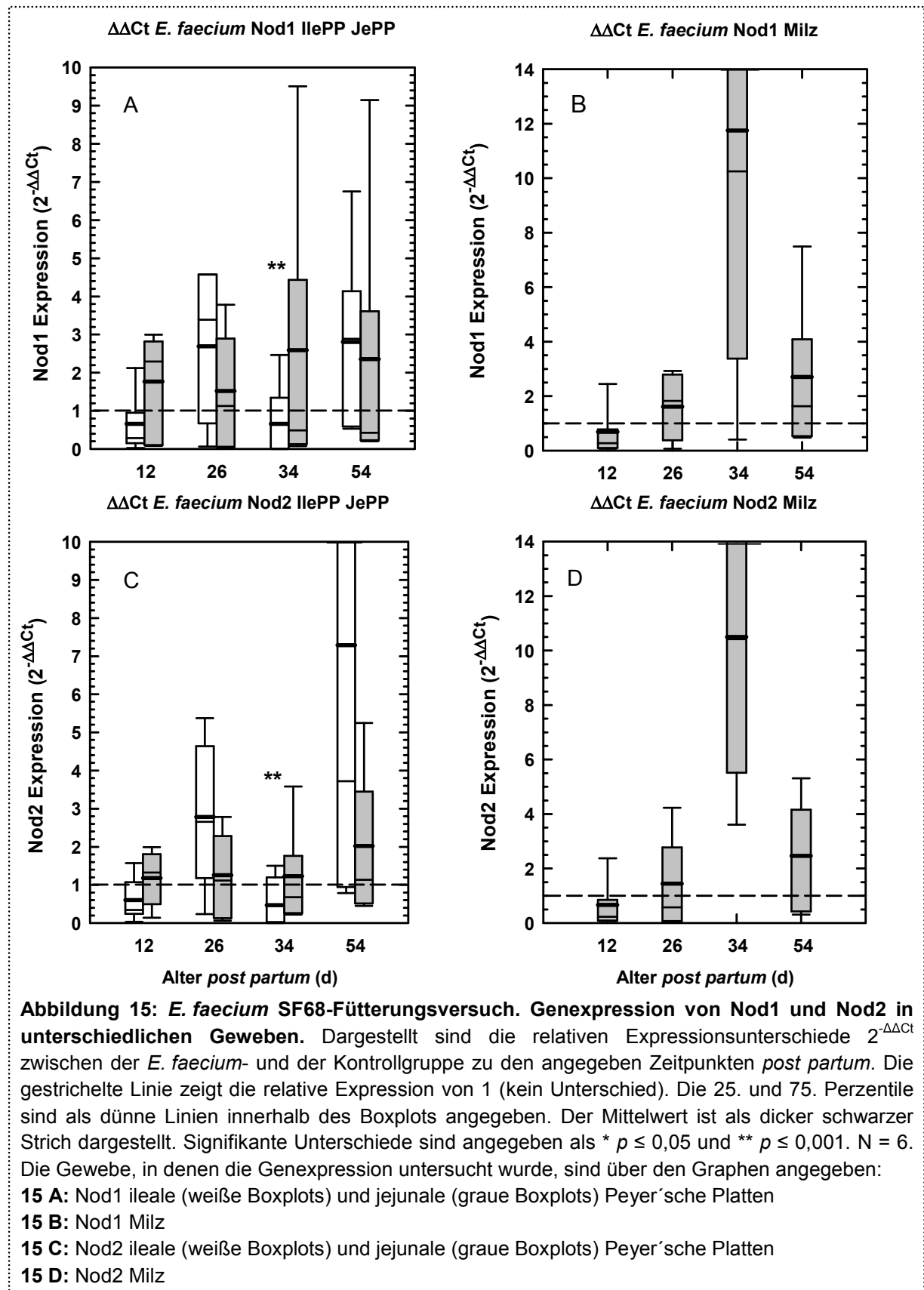




Die Genexpressionsprofile beider Nod-Proteine ähnelten sich sehr. In der Periode vor dem Absetzen konnte für die 12 Tage alten Ferkel eine tendenziell leicht erniedrigte Genexpression in den ilealen Peyer'schen Platten gefunden werden. Im Alter von 26 Tagen

war die Genexpressionsrate in den IlePP gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 15 A und C). Bei beiden Beobachtungen handelt es sich jedoch nur um Tendenzen, nicht um signifikante Ergebnisse. In den jejunalen Peyer'schen Platten zeigte das Genexpressionsprofil in den *E. faecium*-Tieren gegenüber den Kontrolltieren vor dem Absetzen keine Unterschiede (Abbildung 15 A und C). Direkt nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) konnte für beide Nod-Proteine eine signifikante Reduktion der Genexpression detektiert werden (siehe Abbildung 15 A und C, Nod1: 1,5-fach, \*  $p = 0,002$ ; Nod2: 2,1-fach, \*  $p = 0,003$ ). Das Genexpressionsmuster von Nod1 und Nod2 in der Milz ähnelte sowohl dem von PGLYRP-2B als auch dem von IL-8 in der Milz (vergleiche Abbildung 8 C, Abbildung 14 C, Abbildung 15 B und D) mit einer zunächst reduzierten Genexpression im Alter der Ferkel von 12 Tagen und einer stark erhöhten Expression nach dem Absetzen (34 Tage *post partum*), gefolgt von einer nur noch leicht erhöhten Expression in den 54 Tage alten Tieren gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 15 B und D).

Diese parallelen Verläufe der Genexpressionsmuster zeigen den engen Kontakt an, in dem diese Gene zueinander stehen. Erhöhte bzw. verringerte Genexpressionsraten wirken sich auf die jeweils anderen Gene aus.

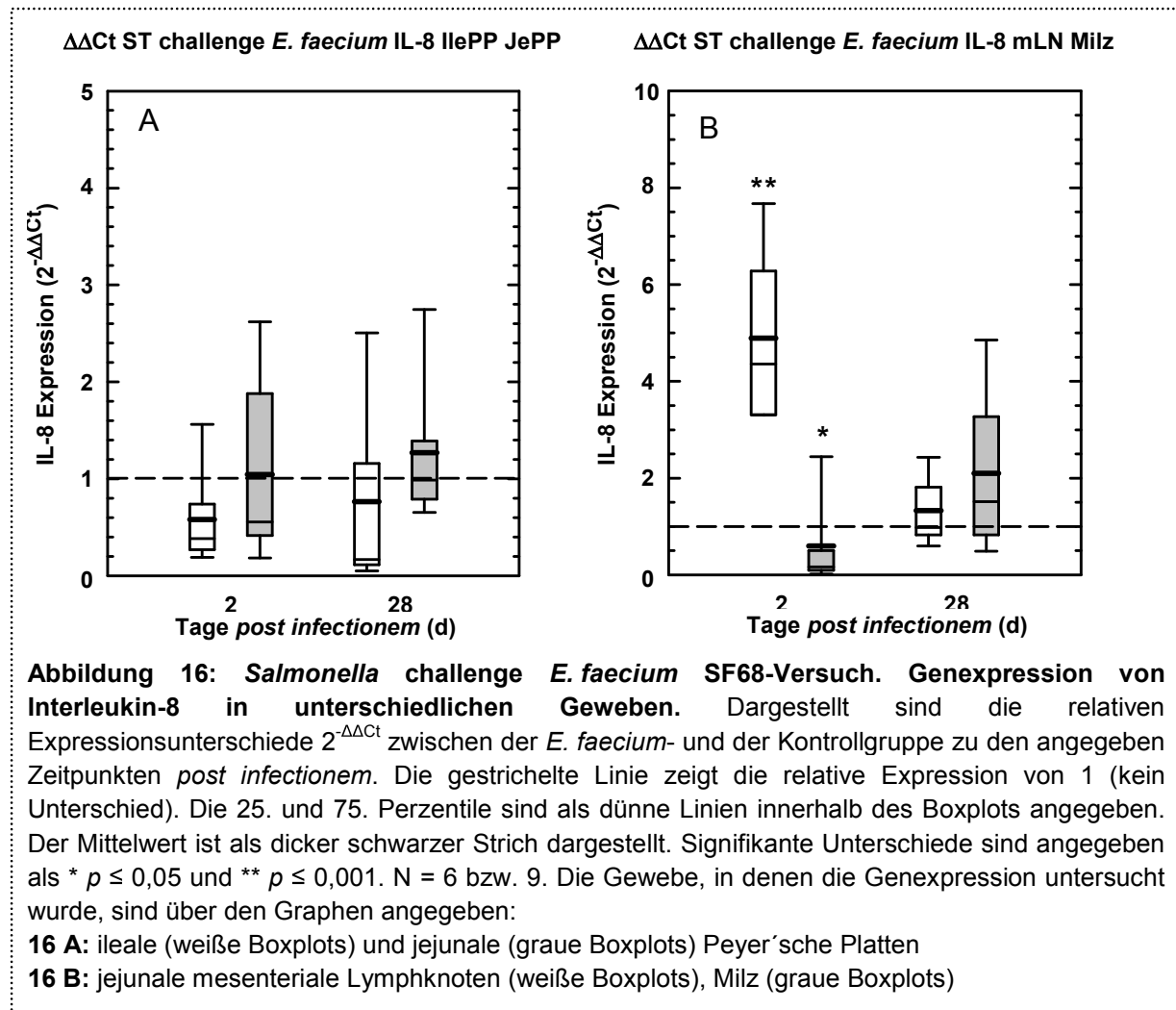


#### 4.1.2. **Salmonella challenge E. faecium SF68-Versuch**

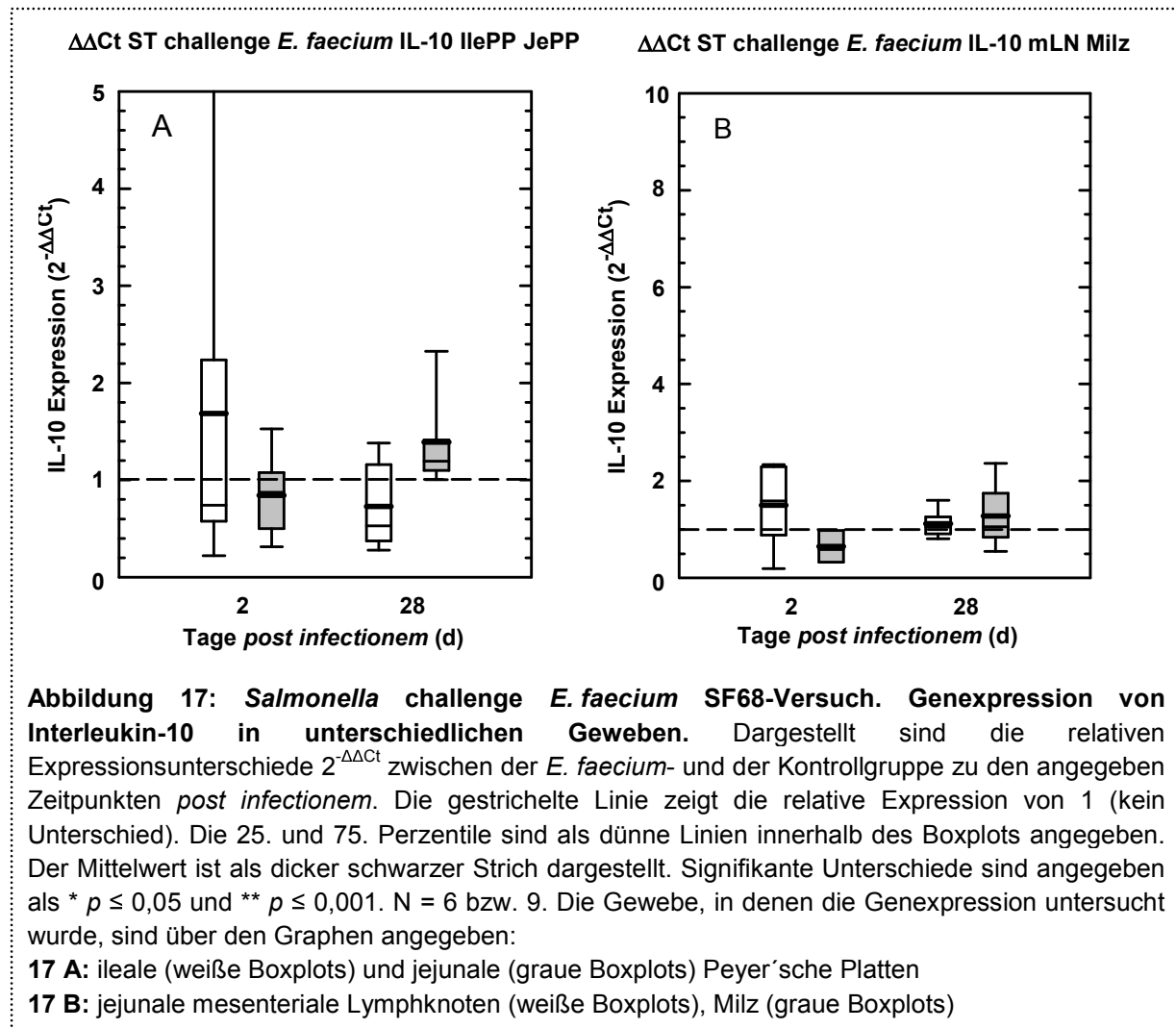
Basierend auf den Ergebnissen des *E. faecium* SF68-Fütterungsversuches, bei dem Unterschiede in den Genexpressionsprofilen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 sowie weiterer immunologisch bedeutsamer Moleküle in der mit dem Probiotikum-gefütterten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe detektiert werden konnten, stand nun im Vordergrund, wie die Genexpressionsprofile sich hinsichtlich einer anschließenden Infektion mit *Salmonella* verhalten würden. Die Ferkel wurden im Alter von 38 Tagen mit *Salmonella* DT104 intragastral infiziert. Es wurden die gleichen Gewebeproben wie im Fütterungsversuch genommen. Die Schlachtung und Beprobung der Tiere fand 2 (je 6 Tiere pro Gruppe) bzw. 28 Tage (je 9 Tiere pro Gruppe) nach der Infektion statt. Die Auswahl der Zeitpunkte erfolgte aufgrund von Ergebnissen aus einem vorherigen *Salmonella* challenge Versuch aus der Forschergruppe 438 [22, 738]. Damals wurde beobachtet, dass zum frühen Zeitpunkt (2 Tage *post infectionem*) die Zytotoxizität von PBMCs gegenüber infizierten intestinalen Epithelzellen reduziert ist und eine verringerte Proliferation auftrat [738, 744]. Zum späten Zeitpunkt (28 Tage *post infectionem*) waren diese Parameter in den *E. faecium*-gefütterten Tieren gegenüber den Kontrolltieren verbessert [738, 744].

Mit Hilfe des nun durchgeführten Versuches konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von Ferkeln mit *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) das Zytokin-Expressionsprofil während einer Infektion mit *Salmonella* DT104 verändert.

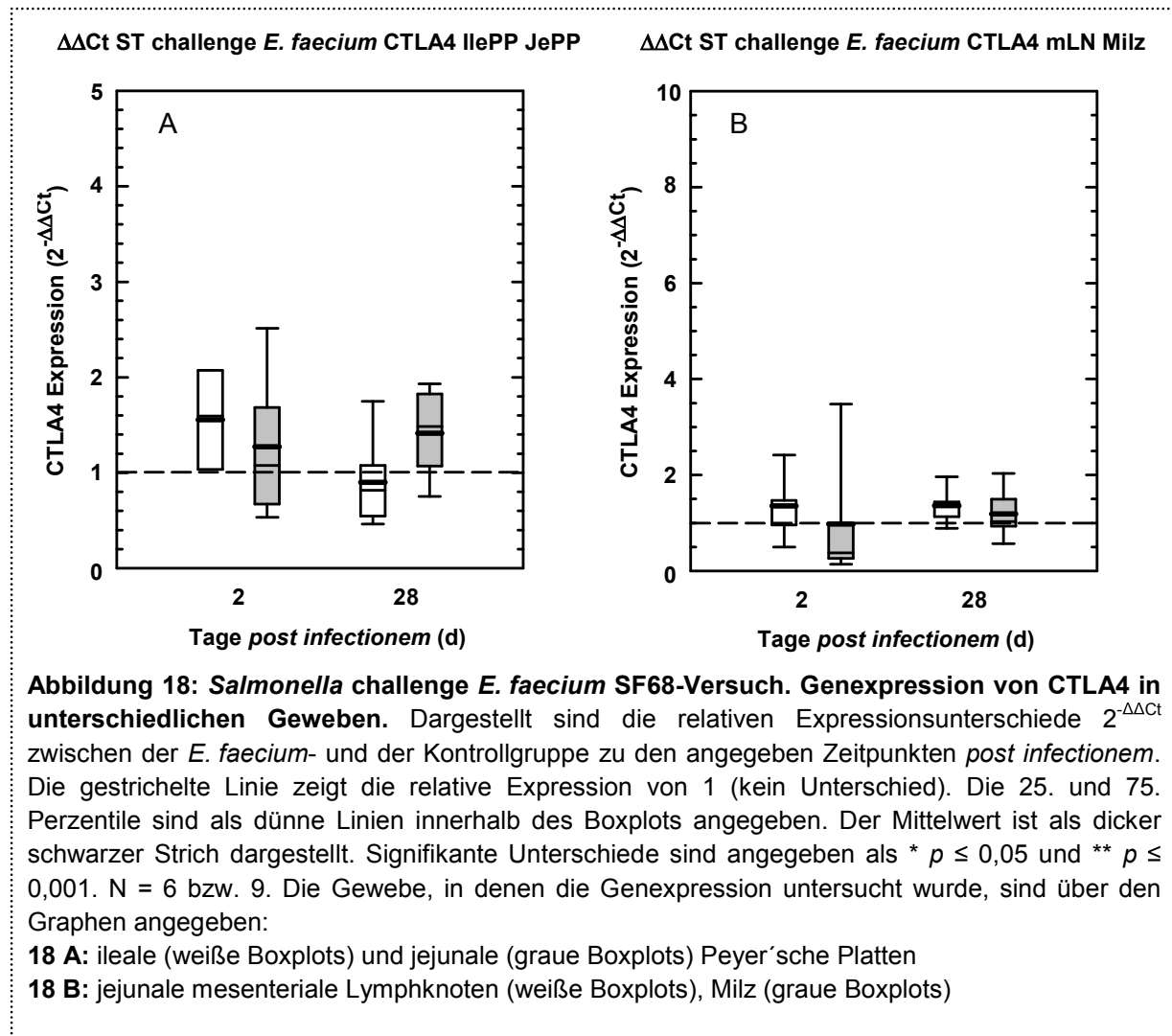
Wie in Abbildung 16 A dargestellt, scheint das IL-8-Genexpressionslevel in den ilealen Peyer'schen Platten der *E. faecium*-gefütterten Tieren gegenüber den Kontrolltieren 2 Tage nach der Infektion tendenziell erniedrigt zu sein. In der Milz war die Genexpression von IL-8 trotz der erhöhten Genexpressionsraten, die während des *E. faecium*-Fütterungsversuches 34 Tage *p. p.* beobachtet wurden (vergleiche Abbildung 8 C), 2 Tage *post infectionem* signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 16 B, 1,7-fache Reduktion, \*  $p = 0,043$ ). Außerdem war die Genexpression von IL-8 in den mLN 2 Tage *p. i.* signifikant erhöht (Abbildung 16 B, 4,9-fache Erhöhung, \*\*  $p = 0,001$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Kreuzer *et al.* überein, die in derselben Tierversuchsstudie eine erhöhte Keimzahl in den mLN detektieren konnten [482].



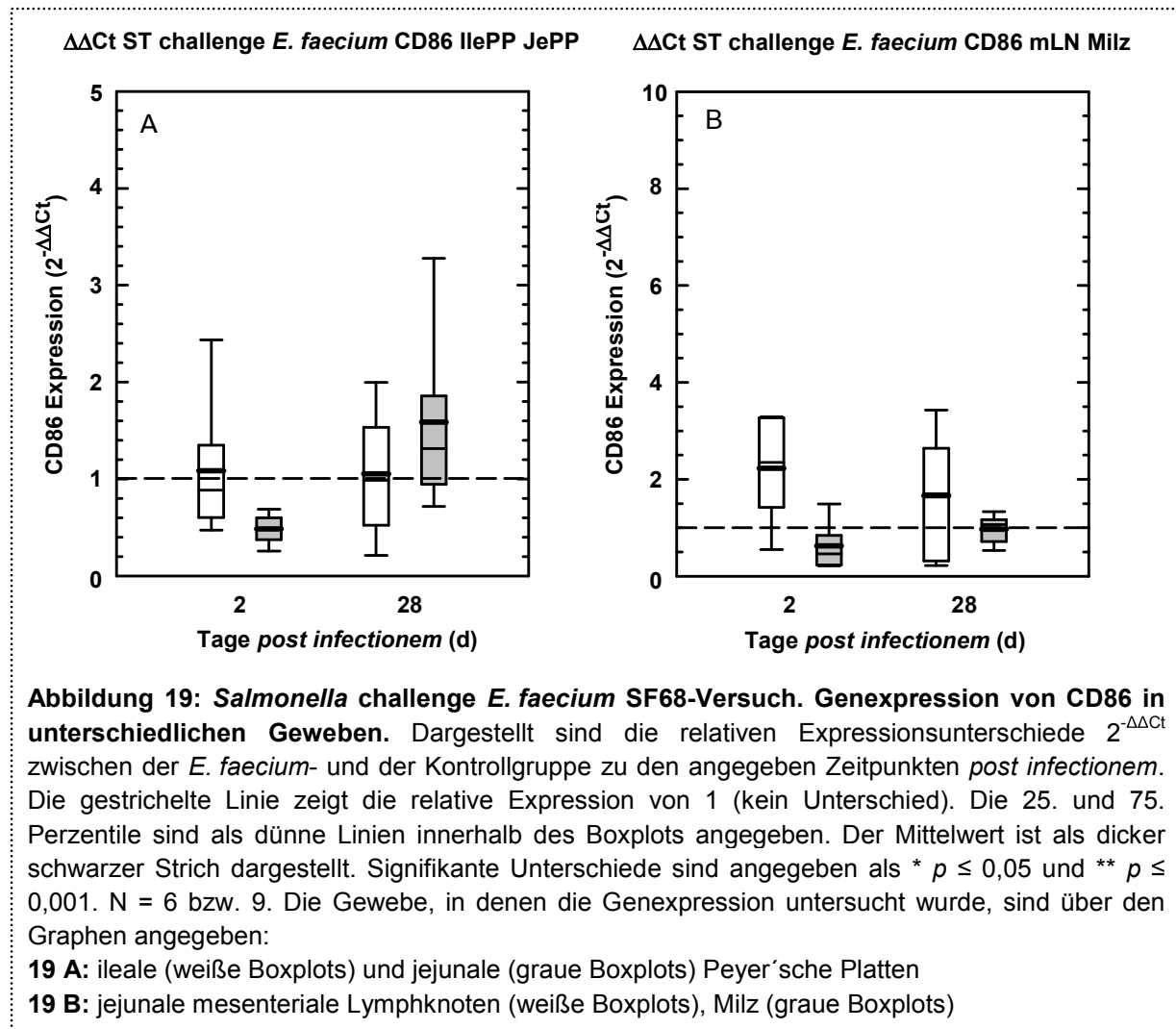
Die Genexpression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 scheint vergleichbar mit der Expression in den Kontrolltieren zu sein, mit der Tendenz zu einer erhöhten Genexpressionsrate in den ilealen Peyer'schen Platten zwei Tage nach der Infektion (Abbildung 17 A). In der Milz war die Expression zwei Tage *post infectionem* gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt (Abbildung 17 B, 1,5-fache Reduktion,  $p = 0,069$ ).



Auch wenn die Ergebnisse nicht statistisch signifikant sind, so scheinen die Genexpressionslevel von CTLA-4 in Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) leicht erhöht zu sein (Abbildung 18 A). Für die mesenterialen Lymphknoten und die Milz konnte keine gegenüber der Kontrollgruppe veränderte Genexpression von CTLA4 festgestellt werden (Abbildung 18 B).

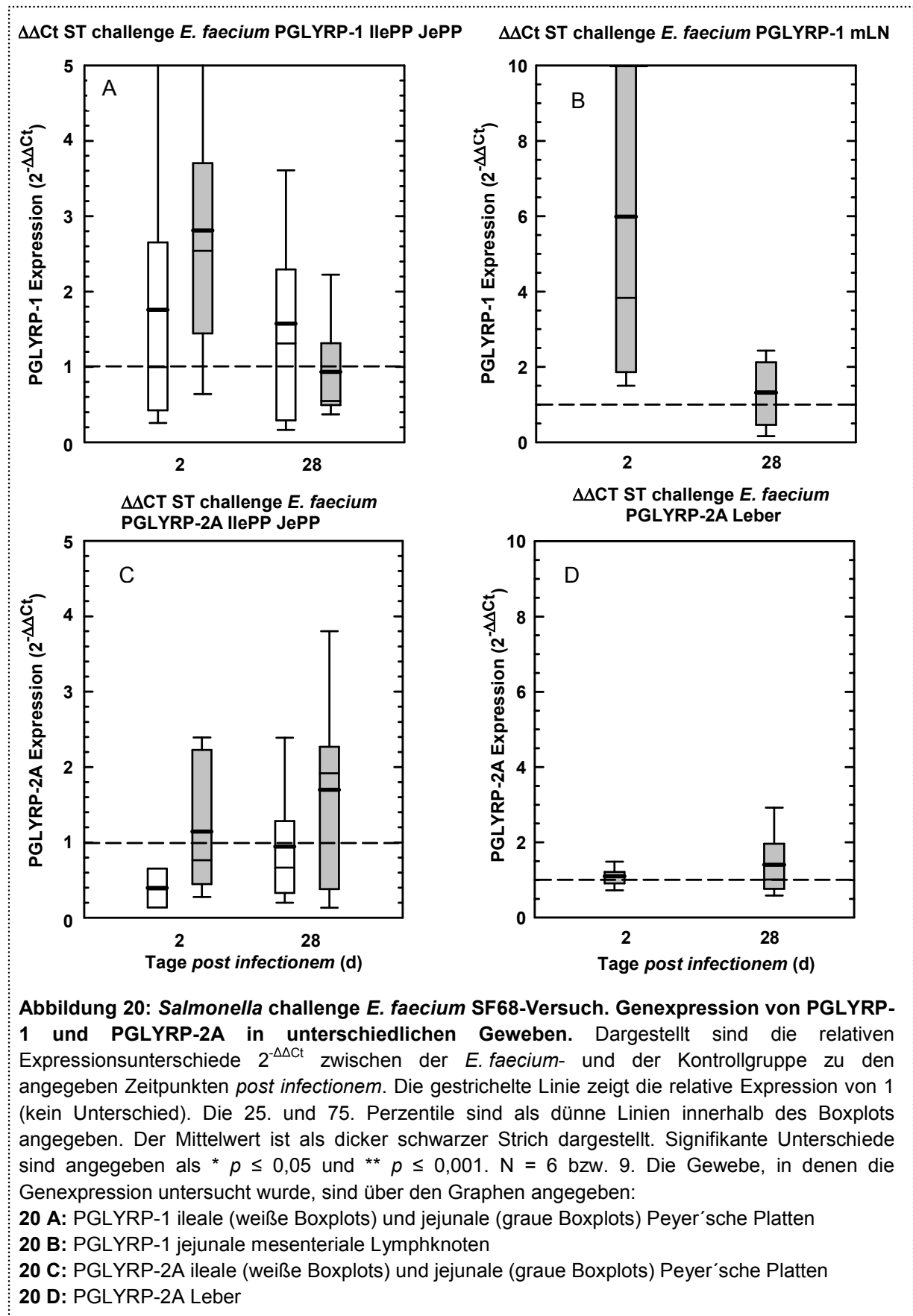


Ähnlich wie beim Fütterungsversuch scheint das Genexpressionsprofil von CD86 (B7.2) auch im challenge Versuch parallel zu dem von IL-8 zu sein. Vor allem in den Lymphknoten konnten mit erhöhten Genexpressionsraten 2 Tage *post infectionem* ähnliche Ergebnisse gefunden werden (siehe Abbildung 16 B und Abbildung 19 B). Des Weiteren konnten in der Milz trotz deutlich erhöhter Genexpressionswerte, die 34 Tage *post partum* im *E. faecium*-Fütterungsversuch beobachtet werden konnten (vergleiche Abbildung 11 C), im *Salmonella* challenge Versuch reduzierte Genexpressionsraten von CD86 2 Tage *post infectionem* gefunden werden (Abbildung 19 B, 1,6-fache Reduktion,  $p = 0,067$ ). Eine tendenziell erniedrigte Genexpression von CD86 konnte allerdings in den jejunalen Peyer'schen Platten relativ zur Kontrollgruppe ermittelt werden, was nicht dem Expressionsprofil von IL-8 in den JePP entspricht (siehe Abbildung 16 A und Abbildung 19 A).



In Abbildung 20 sind die Genexpressionsprofile von PGLYRP-1 und -2A dargestellt. Die Expression von PGLYRP-1 war 2 Tage nach der Infektion sowohl in den ilealen als auch in den jejunalen Peyer'schen Platten tendenziell erhöht (Abbildung 20 A und C). Dagegen scheint die Expression von PGLYRP-2A in den ilealen Peyer'schen Platten eher erniedrigt gegenüber der Genexpression in der Kontrollgruppe zu sein ( $p = 0,063$ ). Dieses Profil ähnelt dem von IL-8 (vergleiche Abbildung 20 C und Abbildung 16 A). Zum späten Zeitpunkt (28 Tage *p. i.*) konnte für PGLYRP-1 eine tendenziell geringfügig erhöhte Expression in den IlePP beobachtet werden, eine verstärkte Genexpression von PGLYRP-2A war eher in den JePP zu detektieren (Abbildung 20 A und C). Betrachtet man das Expressionsprofil von PGLYRP-1 in den mLN, so zeigte sich eine im Gegensatz zur Kontrollgruppe verstärkte Expression 2 Tage nach der Infektion (Abbildung 20 B). Ein ähnliches Genexpressionsprofil in den mLN konnte für IL-8 beobachtet werden (vergleiche Abbildung 20 B und Abbildung 16 B). Die Genexpression von PGLYRP-2A in der Leber unterschied sich in der *E. faecium*-Gruppe nicht von der Expression in der Kontrollgruppe (Abbildung 20 D).





Das Genexpressionsprofil von PGLYRP-2B ist in Abbildung 21 gezeigt. In den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten konnten keine Unterschiede bezüglich der Genexpression im

Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 21 A). In der Milz war die Expression von PGLYRP-2B 2 Tage *p. i.* tendenziell erhöht, in der Leber ebenfalls (Abbildung 21 B). 28 Tage *p. i.* konnten keine Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe bezüglich der PGLYRP-2B-Expression detektiert werden.

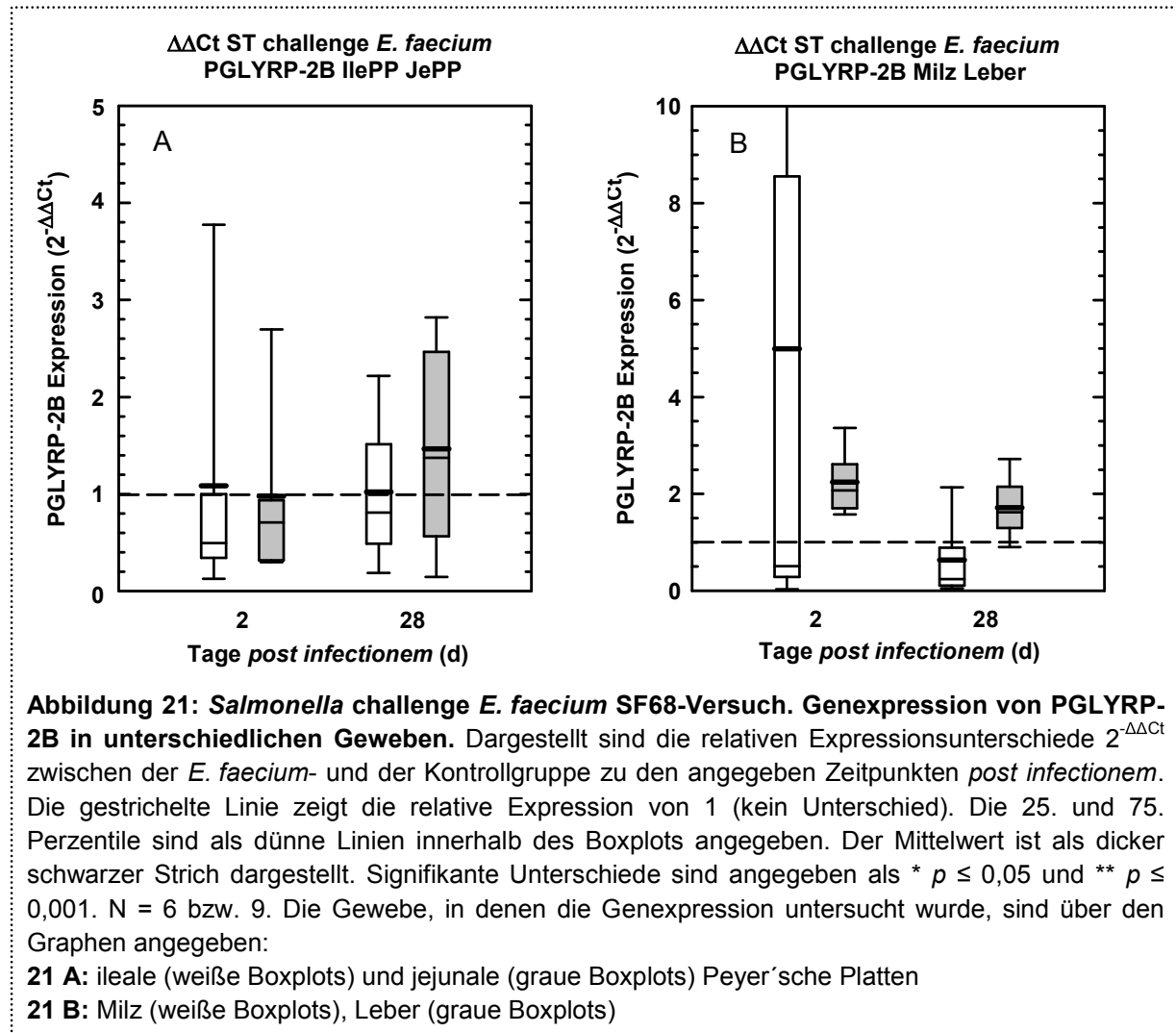
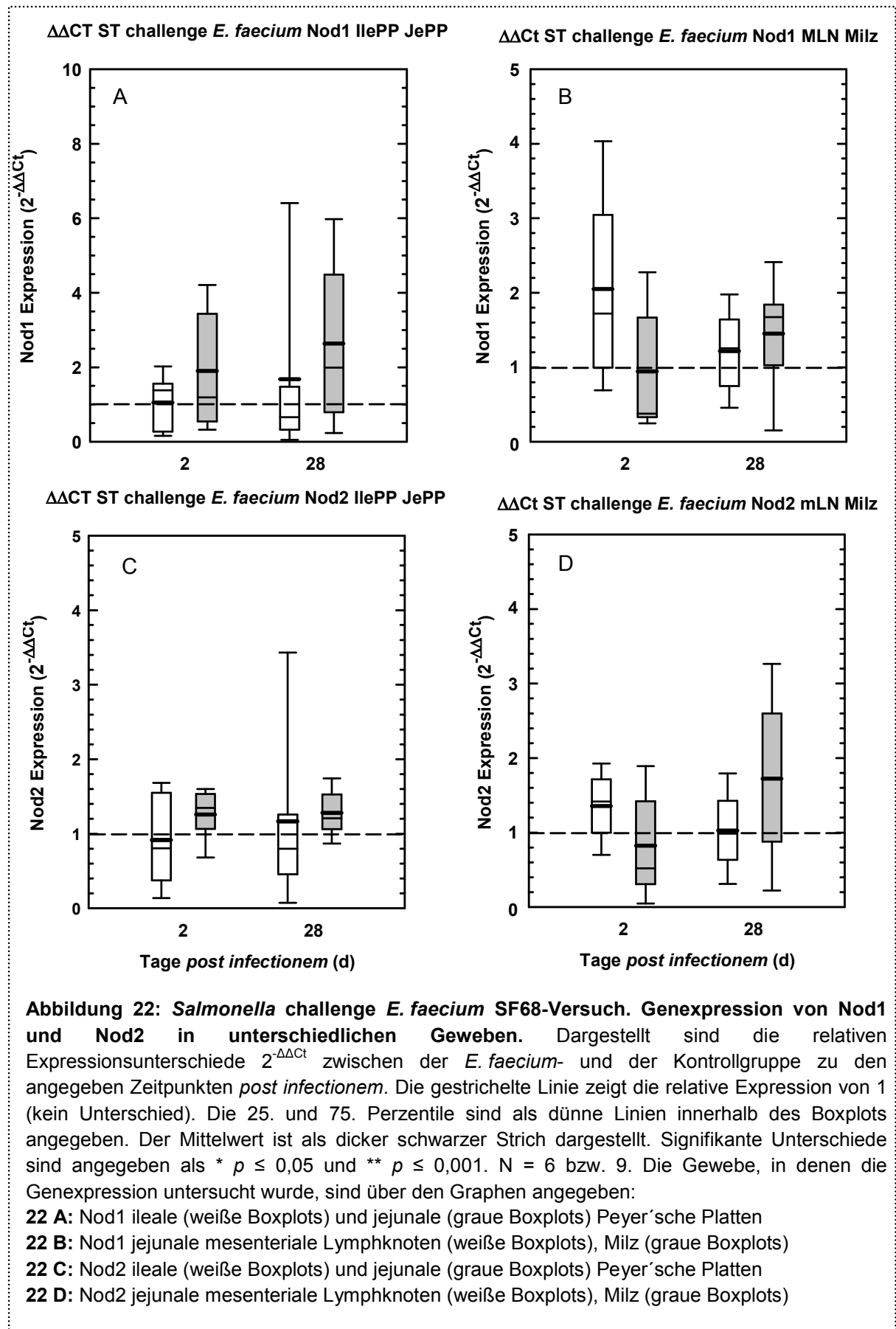


Abbildung 22 zeigt die Genexpressionsraten von Nod1 und Nod2. Bezüglich der Expression in den Peyer'schen Platten konnte nur für Nod1 in den JePP eine tendenziell gesteigerte Expression beim Vergleich mit der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 22 A und C). Ferner konnte 2 Tage *post infectionem* eine tendenziell erhöhte Expression von Nod1 und Nod2 in den mesenterialen Lymphknoten festgestellt werden. Dieses Bild in den mLN ähnelt der Expression von PGLYRP-1 und IL-8 (vergleiche Abbildung 22 B, Abbildung 20 B und Abbildung 16 B). Die Genexpressionsprofile von Nod1 und Nod2 zeigten in allen untersuchten Geweben (IlePP, JePP, mLN, Milz) ein ähnliches Muster.



**Abbildung 22: *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch. Genexpression von Nod1 und Nod2 in unterschiedlichen Geweben.** Dargestellt sind die relativen Expressionsunterschiede  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  zwischen der *E. faecium*- und der Kontrollgruppe zu den angegebenen Zeitpunkten *post infectionem*. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Expression von 1 (kein Unterschied). Die 25. und 75. Perzentile sind als dünne Linien innerhalb des Boxplots angegeben. Der Mittelwert ist als dicker schwarzer Strich dargestellt. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,001$ . N = 6 bzw. 9. Die Gewebe, in denen die Genexpression untersucht wurde, sind über den Graphen angegeben:

**22 A:** Nod1 ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

**22 B:** Nod1 jejunale mesenteriale Lymphknoten (weiße Boxplots), Milz (graue Boxplots)

**22 C:** Nod2 ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

**22 D:** Nod2 jejunale mesenteriale Lymphknoten (weiße Boxplots), Milz (graue Boxplots)

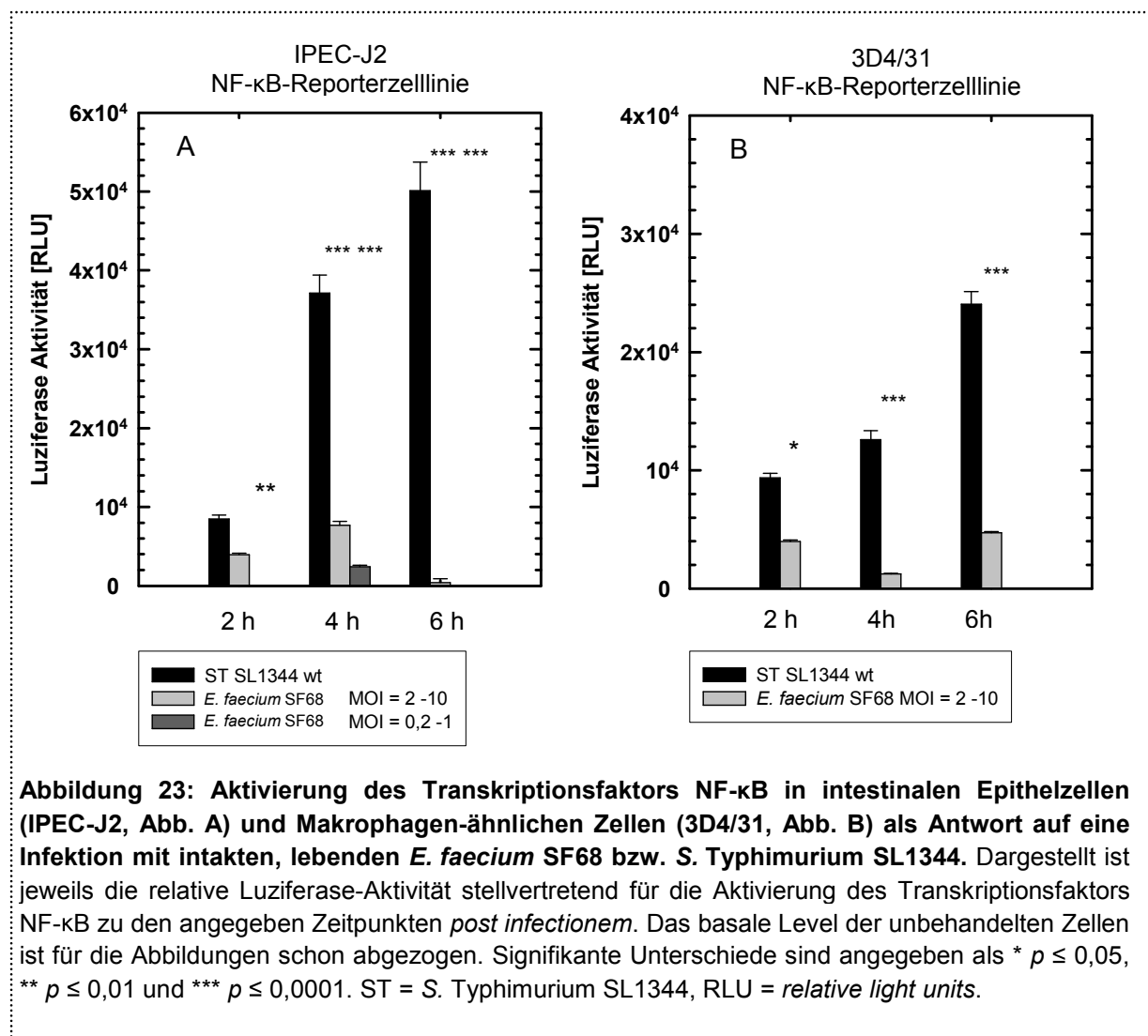
## **4.2. Einfluss von *E. faecium* SF68 auf die Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B**

Um die Wirkungsweise des probiotischen Stammes *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) hinsichtlich seiner Effekte auf das angeborene Immunsystem genauer untersuchen zu können, wurde die Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B betrachtet. Für die Untersuchungen wurden permanente NF- $\kappa$ B-Reporterzelllinien verwendet. Das Reporterkonstrukt, welches für die Transduktion der Zellen verwendet wurde, enthält hintereinander folgende NF- $\kappa$ B-Erkennungssequenzen vor einem minimalen Promotor, der die Expression einer Glühwürmchen-Luziferase kontrolliert. Diese beeinflussen einen Promotor, der die Expression einer Luziferase kontrolliert. Nach chromosomaler Integration kann die Aktivität der Luziferase stellvertretend für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden. Dabei werden die gemessenen Werte als *relative light units* (RLU) ausgegeben. So wurde die Untersuchung des Einflusses von *E. faecium* SF68 auf den zentralen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ermöglicht. Die Zellen wurden hierzu über unterschiedlich lange Zeiträume mit intakten, lebenden aber auch mit durch Gentamycin abgetöteten oder mittels FastPrep<sup>®</sup> lysierten *E. faecium* SF68 behandelt. Zum Teil erfolgten noch zusätzlich zur Behandlung mit *E. faecium* SF68 Infektionen mit *S. Typhimurium* SL1344, um zu testen, welchen Einfluss das Probiotikum auf die durch *Salmonella* ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer Assay aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen.

### **4.2.1. Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf die Inkubation mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68**

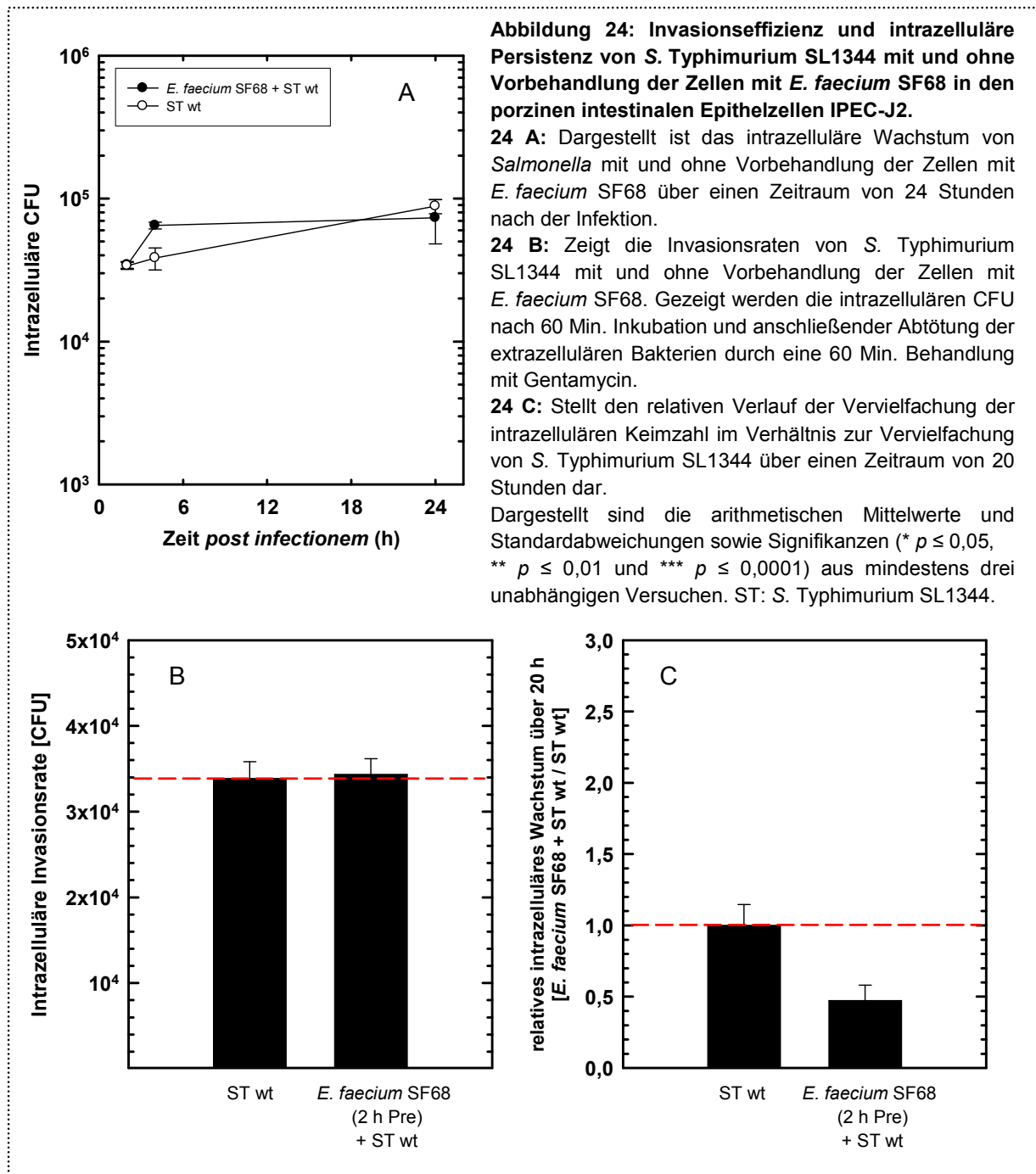
Zunächst sollte getestet werden, welchen Effekt intakte, lebende *E. faecium* SF68 auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B haben. Dazu wurden sowohl intestinale Epithelzellen (IPEC-J2) als auch Makrophagen-ähnliche Zellen (3D4/31) mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68 über 2, 4 und 6 Stunden behandelt (MOI = 0,2 – 1 bzw. 2 – 10). Eine längere Behandlungsdauer mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68 war nicht möglich, da die Bakterien durch die Bildung von Milchsäure das Zellkulturmedium ansäuern und es im Folgenden aufgrund des sinkenden pH-Wertes zum Absterben der Zellen kommt. Die Behandlung mit den intakten, lebenden *E. faecium* SF68 erfolgte relativ zu unbehandelten Zellen und im Vergleich zu einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (MOI = 2 – 10). Abbildung 23 A und B stellen die Ergebnisse für die Behandlung der Zellen mit intakten, lebenden *E. faecium* im Vergleich zu einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 dar. Dabei wird deutlich, dass *E. faecium* unabhängig von der eingesetzten Bakteriendichte (IPEC-J2) sowohl in den Makrophagen als auch in den Epithelzellen im Gegensatz zu *S. Typhimurium* SL1344 nur in sehr geringem Maß zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Für die Infektion mit *Salmonella* konnte ein deutlicher, kontinuierlicher Anstieg der Luziferase-Aktivität über sechs Stunden detektiert

werden (Abbildung 23 A und B). Die durch die Behandlung mit *E. faecium* SF68 ausgelöste Aktivierung von NF-κB war signifikant niedriger im Vergleich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors als Antwort auf die Infektion mit *Salmonella*. In den intestinalen Epithelzellen war die NF-κB-Aktivierung durch *E. faecium* SF68 zu allen drei untersuchten Zeitpunkten für die verwendete MOI von 0,2 – 1 ( $10^5$  Bakterien/ml) signifikant niedriger als die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste (Abbildung 23 A, 2 h: \*\*  $p = 0,002$ ; 4 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 24 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Für die höhere MOI von 2 – 10 war nur zum 2-h-Zeitpunkt keine Signifikanz ermittelbar (Abbildung 23 A, 4 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 24 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Bei den 3D4/31 Makrophagen war die Aktivierung von NF-κB als Antwort auf *E. faecium* SF68 für die MOI = 2 – 10 zu allen drei untersuchten Zeitpunkten ebenfalls signifikant gegenüber der durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelösten NF-κB-Aktivierung verringert (Abbildung 23 B, 2 h: \*  $p = 0,02$ ; 4 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 24 h: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).



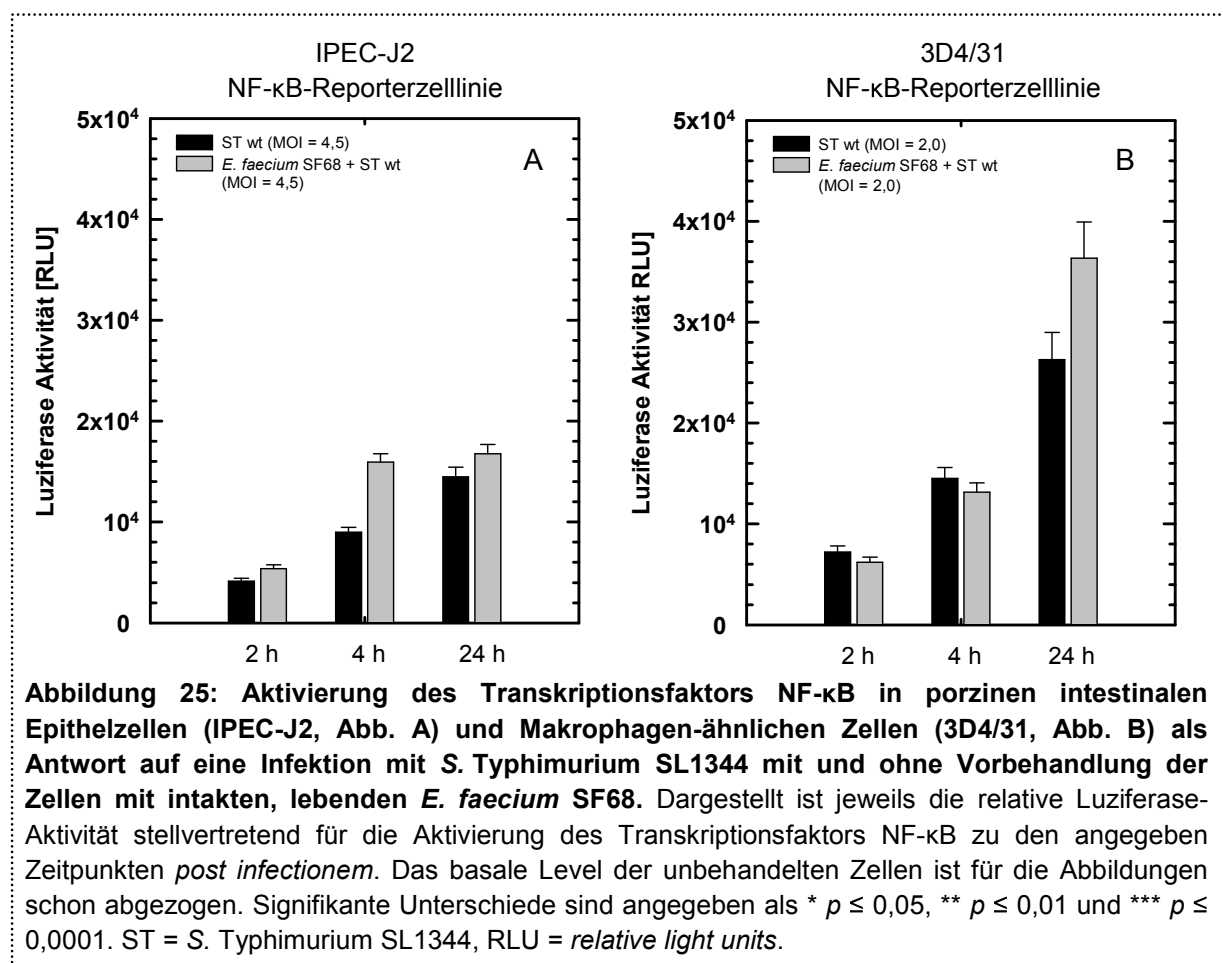
#### **4.2.2. Beeinflussung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 durch eine Vorinkubation der Zellen mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68**

Für diese Fragestellung wurden die Zellen über zwei Stunden mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68 vorbehandelt (MOI = 2 – 10). Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und die Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (MOI = 2 – 10). Nach einstündiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit 100  $\mu$ g/ml Gentamycin abgetötet und nach einer weiteren Stunde wurde das Medium erneut gegen Medium mit 50  $\mu$ g/ml Gentamycin getauscht. Es sollte überprüft werden, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit dem probiotischen Bakterienstamm *E. faecium* SF68 einen Einfluss auf die durch *Salmonella* ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat. Daneben wurde parallel auch eine CFU-Bestimmung durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Vorbehandlung mit *E. faecium* SF68 die Invasionseffizienz oder das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* beeinflusst. In Abbildung 24 ist die Invasionseffizienz und die intrazelluläre Persistenz von *S. Typhimurium* SL1344 beispielhaft für die porzinen intestinalen Epithelzellen mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68 dargestellt. Es konnten hinsichtlich der Invasionsrate sowie des intrazellulären Wachstums keine signifikanten Unterschiede bei einer Vorbehandlung der Zellen mit dem Probiotikum *E. faecium* SF68 gegenüber keiner Vorbehandlung gefunden werden (Abbildung 24). Dementsprechend scheint die Vorbehandlung mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68 über zwei Stunden vor der Infektion mit *Salmonella* keinen wesentlichen Einfluss auf die Invasion und die intrazelluläre Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 zu haben.



Wird allerdings der Einfluss einer zweistündigen Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68 auf die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B untersucht, so konnte gezeigt werden, dass sowohl in intestinalen Epithelzellen als auch in Makrophagen-ähnlichen Zellen erhöhte Luziferase-Aktivitäten nach Vorbehandlung gemessen werden konnten (Abbildung 25 A und B). In den intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 war die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu allen drei untersuchten Zeitpunkten bei einer Vorbehandlung mit *E. faecium* SF68 und anschließender *Salmonella*-Infektion gegenüber einer Infektion mit *Salmonella* ohne Vorbehandlung erhöht (Abbildung 25 A). Für die 3D4/31 Makrophagen konnte nur 24 Stunden *post infectionem* eine deutlich erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach Vorbehandlung mit *E. faecium* SF68 gefunden werden

(Abbildung 25 B, um 38 % erhöht,  $p = 0,054$ ). Eine Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68 hat dementsprechend zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Invasionsrate und intrazelluläre Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344, allerdings konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine erhöhte Luziferase-Aktivität und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B detektiert werden. Neben der Verwendung von Gentamycin zum Abtöten der nach dem Mediumwechsel verbliebenen *E. faecium* und extrazellulären *S. Typhimurium* SL1344 eine Stunde *p. i.* wurde auch ein zweiter Ribosomenhemmer, Streptomycin, eingesetzt. Es konnten mit Streptomycin ähnliche Ergebnisse wie mit Gentamycin erzielt werden. Auch hier war die NF- $\kappa$ B-Aktivierung erhöht, nachdem die Zellen zunächst mit *E. faecium* SF68 vorinkubiert worden waren und anschließend mit *S. Typhimurium* SL1344 infiziert wurden. Diese Daten werden hier nicht gezeigt.

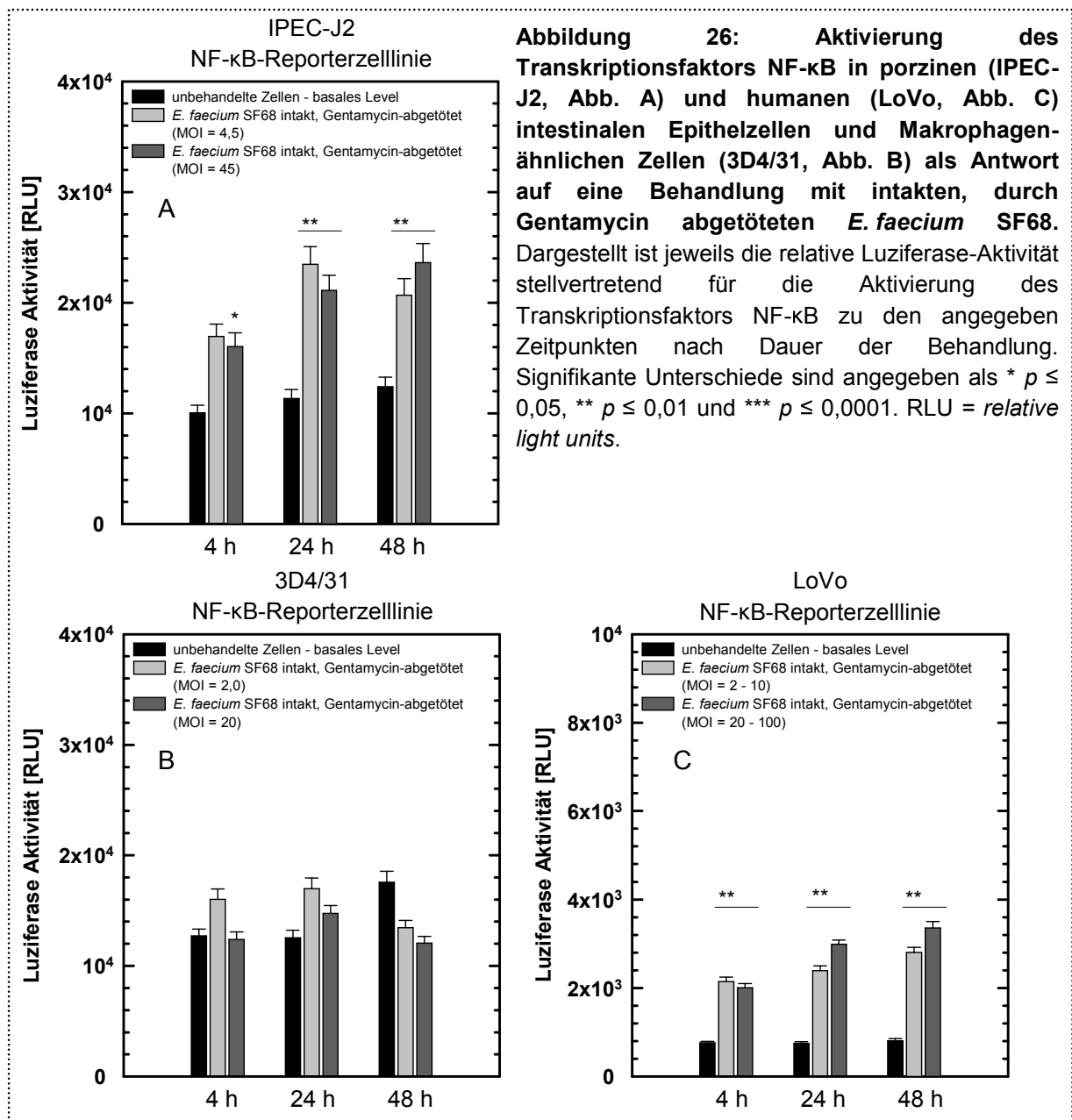


#### 4.2.3. Kurz- und langfristige Behandlung der Zellen mit intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68

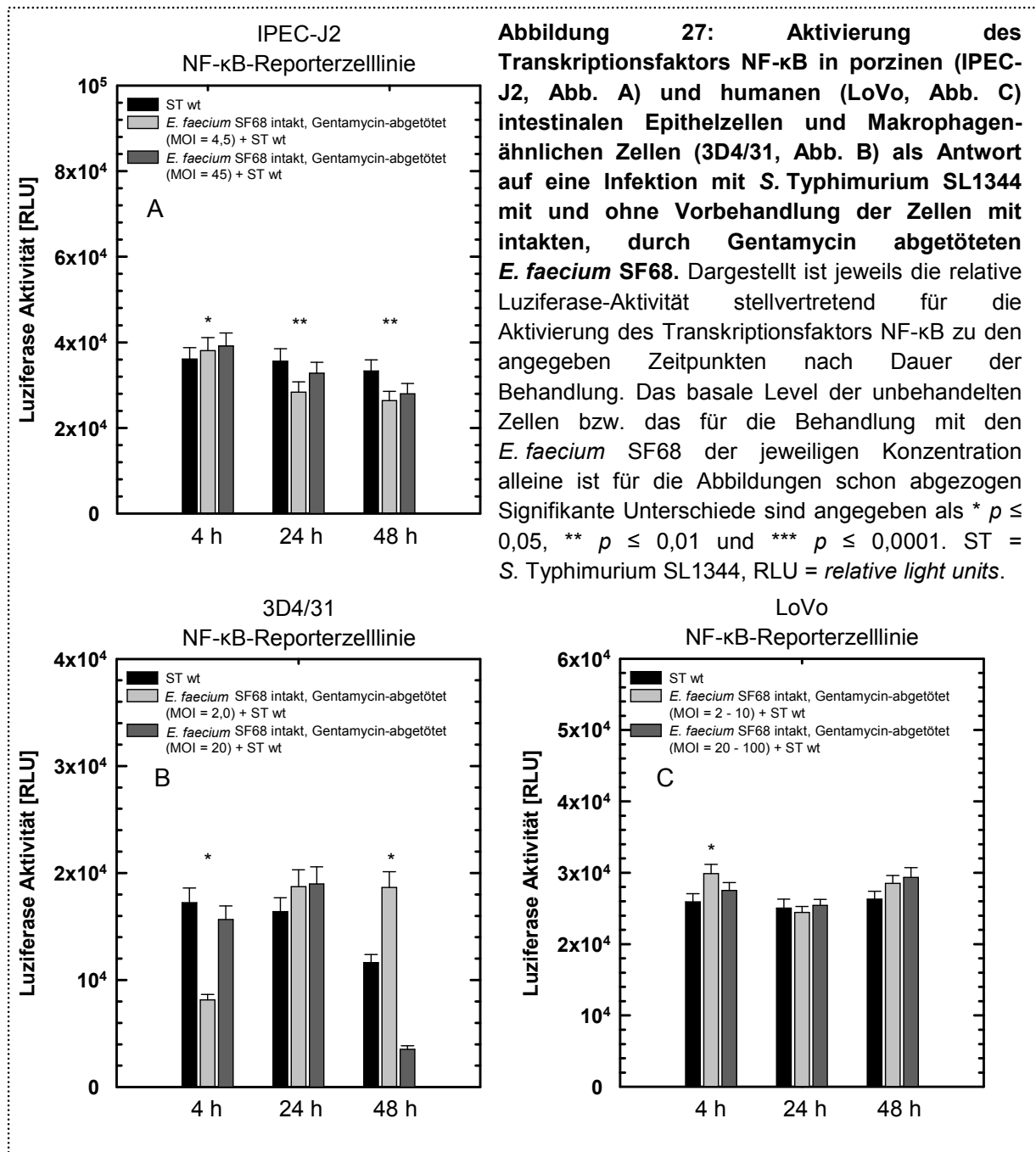
Für diese Versuche stand die Wirkungsweise einer kurz- und langfristigen (über 4, 24 und 48 Stunden) Behandlung der Zellen (porzin: IPEC-J2, 3D4/31, human: LoVo) mit intakten, durch Gentamycin abgetöteten *E. faecium* SF68 auf die Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B im Vordergrund. Zunächst wurde der Einfluss einer *E. faecium* SF68-Behandlung auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen



untersucht. Die Ergebnisse dafür sind in Abbildung 26 A – C dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in Epithelzellen porzinen und humanen Ursprungs die Inkubation über 4, 24 und 48 Stunden mit intakten, aber durch das Antibiotikum Gentamycin abgetöteten, *E. faecium* SF68 (höhere MOI:  $10^8$  Bakterien/ml bzw. niedrigere MOI:  $10^7$  Bakterien/ml) zu einer signifikant erhöhten Aktivierung von NF- $\kappa$ B führte (Abbildung 26 A und C). Es zeigte sich folglich, dass eine längerfristige Behandlung von Epithelzellen mit intakten, abgetöteten *E. faecium* SF68 eine immunogene Wirkung hat und zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Im Gegensatz dazu konnte in den porzinen 3D4/31 Makrophagen nach einer 4- und 24-stündigen Behandlung nur eine tendenziell erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B ermittelt werden (Abbildung 26 B). Erfolgte die Behandlung über 48 Stunden, so scheinen die intakten, abgetöteten *E. faecium* SF68 eher zu einer reduzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu führen. Es konnten allerdings keine Signifikanzen ermittelt werden.



Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer Vorbehandlung der Zellen über 4, 24 und 48 Stunden mit intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68 auf die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste Aktivierung von NF-κB betrachtet (Abbildung 27 A – C). In den porzinen und humanen Epithelzellen führte eine 4-stündige Vorbehandlung zu einer signifikant gesteigerten Aktivierungsrate von NF-κB (Abbildung 27 A und C). Nach 24- und 48-stündiger Behandlung der IPEC-J2 Zellen konnte eine signifikant verringerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur durch *Salmonella* alleine ausgelösten Aktivierung gemessen werden (Abbildung 27 A). In den humanen LoVo Zellen konnte keine reduzierte NF-κB-Aktivierung detektiert werden. Im Gegenteil, nach einer Behandlung der Zellen über 48 Stunden wurde eine tendenziell erhöhte Aktivierung detektiert (Abbildung 27 C). In den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen zeigte sich im Vergleich zu den untersuchten Epithelzellen nach einer 4-stündigen Behandlung ein genau umgekehrtes Muster. Die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste Aktivierung von NF-κB war bei einer Vorbehandlung signifikant reduziert (Abbildung 27 B). Erfolgte die Behandlung über 24 Stunden, so konnte eine tendenziell leicht erhöhte Aktivierungsrate des Transkriptionsfaktors beobachtet werden. Bei einer 48-stündigen Behandlung führte die geringere MOI (MOI = 2,0;  $10^6$  Bakterien/ml) zu einer signifikant erhöhten NF-κB-Aktivierung, die Verwendung der höheren MOI (MOI = 20;  $10^7$  Bakterien/ml) zu einer deutlich, wenn auch nicht signifikant, erniedrigten Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors (Abbildung 27 B).



### 4.3. Ergebnisse der Bakterienlysatversuche

Für die Bakterienlysatversuche dienten die Gentamycin-Protection-Assays und die NF-κB-Aktivierungsassays als Grundlage. Ziel war es, zu untersuchen, ob eine Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 bzw. des pathogenen Stammes *E. faecium* TX0016 und weiteren Bakterienstämmen (*E. coli* Nissle, *E. coli* K-12 MG1655, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) einen Einfluss auf die NF-κB-Aktivierung bzw. die durch die enteropathogenen Salmonellen ausgelöste Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors hat. Hier stand nicht die Wirkung der Bakterien *per se* im Fokus, sondern die der zelluläre Bestandteile (z. B. Zellwandbestandteile, Proteine, Enzyme). Intakte, lebende *E. faecium* SF68 beeinflussen die Aktivierung von NF-κB durch

*Salmonella*, dementsprechend wurde nachfolgend untersucht, ob auch die zellfreien Bestandteile eine ähnliche Wirkung erzielen. In früheren Versuchen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Vorinkubation von porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) mit zellfreien Überständen von *E. faecium* SF68-Kulturen das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* verringert (persönliche Mitteilung, Dr. Karsten Tedin). Allerdings waren diese Ergebnisse teilweise widersprüchlich und es konnten keine Signifikanzen ermittelt werden. Daneben konnte in verschiedenen Veröffentlichungen beobachtet werden, dass bei verwandten *Staphylococcus* spp. grampositive Zellwandkomponenten (Peptidoglykan, Lipoteichonsäure) synergistisch mit LPS von gramnegativen Bakterien wirken, um so höhere pro-inflammatorische Reaktionen zu erzielen. Diese Ergebnisse konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [745–748].

### **4.3.1. Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließend Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344**

Um die Wirkung der zellulären Bestandteile von *E. faecium* SF68 zu untersuchen, wurden zellfreie Lysate hergestellt (siehe 3.1.5). Zunächst wurden Versuche mit einer Kurzzeitbehandlung der Zellen (IPEC-J2, 3D4/31 und PLN/C2) über zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ( $1 \times 10^7$  bzw.  $1 \times 10^8$  lysierte Bakterien/ml) des Lysates durchgeführt. Dabei konnten für keine Zelllinie signifikante Unterschiede verglichen mit dem basalen Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den unbehandelten Zellen detektiert werden. Eine Behandlung der Zellen über zwei Stunden mit *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration hat folglich keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors (Ergebnisse nicht gezeigt). Nachdem die Auswirkung einer Kurzzeit-Behandlung mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 auf die durch *S. Typhimurium* SL1344-ausgelöste Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B untersucht wurde, sollte auch eine längerfristige Behandlung durchgeführt werden, um so einen Zeitverlauf der Wirkungsweise zu erhalten und der *In-vivo*-Situation näher zu kommen. Dazu wurden drei verschiedene Zelllinien (porzin: IPEC-J2, 3D4/31; human: LoVo) über 4, 24 und 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des *E. faecium* SF68-Lysates behandelt. Nach der erfolgten Vorbehandlung mit dem zellfreien Lysat über die angegebenen Zeiträume erfolgte teilweise noch die Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Nach einstündiger Inkubation wurden die extrazellulären Bakterien mit 50  $\mu$ g/ml Gentamycin abgetötet und die Luziferase-Aktivität in der gesamten Platte vier Stunden nach der *Salmonella*-Infektion bestimmt. Einerseits wurden die Einflüsse der Lysat-Behandlung alleine im Vergleich zu den unbehandelten Zellen untersucht, zum anderen die Wirkung auf die durch *Salmonella*-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. In Abbildung 28 A ist die Wirkungsweise des *E. faecium* SF68-Lysates auf das basale Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine

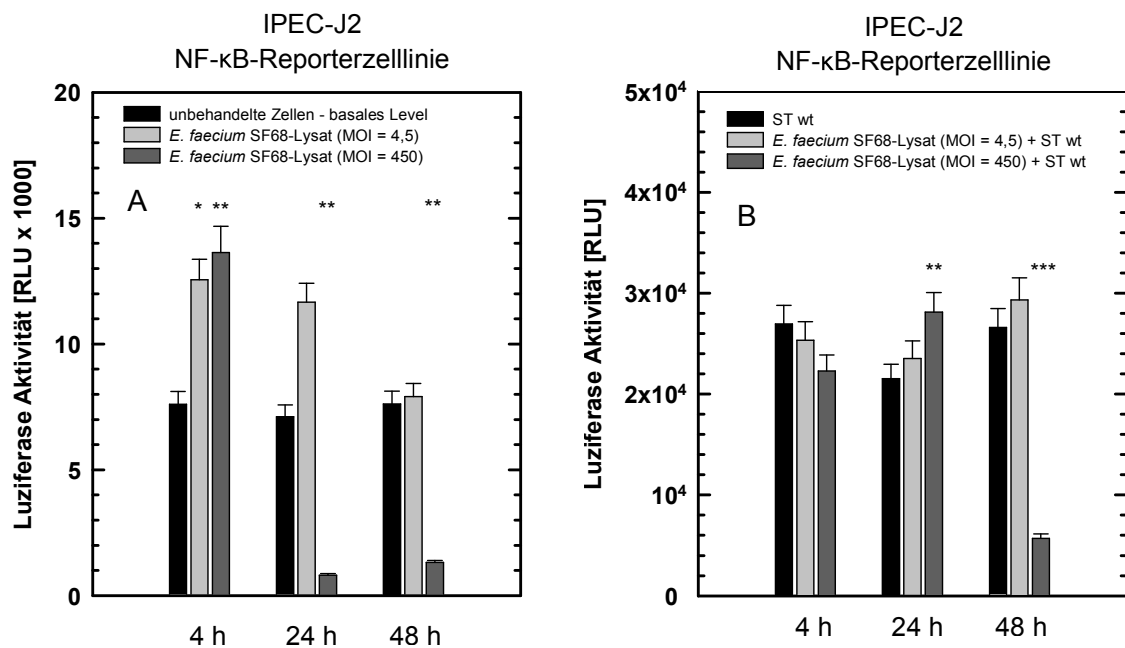
Behandlung über vier Stunden mit beiden Konzentrationen des *E. faecium* SF68-Lysates zu einer signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beim Vergleich mit den unbehandelten Zellen führt (Abbildung 28 A, MOI = 4,5: um ca. 65 % erhöht, \*  $p = 0,03$ ; MOI = 450: um ca. 79 % erhöht, \*\*  $p = 0,002$ ). Nach einer Behandlung über 24 Stunden sah das Muster anders aus. Die geringere Konzentration (MOI = 4,5) des *E. faecium* SF68-Lysates führte weiterhin zu einer erhöhten Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors (Abbildung 28 A, um ca. 64 % erhöht,  $p = 0,07$ ), allerdings kam es bei Verwendung der höheren MOI (MOI = 450) zu einer gegenüber dem basalen Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den unbehandelten Zellen signifikanten Reduzierung der Luziferase-Aktivität (Abbildung 28 A, um ca. 89 % reduziert, \*\*  $p = 0,001$ ). Erfolgte die Lysat-Behandlung über 48 Stunden, so war die NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei Verwendung der geringeren MOI vergleichbar mit dem basalen Level der unbehandelten Zellen, für die höhere MOI konnte weiterhin eine signifikant reduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B beobachtet werden (Abbildung 28 A, um ca. 83 % reduziert, \*\*  $p = 0,001$ ). Betrachtet man nun den Einfluss der Lysat-Behandlungen auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung, so war zu beobachten, dass bei einer vierstündigen Vorbehandlung die Luziferase-Aktivität abhängig von der verwendeten MOI geringer ausfällt, als bei einer Infektion mit *Salmonella* ohne Vorbehandlung der Zellen (Abbildung 28 B). Ein genau umgekehrtes Muster erhielt man, wenn die Behandlung mit dem zellfreien Lysat von *E. faecium* SF68 über 24 Stunden erfolgte. In diesem Fall konnte für beide verwendeten Lysat-Konzentrationen eine erhöhte bzw. für die MOI = 450 sogar eine signifikant erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors gegenüber der durch eine *Salmonella*-Infektion alleine ausgelösten Aktivierung ermittelt werden (Abbildung 28 B, um ca. 31 % erhöht, \*\*  $p = 0,002$ ). Bei einer Lysat-Behandlung über 48 Stunden konnte für die geringere MOI weiterhin eine tendenziell erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors gegenüber der durch die *Salmonella*-Infektion ohne Vorbehandlung ausgelösten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Zellen, die mit der höheren MOI über 48 Stunden vorbehandelt wurden signifikant gegenüber einer *Salmonella*-Infektion alleine reduziert (Abbildung 28 B, um ca. 79 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

**Abbildung 28: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und 4 Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B).

**28 A:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**28 B:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



Für die porzinen 3D4/31 Makrophagen konnte hinsichtlich der Wirkungsweise des *E. faecium*-Lysates auf das basale Level der Luziferase-Aktivität ein zu den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) abweichendes Muster detektiert werden. In den Makrophagen kam es im Gegensatz zu den Epithelzellen schon bei einer Behandlung der Zellen über vier Stunden mit dem Lysat zu einer signifikanten Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen (vergleiche Abbildung 28 A und Abbildung 29 A). Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde bei Verwendung einer MOI = 200 um ca. 32 % gegenüber dem basalen Level in den unbehandelten Zellen verringert (Abbildung 29 A, \*\*  $p \leq 0,0001$ ). Nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung war das basale Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei beiden verwendeten Lysat-Konzentrationen signifikant gegenüber dem Level in den unbehandelten Zellen reduziert (Abbildung 29 A, 24 h: MOI = 20, um ca. 28 % reduziert, \*\*  $p = 0,001$ ; MOI = 200, um ca. 67 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h: MOI = 20, um ca. 77 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; MOI = 200, um ca. 89 % reduziert, \*\*\*  $p = 0,0001$ ).

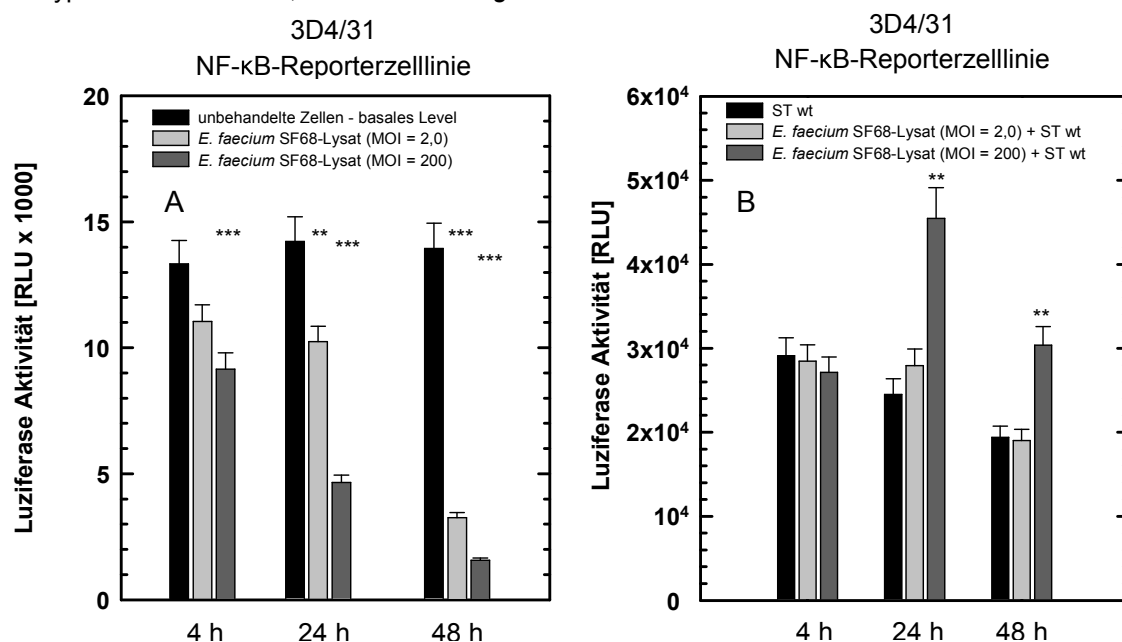
Schon eine zweistündige Behandlung mit der hohen Konzentration des *E. faecium*-Lysates führte bei den 3D4/31 Makrophagen zu einer gegenüber den unbehandelten Zellen reduzierten Luziferase-Aktivität (um ca. 13 % reduziert, Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich scheinen die 3D4/31 Makrophagen im Vergleich zu den intestinalen Epithelzellen empfindlicher auf eine Behandlung mit zellfreien Bestandteilen von *E. faecium* SF68 zu reagieren. Bei der Analyse der durch *Salmonella* induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B konnte beobachtet werden, dass ähnlich wie bei den IPEC-J2 auch in den Makrophagen nach einer 4-stündigen Behandlung der Zellen mit dem Lysat die Luziferase-Aktivität als Maß für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B konzentrationsabhängig geringfügig gegenüber einer *Salmonella*-Infektion alleine reduziert war (vergleiche Abbildung 28 B und Abbildung 29 B). Eine 24- bzw. 48-stündige Behandlung der 3D4/31 mit dem zellfreien Lysat führte bei Verwendung der MOI = 200 zu einer gegenüber der *Salmonella*-Infektion alleine signifikant erhöhten Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors (Abbildung 29 B, 24 h: um ca. 85 % erhöht, \*\*  $p = 0,01$ ; 48 h: um ca. 57 % erhöht, \*\*  $p = 0,01$ ).

**Abbildung 29: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und 4 Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B).

**29 A:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**29 B:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = relative light units.



Neben den beiden porzinen Zelllinien wurden auch die humane Darmepithelzelllinie, LoVo, und die humane Makrophagen-ähnliche Zelllinie THP-1 verwendet. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die Effekte des *E. faecium* SF68-Lysates nur auf porzine Zellen beziehen oder bei humanen Zellen ebenfalls eine bis zu 90%ige Reduktion der NF-κB-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen zu beobachten ist. Die humanen Zellen wurden in der gleichen Weise wie die porzinen Zellen mit dem zellfreien Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden behandelt. Teilweise erfolgte im Anschluss an die Behandlung eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (MOI = 2 – 10). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den porzinen Zelllinien war in der Zelllinie LoVo bei keiner Behandlungsdauer mit der höheren MOI (MOI = 20 – 100) die Luziferase-Aktivität signifikant unter das basale Level der NF-κB-Aktivierung in den unbehandelten Zellen verringert (vergleiche Abbildung 28 A, Abbildung 29 A, Abbildung 30 A). In den humanen Zellen kam es im Gegenteil nach Behandlung der Zellen über 4, 24 und 48 Stunden zu gegenüber den unbehandelten Zellen zu erhöhten bzw. signifikant erhöhten Werten für die ermittelte NF-κB-Aktivierung, auch bei Verwendung der höheren Konzentration des Lysates (Abbildung 30 A, 4 h: MOI = 20 - 100, um ca. 140 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ , MOI = 200 – 1000, um ca. 95 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 24 h: MOI = 20 – 100, um ca. 75 % erhöht, \*  $p = 0,014$ ; 48 h: MOI = 20 – 100, um ca. 97 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Nur nach einer 24-stündigen Lysat-Behandlung (MOI = 200 – 1000) konnte eine nicht erhöhte, mit der in den unbehandelten Zellen vergleichbare, NF-κB-Aktivierung detektiert werden. Hinsichtlich der Wirkungsweise des zellfreien Lysates von *E. faecium* SF68 scheinen also deutliche Unterschiede zwischen den porzinen und humanen Zellen zu bestehen. Allerdings konnte in den porzinen Epithelzellen (IPEC-J2) wie auch in den humanen (LoVo) nach einer Behandlung über vier Stunden mit dem Lysat ebenfalls für beide verwendeten MOIs eine erhöhte Luziferase-Aktivität gemessen werden. In den porzinen Epithelzellen kam es aber bei einer längeren Behandlung mit der höheren Konzentration des Lysates zu einer signifikanten Reduzierung der NF-κB-Aktivierung, bei den humanen Epithelzellen blieben die Werte erhöht (vergleiche Abbildung 28 A und Abbildung 30 A). Betrachtet man die Luziferase-Aktivierung bei einer der Lysat-Behandlung nachfolgenden Infektion mit *Salmonella*, so konnte für die 4-Stunden-Behandlung beobachtet werden, dass es im Gegensatz zu den porzinen Zellen in den humanen Epithelzellen bei einer Lysat-Vorbehandlung nicht zu einer gegenüber einer *Salmonella*-Infektion alleine verringerten Aktivierung von NF-κB, sondern zu tendenziell konzentrationsabhängig erhöhten Werten kam (vergleiche Abbildung 28 B, Abbildung 29 B und Abbildung 30 B). Nach Vorbehandlung der LoVo's über 24 und 48 Stunden und anschließender *Salmonella*-Infektion konnte für die geringere MOI (MOI = 20 – 100) eine signifikant erniedrigte NF-κB-Aktivierung im Vergleich zu den Werten für eine Infektion mit *Salmonella* ohne Vorbehandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat gefunden werden (Abbildung 30 B, 24 h: um ca. 4,3 % reduziert, \*  $p = 0,018$ ; 48 h: um ca. 7,4 % reduziert, \*\*  $p = 0,003$ ). Für



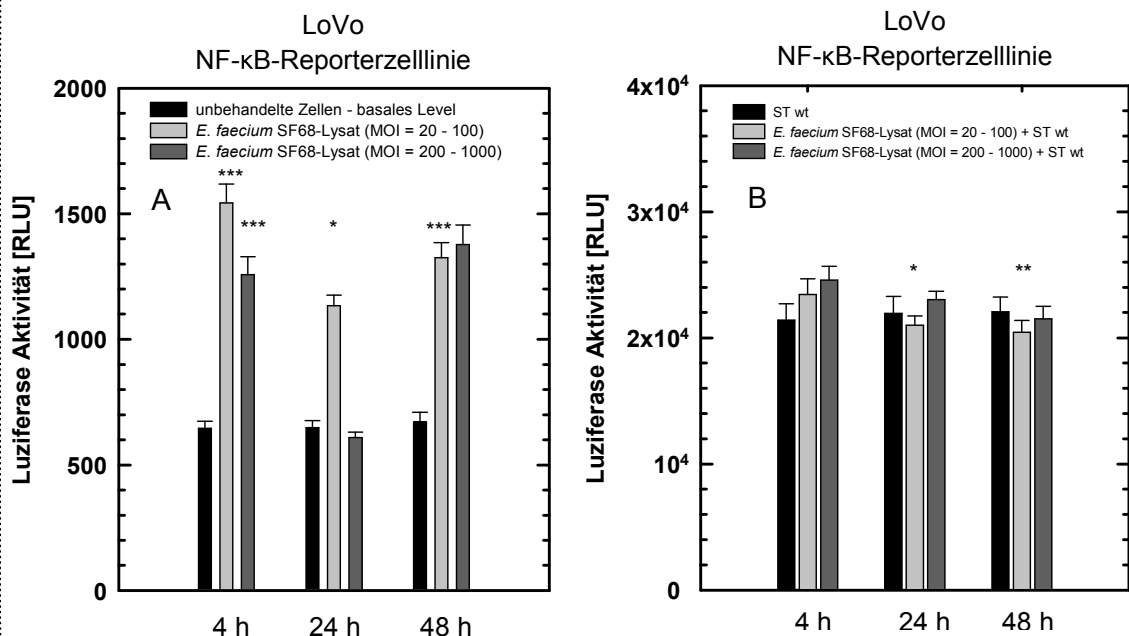
die höhere MOI konnten keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu einer Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 ohne Vorbehandlung der Zellen mit Lysat von *E. faecium* SF68 ermittelt werden.

**Abbildung 30: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in humanen Epithelzellen (LoVo) als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und 4 Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B).

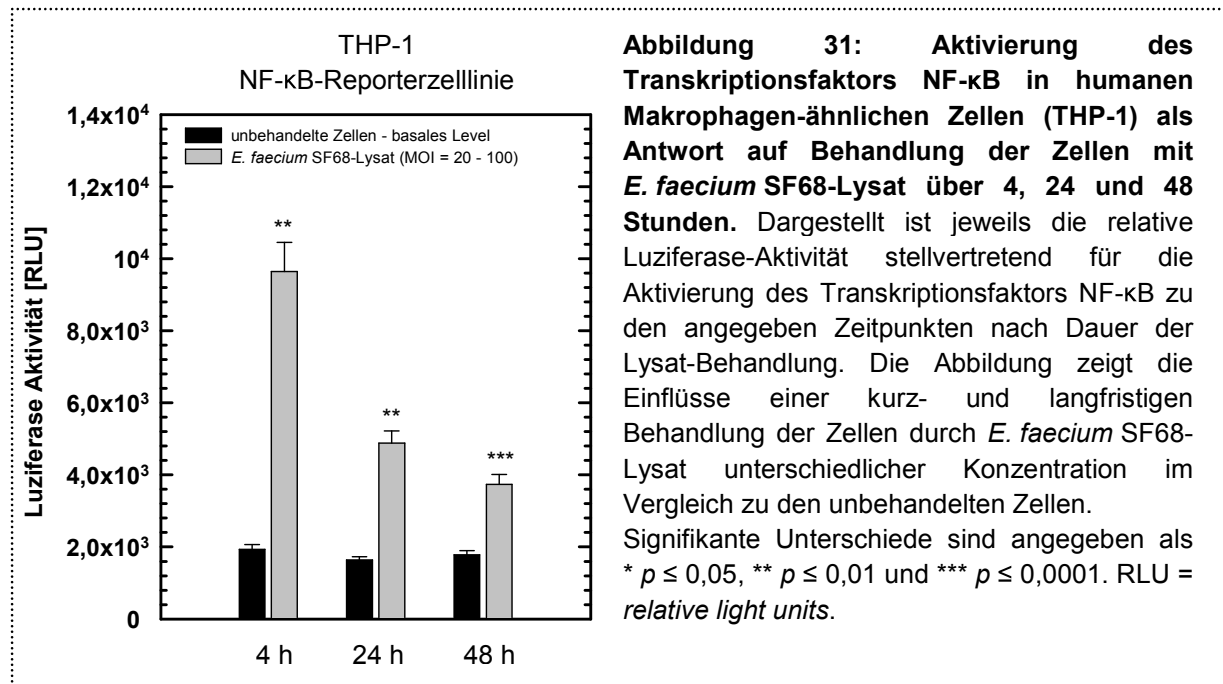
**30 A:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**30 B:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF-κB-Aktivierung dar.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



In der humanen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie THP-1 führte die Behandlung mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 zu einer signifikant erhöhten NF-κB-Aktivierung, die zeitabhängig abnahm, aber auch nach 48-stündiger Behandlung noch signifikant erhöht blieb (Abbildung 31; 4 h: um ca. 399 % erhöht, \*\*  $p = 0,001$ ; 24 h: um ca. 198 % erhöht, \*\*  $p = 0,001$ ; 48 h: um ca. 110 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Hier konnte daher, wie schon in den humanen Epithelzellen beobachtet, keine Reduzierung der NF-κB-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen gefunden werden.



Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das zellfreie Lysat von *E. faecium* SF68 in den untersuchten porcinen Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 einen starken inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ausübt. Diese Wirkungsweise ist abhängig von der Behandlungsdauer sowie der Konzentration der verwendeten Lysate. In den humanen Epithelzellen (LoVo) und den Makrophagen-ähnlichen Zellen THP-1 konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. Hier konnten signifikant erhöhte Werte für die Luziferase-Aktivität bei einer Vorbehandlung der Zellen über unterschiedliche Zeiträume und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Lysates gemessen werden. Die gleiche Wirkung wurde auch in IPEC-J2 nach einer Behandlung über vier Stunden für beide Konzentrationen und über 24 Stunden bei Verwendung der MOI = 4,5 detektiert. Der Einfluss einer Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des *E. faecium* SF68-Lysates auf die durch *Salmonella* induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B war ebenfalls nicht einheitlich für die untersuchten porcinen und humanen Zelllinien. In den porcinen Zellen konnten eher signifikant erhöhte Werte für die Luziferase-Aktivität gemessen werden, wohingegen in den untersuchten humanen Epithelzellen signifikant erniedrigte Werte messbar waren.

#### 4.3.2. Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* TX0016 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließend Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344

Neben der Verwendung des probiotischen Stammes *E. faecium* SF68 wurde in der Zellkultur auch ein pathogener Stamm, *E. faecium* TX0016, eingesetzt. So sollte überprüft werden, ob es Unterschiede bezüglich der Wirkungsweise auf das Immunsystem zwischen dem probiotischen und dem pathogenen *E. faecium*-Stamm gibt. Daher wurde für die

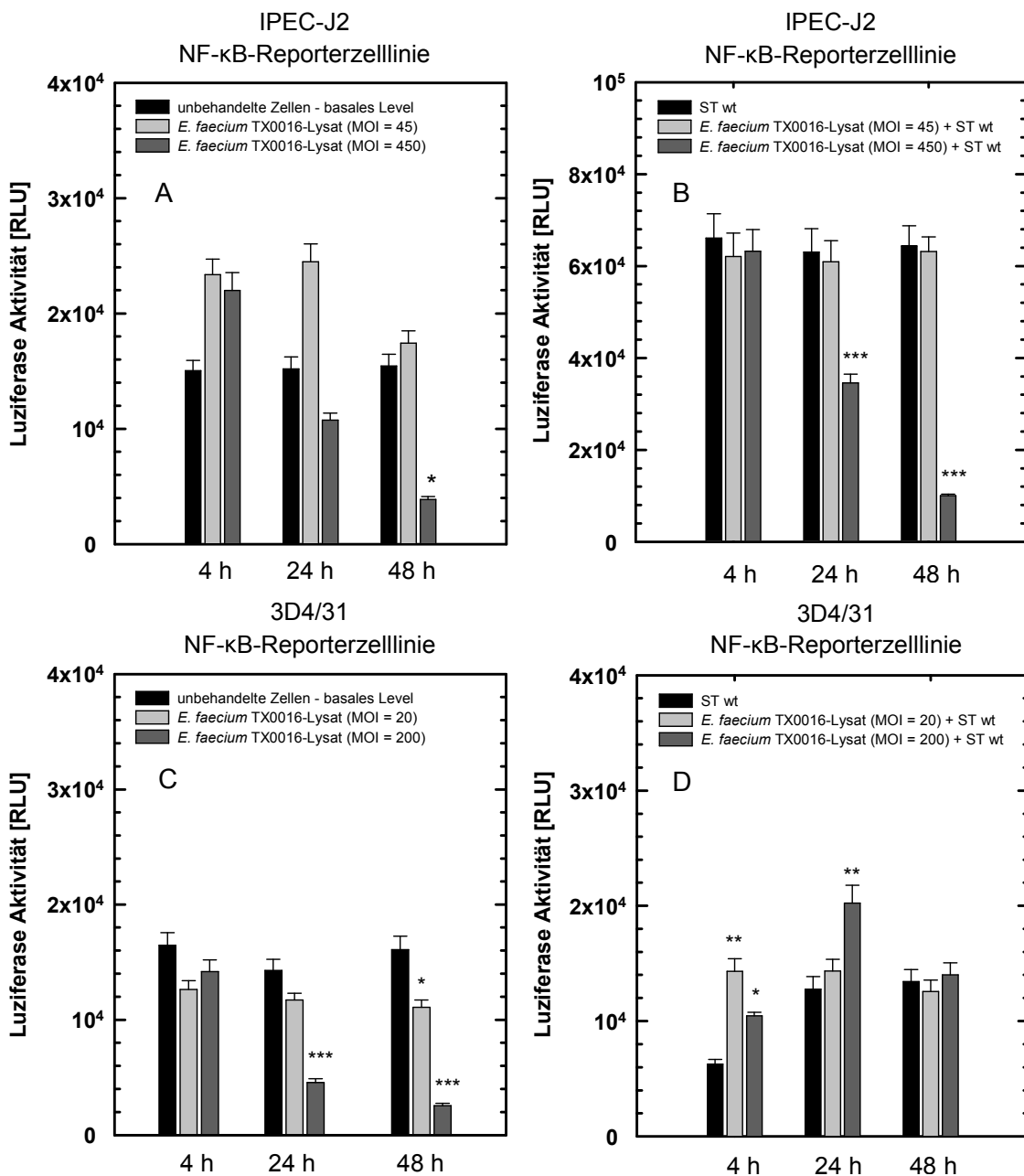
Bakterienlysatversuche zellfreies Lysat von *E. faecium* TX0016 hergestellt und zur Behandlung der porzinen Zelllinien IPEC-J2 und 3D4/31 verwendet. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise behandelt, wie schon bei der Verwendung von *E. faecium* SF68-Lysat beschrieben. Es wurden unterschiedliche MOIs eingesetzt und verschiedene Lysat-Behandlungszeiträume (4, 24 und 48 Stunden) beobachtet. Die Ergebnisse in den IPEC-J2 und 3D4/31 Zellen entsprachen bezüglich des Vergleichs zwischen unbehandelten und mit Lysat behandelten Zellen denen bei der Verwendung des probiotischen Stammes (vergleiche Abbildung 28 A, Abbildung 29 A mit Abbildung 32 A und C). In den porzinen intestinalen Epithelzellen kam es zunächst, bei einer *E. faecium* TX0016-Lysat-Behandlung über vier Stunden, für beide verwendeten Konzentrationen zu einer tendenziell erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abbildung 32 A). Erfolgte die Behandlung über einen längeren Zeitraum (24 und 48 Stunden), so kam es bei der höheren MOI zu einem inhibitorischen Effekt des Lysates auf die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Diese Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung war für die höhere Konzentration (MOI = 450) nach 48-stündiger Behandlung der Zellen signifikant (Abbildung 32 A, um ca. 75 % reduziert, \*  $p = 0,02$ ). Für die 3D4/31 Makrophagen war die inhibitorische Wirkung des *E. faecium* TX0016-Lysates schon bei einer Behandlungsdauer von vier Stunden zu beobachten (Abbildung 32 C). Bei einer Behandlungsdauer von 24 und 48 Stunden war die NF- $\kappa$ B-Aktivierung signifikant gegenüber dem Wert in den unbehandelten Zellen reduziert (Abbildung 32 C, 24 h: MOI = 450, um ca. 68 % reduziert, \*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h: MOI = 45, um ca. 31 % reduziert, \*  $p = 0,018$ , MOI = 450, um ca. 84 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Erfolgte eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344, so fiel die durch *Salmonella* induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei einer Vorbehandlung der Zellen mit Lysat von *E. faecium* TX0016 in den IPEC-J2 abhängig von der verwendeten Lysat-Konzentration niedriger bzw. signifikant niedriger aus, als ohne Lysat-Vorbehandlung (Abbildung 32 B, 24 h: MOI = 450, um ca. 45 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h MOI = 450, um ca. 84 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Betrachtet man die 3D4/31 Makrophagen, so konnte bei einer Vorbehandlung der Zellen über vier und 24 Stunden eine signifikant erhöhte Luziferase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 32 D, 4 h: MOI = 20, um ca. 128 % erhöht, \*\*  $p = 0,001$ , MOI = 200, um ca. 67 %, \*  $p = 0,03$ ; 24 h: MOI = 200, um ca. 58 %, \*\*  $p = 0,01$ ). Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass zellfreie Lysate von *E. faecium* SF68 und *E. faecium* TX0016 in ähnlicher Weise auf die zwei verwendeten porzinen Zelllinien wirken. Beide Lysat-Behandlungen haben einen inhibitorischen Effekt und drücken die NF- $\kappa$ B-Aktivierung signifikant unter das basale Level in den unbehandelten Zellen. Die durch die enteropathogenen Salmonellen ausgelöste Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird in den IPEC-J2 durch eine Lysat-Vorbehandlung tendenziell bis signifikant erniedrigt, in den 3D4/31 Makrophagen-ähnlichen Zellen ist eher eine erhöhte Aktivierungsrate messbar.

**Abbildung 32: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2; Abb. A, B) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31; Abb. C, D) als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* TX0016-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden. Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* TX0016-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B und D).**

**32 A/C:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* TX0016-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**32 B/D:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* TX0016-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar.

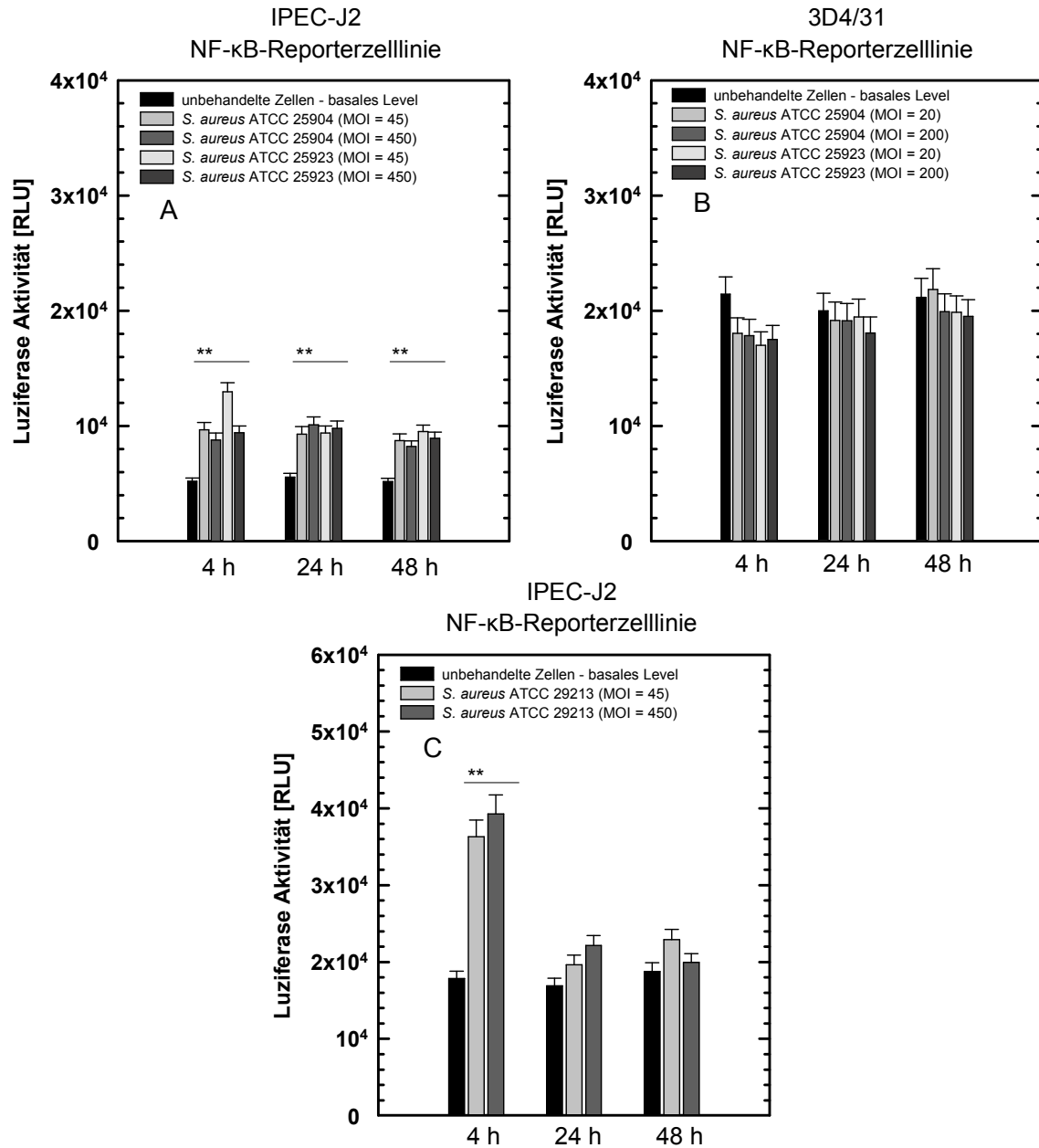
Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



#### **4.3.3. Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *S. aureus* ATCC 25904, ATCC 25923 und ATCC 29213, *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden**

In diesem Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob zellfreie Lysate anderer, grampositiver und gramnegativer Bakterien (probiotisch, pathogen bzw. Laborstamm) eine ähnliche Wirkungsweise wie die grampositiven probiotischen *E. faecium* SF68 bzw. die pathogenen *E. faecium* TX0016 auf die beiden porzinen Zelllinien haben. Es konnte allerdings für keinen hier untersuchten Bakterienstamm eine signifikant inhibitorische Wirkung auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden (Abbildung 33 A – C, Abbildung 34 A – D). Eine signifikant unter das basale Level der unbehandelten Zellen verringerte Aktivierungsrate des Transkriptionsfaktors trat für keine Lysat-Behandlung und keine Behandlungsdauer auf (Abbildung 33 A – C, Abbildung 34 A – D). Für die Behandlung der Zellen mit Lysaten von *S. aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 25904, ATCC 25923 und ATCC 29213) konnte gezeigt werden, dass in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) eine Lysat-Behandlung über 4, 24 und 48 Stunden zu einer gegenüber den unbehandelten Zellen erhöhten bzw. signifikant erhöhten Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führt (Abbildung 33 A und C). In den 3D4/31 Makrophagen konnte dagegen nach einer 4-stündigen Behandlung mit Lysaten von *S. aureus* ATCC 25904 und ATCC 25923 eine verglichen mit den Werten in den unbehandelten Zellen reduzierte Luziferase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 33 B). Bei einer Behandlung mit zellfreiem Lysat über 24 bzw. 48 Stunden kam es allerdings erneut zu einer Annäherung an das basale Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den unbehandelten Zellen und nicht wie für die zwei *E. faecium*-Stämme gesehen zu einer signifikanten Inhibierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors (vergleiche Abbildung 29 A, Abbildung 32 C und Abbildung 33 B). In Abbildung 34 A – C ist das Ergebnis der Behandlung mit Lysaten von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* K-12 MG1655 in den IPEC-J2 und 3D4/31 Zellen dargestellt. *E. coli* K-12 und *E. coli* Nissle lösen in beiden Zelllinien konzentrationsabhängig eine initiale NF- $\kappa$ B-Aktivierung, welche auf LPS, *Flagella* etc. zurückzuführen ist, aus, gefolgt von einer zeitabhängigen Abnahme, welche die normale Herabregulierung von NF- $\kappa$ B durch sich selbst reflektieren könnte (Abbildung 34 A – D). Dabei sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem probiotischen Bakterienstamm und dem Laborstamm erkennbar. Bei den *S. aureus*-Stämmen konnte eine solche initiale NF- $\kappa$ B-Aktivierung und anschließende Abnahme nur in IPEC-J2 für ATCC 29213 detektiert werden (Abbildung 33 C). Die Stämme ATCC 25904 und 25923 lösen in den IPEC-J2 nach 4-, 24- und 48-stündiger Behandlung eine signifikant erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors aus, eine Abnahme ist in den untersuchten Zeiträumen nicht zu beobachten (Abbildung 33 A).

**Abbildung 33: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A, C) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *Staphylococcus aureus* ATCC 25904, ATCC 25923 und ATCC 29213 (Abb. C) über 4, 24 und 48 Stunden. Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.**



**Abbildung 34: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2; Abb. A, B) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31; Abb. C, D) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden. Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung.**

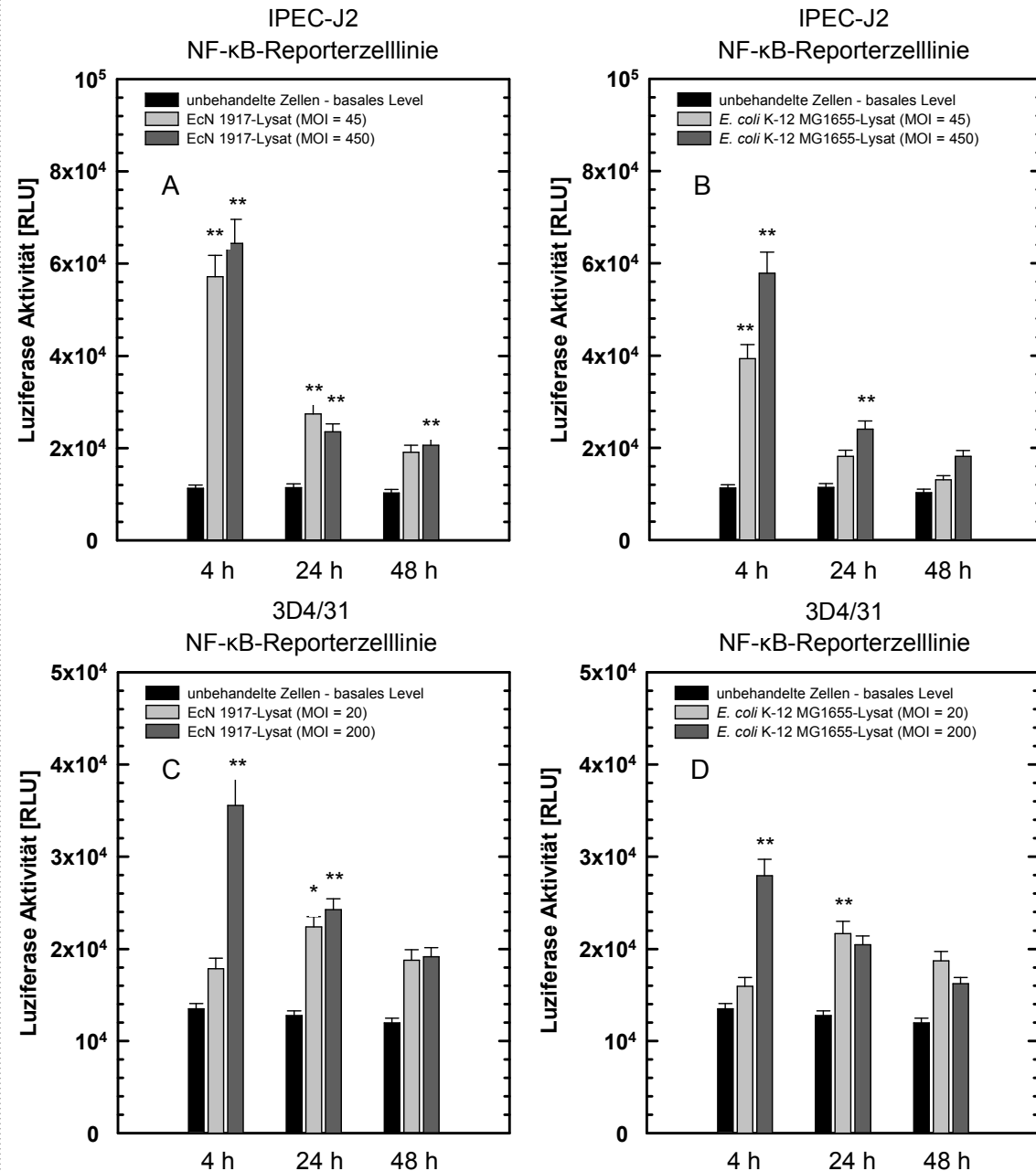
**34 A:** IPEC-J2 Behandlung mit EcN-Lysat.

**34 B:** IPEC-J2 Behandlung mit *E. coli* K-12 MG1655-Lysat.

**34 C:** 3D4/31 Behandlung mit EcN-Lysat.

**34 D:** 3D4/31 Behandlung mit *E. coli* K-12 MG1655-Lysat.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . EcN = *E. coli* Nissle 1917, RLU = relative light units.



#### 4.3.4. **Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 und intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. coli* K-12 MG1655 alleine und gemeinsam über 4, 24 und 48 Stunden mit nachfolgender Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344**

Um zu untersuchen, wie die Zellen auf eine gleichzeitige Behandlung mit Lysat von *E. faecium* SF68 und intakten, durch Gentamycin abgetöteten *E. coli* K-12 MG1655 reagieren, wurden IPEC-J2 und 3D4/31 Zellen über 4, 24 und 48 Stunden einerseits mit *E. faecium* SF68-Lysat oder *E. coli* K-12 MG1655 alleine und andererseits mit Lysat und Bakterien gleichzeitig behandelt. Anschließend fand in einem Versuchsansatz nach gleichzeitiger Behandlung mit beiden Bakterienstämmen noch eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 statt, um so den Einfluss der Behandlung auf die durch *Salmonella* induzierte Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu überprüfen. Durch die gleichzeitige Behandlung sollte beobachtet werden, ob die Wirkungsweise des *E. faecium* SF68-Lysates durch intakte, nicht mehr lebende *E. coli* K-12 MG1655 beeinflusst wird. Hier könnte es beispielsweise zu einer synergistischen Wirkung auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommen. Daneben kommt eine solche Behandlung der tatsächlichen *In-vivo*-Situation näher. Vergleicht man die gleichzeitige Behandlung mit den Einzelbehandlungen, so konnte in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) nach einer 4- und 24-stündigen Behandlung eine signifikant erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B detektiert werden (Abbildung 35 A, 4 h: um ca. 148 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 24 h: um ca. 110 % erhöht). Dabei war die Aktivierung höher, als bei Verwendung der intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. coli* K-12 MG1655 alleine. Eine Lysat-Behandlung alleine führte bereits nach einer Behandlung über 24 Stunden zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, sodass Werte weit unter dem basalen Level der unbehandelten Zellen gefunden wurden (Abbildung 35 A, 24 h: um ca. 55 % reduziert). Nach 48-stündiger Behandlung kam es auch bei gleichzeitiger Behandlung zu einer signifikant reduzierten Luziferase-Aktivität (Abbildung 35 A, 48 h: nur *E. faecium* SF68-Lysat: um ca. 81 %, \*  $p = 0,04$ ; gleichzeitige Behandlung: um ca. 81 %, \*  $p = 0,04$ ). Bei einer Behandlung mit *E. coli* K-12 MG 1655 alleine kam es abhängig von der Behandlungsdauer wie erwartet nur zu einer normalen Herabregulierung der Aktivierungsrate von NF- $\kappa$ B, die aber zu jedem Zeitpunkt über dem basalen Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung lag. Die Inhibierung der Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors durch *E. faecium* SF68-Lysat scheint nur nach einer 24-stündigen Behandlung durch eine gleichzeitige Inkubation mit *E. coli* K-12 MG1655 umkehrbar zu sein. Erfolgte die Behandlung über 48 Stunden, so entspricht das Ergebnis der gleichzeitigen Behandlung vollständig dem für die Lysat-Behandlung alleine (Abbildung 35 A). Bei den 3D4/31 Makrophagen konnte eine gleichzeitige Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat und intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. coli* K-12 MG1655 eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unabhängig von der Behandlungsdauer nicht verhindern (Abbildung 35 C). Es kam nach einer Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat bzw. bei gleichzeitiger



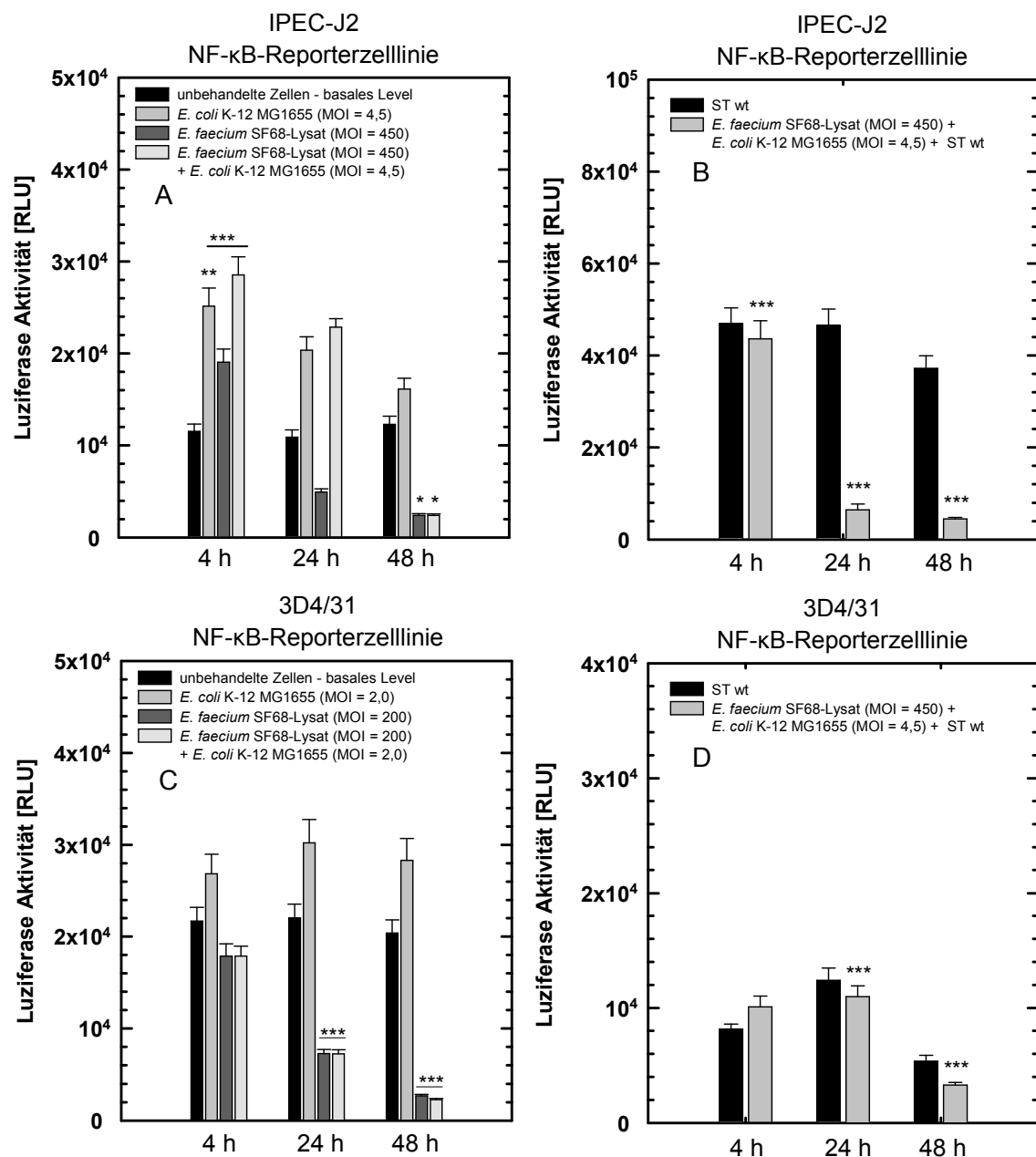
Behandlung über 4, 24 und 48 Stunden zu einer verringerten bzw. signifikant verringerten (24- und 48-Stunden-Behandlung) NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die Behandlung mit *E. coli* K-12 MG1655 alleine führte unabhängig von der Behandlungsdauer zu einer tendenziell erhöhten Aktivierungsrate von NF- $\kappa$ B (Abbildung 35 C). Allerdings konnte in den Makrophagen keine zeitabhängige Herabregulierung von NF- $\kappa$ B durch sich selbst beobachtet werden. (Abbildung 35 C). In Abbildung 35 B und D sind die Einflüsse einer gleichzeitigen Behandlung auf die durch *Salmonella* ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B dargestellt. Für die IPEC-J2 Zellen konnte nach einer 4-stündigen parallelen Behandlung eine signifikant gegenüber der Salmonelleninfektion alleine erniedrigte Luziferase-Aktivität gemessen werden (Abbildung 35 B, um ca. 7 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Dieses Ergebnis entspricht den ebenfalls tendenziell erniedrigten Werten für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Lysat-Behandlung (Abbildung 28 B und C). Die signifikant verringerten Werte für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung blieben auch bei einer gleichzeitigen Behandlung über 24 und 48 Stunden bestehen bzw. die Inhibierung verstärkte sich deutlich (Abbildung 35 B, 24 h: um ca. 86 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h: um ca. 88 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Betrachtet man die Wirkungsweise einer gleichzeitigen Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat und intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. coli* K-12 MG1655 auf die *Salmonella*-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors in den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen, so wird deutlich dass nach einer 24- bzw. 48-stündigen Behandlung die Luziferase-Aktivität signifikant reduziert war (Abbildung 35 D, 24 h: um ca. 11 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h: um ca. 39 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Erfolgte nur eine Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat, so war das Ergebnis für die Behandlung über 24 und 48 Stunden genau umgekehrt. Es konnten signifikant erhöhte Werte für die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors detektiert werden (Abbildung 29 B und C).

**Abbildung 35: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2; Abb. A, B) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31; Abb. C, D) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 und *E. coli* K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden alleine und gemeinsam mit anschließender Infektion durch *S. Typhimurium* SL1344.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der mit *E. faecium* SF68- und *E. coli* K-12 MG1655-Lysat gemeinsam behandelten Zellen ist für die Abbildungen B und D schon abgezogen.

**35 A/C:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68 bzw. *E. coli* K-12 MG1655-Lysat im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**35 B/D:** Stellt die Wirkungsweise der gemeinsamen Behandlung mit *E. faecium* SF68- und *E. coli* K-12 MG1655-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF-κB-Aktivierung dar.

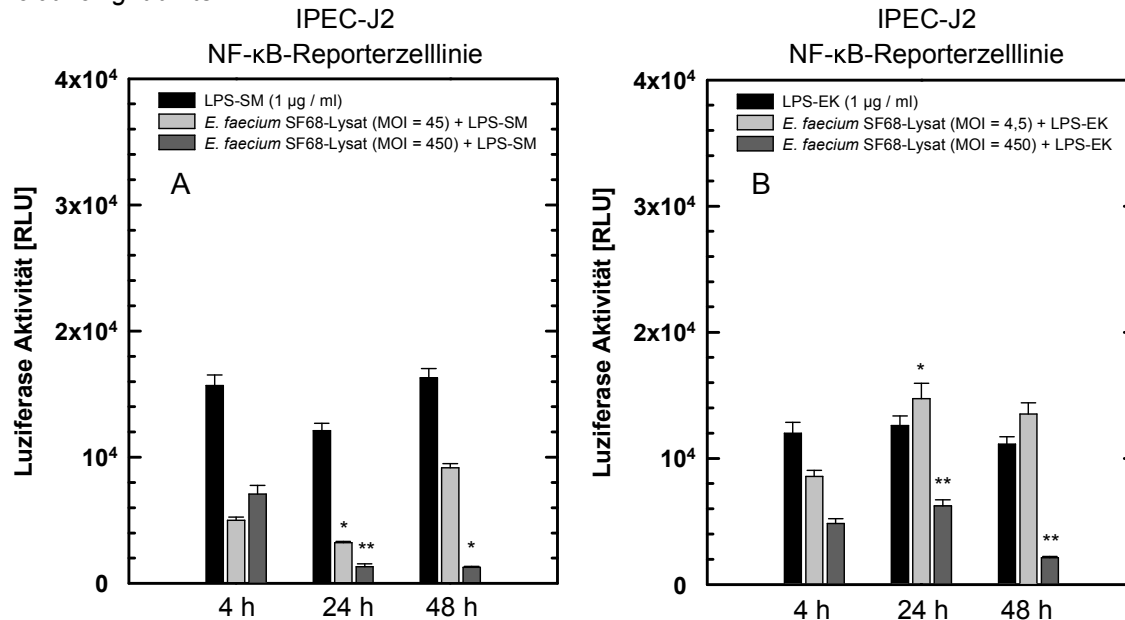
Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



#### 4.3.5. Beeinflussung der LPS-induzierten NF-κB-Aktivierung

Für diesen Versuchsansatz stand die Untersuchung des Einflusses von *E. faecium* SF68-Lysat auf die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung im Fokus. Hier sollte die NF-κB-Aktivierung dementsprechend nicht durch lebende, intakte Bakterien (*Salmonella*) ausgelöst werden, sondern durch Bestandteile der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien (LPS). Dazu wurde neben LPS aus *Salmonella* (LPS-SM, Ultrapure from *Salmonella minnesota* R595, InvivoGen) auch solches aus *E. coli* K-12 (LPS-EK, InvivoGen) verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit dem entsprechenden *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden vorbehandelt und anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml LPS. Nach Inkubation über 4 Stunden wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Bei Verwendung von LPS-SM konnte nach allen drei untersuchten Behandlungszeiträumen für die Vorbehandlung mit zellfreiem Lysat in den IPEC-J2 eine verringerte bzw. signifikant reduzierte NF-κB-Aktivierung gemessen werden (Abbildung 36 A). Die *Salmonella*-induzierte erhöhte NF-κB-Aktivierungsrate nach 24-stündiger Behandlung in den IPEC-J2 mit Lysat der MOI = 450 blieb allerdings aus (vergleiche Abbildung 28 B mit Abbildung 36 A). Auch bei Zugabe des *E. coli*-LPS (LPS-EK) konnte bei Verwendung der höheren MOI (MOI = 450) in den intestinalen Epithelzellen nach allen Behandlungszeiträumen eine reduzierte NF-κB-Aktivierung detektiert werden (Abbildung 36 B, 24 und 48 Stunden Behandlung: signifikante Reduktion). Hier konnte aber im Gegensatz zum LPS-SM für die niedrigere MOI (MOI = 45) eine signifikant erhöhte Aktivierungsrate des Transkriptionsfaktors nach einer Lysat-Vorbehandlung über 24 Stunden beobachtet werden (Abbildung 36 B, um ca. 17 % erhöht, \*  $p = 0,02$ ). Nach 48-stündiger Behandlung war die NF-κB-Aktivierung bei Verwendung der niedrigeren MOI immer noch tendenziell erhöht. Generell lösten die intakten, lebenden *S. Typhimurium* SL1344 eine höhere NF-κB-Aktivierung aus, als die beiden untersuchten LPS (vergleiche Abbildung 28 B mit Abbildung 36 A und B). Überdies scheinen die negativen Einflüsse auf die NF-κB-Aktivierung bei Lysat-Vorbehandlung der Zellen und nachfolgender Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 geringer zu sein, als die bei einer anschließenden LPS-Behandlung. Eine deutliche Inhibierung der NF-κB-Aktivierung konnte vor allem bei Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 und anschließender Inkubation mit LPS-SM beobachtet werden.

**Abbildung 36: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließender Behandlung mit LPS (*Salmonella*-LPS: Abb. A; *E. coli*-LPS: Abb. B). Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Behandlung mit LPS. Das basale Level der mit *E. faecium* SF68-Lysat behandelten Zellen ist für die Abbildungen abgezogen. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.**



#### 4.3.6. Beeinflussung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung

Aufgrund der Beobachtung, dass die Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat einen Einfluss auf die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat, wurde im Folgenden untersucht, ob eine ähnliche Wirkung auch bei einer TNF- $\alpha$ -induzierten Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors auftritt. TNF- $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen gebildet wird. Der multifunktionelle Signalstoff des Immunsystems ist ein typischer Stimulant der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und wirkt z. B. regulierend auf Zelldifferenzierungs- und Apoptosevorgänge [749].

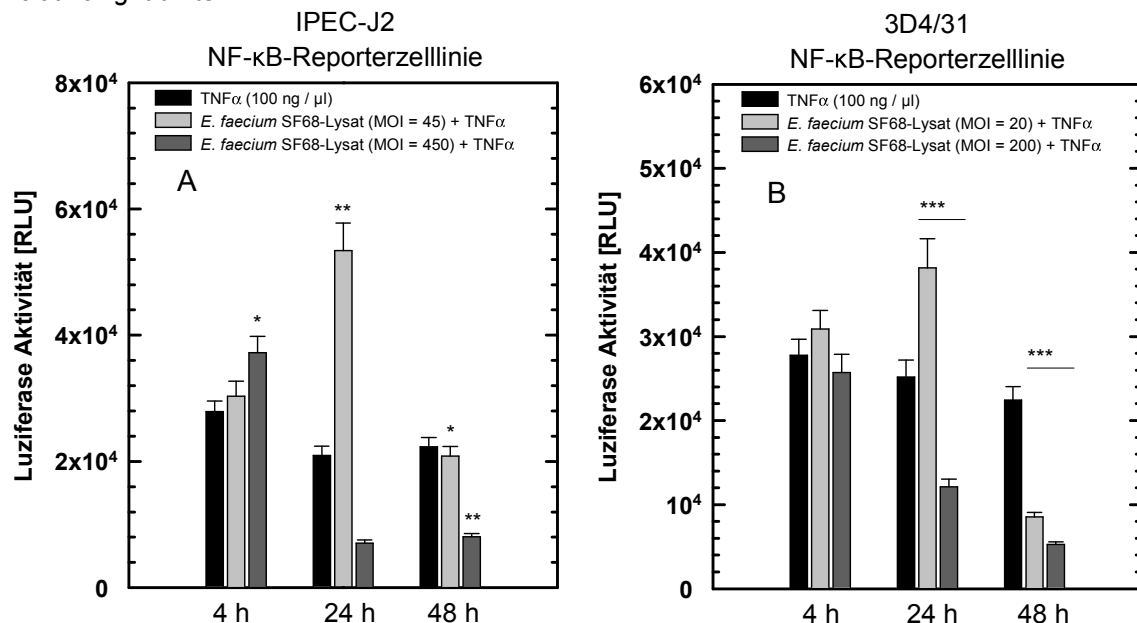
Mit diesen Versuchen sollte dementsprechend nicht die durch PAMPs-ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung überprüft werden, sondern die Zytokin-induzierte Aktivierung. Dafür erfolgte nach Behandlung der Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit dem *E. faecium* SF68-Lysat eine Zugabe von 100 ng/ $\mu$ l porzinem TNF- $\alpha$ . Nach 4-stündiger Inkubation wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Abbildung 37 stellt die Ergebnisse für die intestinalen Epithelzellen und die Makrophagen-ähnlichen Zellen dar. Nach einer Behandlung über vier Stunden konnte eine erhöhte Luziferase-Aktivität in den IPEC-J2 gemessen werden (Abbildung 37 A, MOI = 450, um ca. 34 % erhöht, \*  $p = 0,05$ ). Bei der *Salmonella*-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung kam es dagegen bei dieser Behandlungsdauer zu einer tendenziell erniedrigten Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abbildung 28 B). Nach einer 24-stündigen Behandlung war die TNF- $\alpha$ -

induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei Verwendung der geringeren MOI des Lysates (MOI = 45) signifikant erhöht gegenüber dem Wert, der für die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung ohne Vorbehandlung der Zellen gefunden wurde (Abbildung 37 A, um ca. 155 % erhöht, \*\*  $p = 0,01$ ). Für die höhere MOI (MOI = 450) wurde dagegen eine erniedrigte Aktivierung des Transkriptionsfaktors detektiert. Werden Salmonellen als Auslöser für eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung verwendet, so konnte für die höhere MOI eine signifikant erhöhte Aktivierungsrate beobachtet werden. Bei einer Vorbehandlung der Zellen über zwei Tage mit *E. faecium* SF68-Lysat war die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B signifikant verringert (Abbildung 37 A, MOI = 45: um ca. 7 % reduziert, \*  $p = 0,04$ ; MOI = 450: um ca. 64 % reduziert, \*\*  $p = 0,01$ ). In den 3D4/31 Makrophagen konnte ebenfalls nach einer 24- und 48-stündigen Vorbehandlung mit zellfreiem Lysat eine signifikant reduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung gefunden werden (Abbildung 37 B, 24 h, MOI = 200: um ca. 52 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 48 h, MOI = 20: um ca. 62 % reduziert, \*\*  $p = 0,01$ , MOI = 200: um ca. 77 % reduziert, \*\*  $p = 0,008$ ). Allerdings war, ähnlich wie in den IPEC-J2, für die Verwendung der MOI = 20 nach einer Behandlung über 24 Stunden die TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung signifikant erhöht (Abbildung 37 B, um ca. 52 % erhöht, \*\*  $p \leq 0,0001$ ).

Eine 48-stündige Vorbehandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat (MOI = 450) scheint eine so hohe Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den IPEC-J2 und 3D4/31 auszulösen, dass die Werte für die *Salmonella*-, LPS- bzw. TNF- $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung deutlich und signifikant unter denen bleiben, die in den Zellen ohne Vorbehandlung detektiert wurden (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29 B; Abbildung 36 und Abbildung 37).

**Abbildung 37: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließender Behandlung mit porzinem TNF- $\alpha$ .** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Behandlung mit porzinem TNF- $\alpha$ . Das basale Level der mit *E. faecium* SF68-Lysat behandelten Zellen ist für die Abbildungen schon abgezogen.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.



#### 4.3.7. Charakterisierung der für die Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen verantwortlichen Substanz

Aufgrund der Beobachtung, dass bei einer Verwendung von höheren Konzentrationen des *E. faecium*-Lysates nach 4-, 24- bzw. 48-stündiger Behandlung der Zellen sowohl in den intestinalen Epithelzellen als auch in den 3D4/31 Makrophagen die NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level von unbehandelten Zellen absinkt, soll nun charakterisiert werden, was für diese Inhibierung verantwortlich sein könnte.

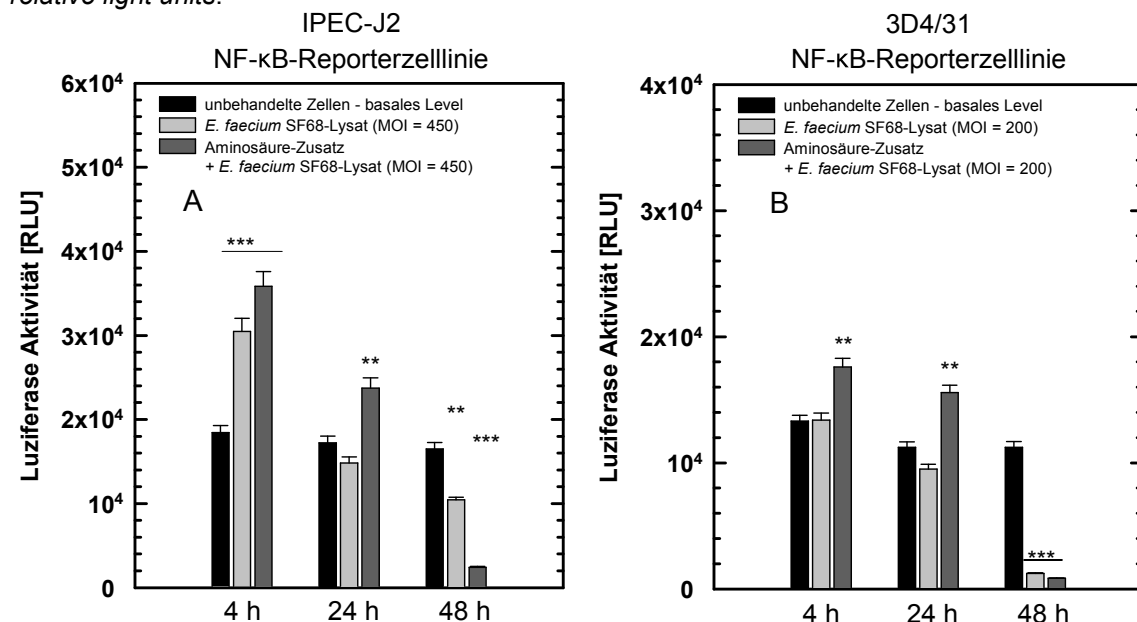
##### 4.3.7.1. Verwendung eines Aminosäure-Zusatzes

Zur Charakterisierung des Moleküls/der Substanz, die für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist, wurde zunächst untersucht, ob Bestandteile, die im zellfreien Bakterienlysate enthalten sind, eventuell essentielle Nährstoffe verbrauchen oder umwandeln, sodass sie für die Zellen nicht mehr zugänglich bzw. verwertbar sind. Essentielle Nährstoffe sind beispielsweise Aminosäuren, daher wurde ihre Konzentration im Zellkulturmedium erhöht (2 x MEM amino acids + 50  $\mu$ M L-Alanyl-L-Glutamine, Biochrom) und Bakterienlysateversuche durchgeführt. Abbildung 38 stellt die Ergebnisse in intestinalen Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen für die Versuche mit Aminosäure-Zusatz

dar. Eine signifikante Inhibierung der Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors nach 48-stündiger Lysat-Behandlung mit einer MOI = 450 (IPEC-J2) bzw. MOI = 200 (3D4/31) konnte durch eine erhöhte Konzentration von Aminosäuren nicht verhindert werden (Abbildung 38 A und B). Allerdings scheint die Aminosäure-Zugabe bei einer Behandlung mit zellfreiem Lysat über 4 und 24 Stunden in beiden Zelllinien einen positiven Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu haben. Eine erhöhte Aminosäure-Konzentration führte zu einer signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Diese erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors könnte jedoch auch auf eine verbesserte bzw. gesteigerte Proliferation der Zellen als Reaktion auf ein erhöhtes Nährstoffangebot zurückgehen. Insgesamt scheint ein Verbrauch von Aminosäuren nicht für die signifikante Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich zu sein.

**Abbildung 38: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und parallelem Zusatz von Aminosäuren.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.



#### 4.3.7.2. Verwendung von täglich frisch hergestelltem *E. faecium* SF68-Lysat

Dieser Versuchsansatz diente zur Überprüfung, ob ein täglicher Wechsel des alten Bakterienlysates gegen neues, frisch hergestelltes Lysat eine andere Wirkung ausübt, als ohne Wechsel. Für die Behandlung über 48 Stunden wurde nach 24 und 44 Stunden das Lysat gegen frisches ausgetauscht. Bei der Behandlung über 24 Stunden erfolgte nur ein Wechsel, nach 20 Stunden. So sollte geklärt werden, ob es über die 48 bzw. 24 Stunden zur Anreicherung einer Substanz kommt, die für die Inhibierung der Aktivierungsrate von NF- $\kappa$ B

verantwortlich sein könnte. Die Möglichkeit des Verbrauchs von essentiellen Nährstoffen konnte zusätzlich ein weiteres Mal untersucht werden. Eine tägliche Erneuerung des Bakterienlysates bedeutete auch eine Zugabe von frischem Zellkulturmedium. Vergleicht man nun die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit den Versuchen ohne täglichen Lysat-Wechsel, so wird deutlich, dass die Muster sich sehr ähnlich sind (vergleiche Abbildung 28 bzw. Abbildung 29 A – B und Abbildung 39 A – D). Allerdings konnten in den intestinalen Epithelzellen keine signifikanten Erniedrigungen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Lysat-Vorbehandlung detektiert werden, sondern nur tendenziell reduzierte Werte (Abbildung 39 A). Auch für die Wirkungsweise einer *E. faecium* SF68-Lysat-Vorbehandlung auf die durch *S. Typhimurium* SL1344 ausgelöste Aktivierung des Transkriptionsfaktors konnte ein vergleichbares Muster gefunden werden, wie ohne den täglichen Wechsel des alten gegen frisches Bakterienlysate (Abbildung 39 B und D). Dementsprechend scheint es einerseits nicht zur Anreicherung einer Substanz zu kommen und andererseits scheinen auch keine essentiellen Nährstoffe verbraucht zu werden.

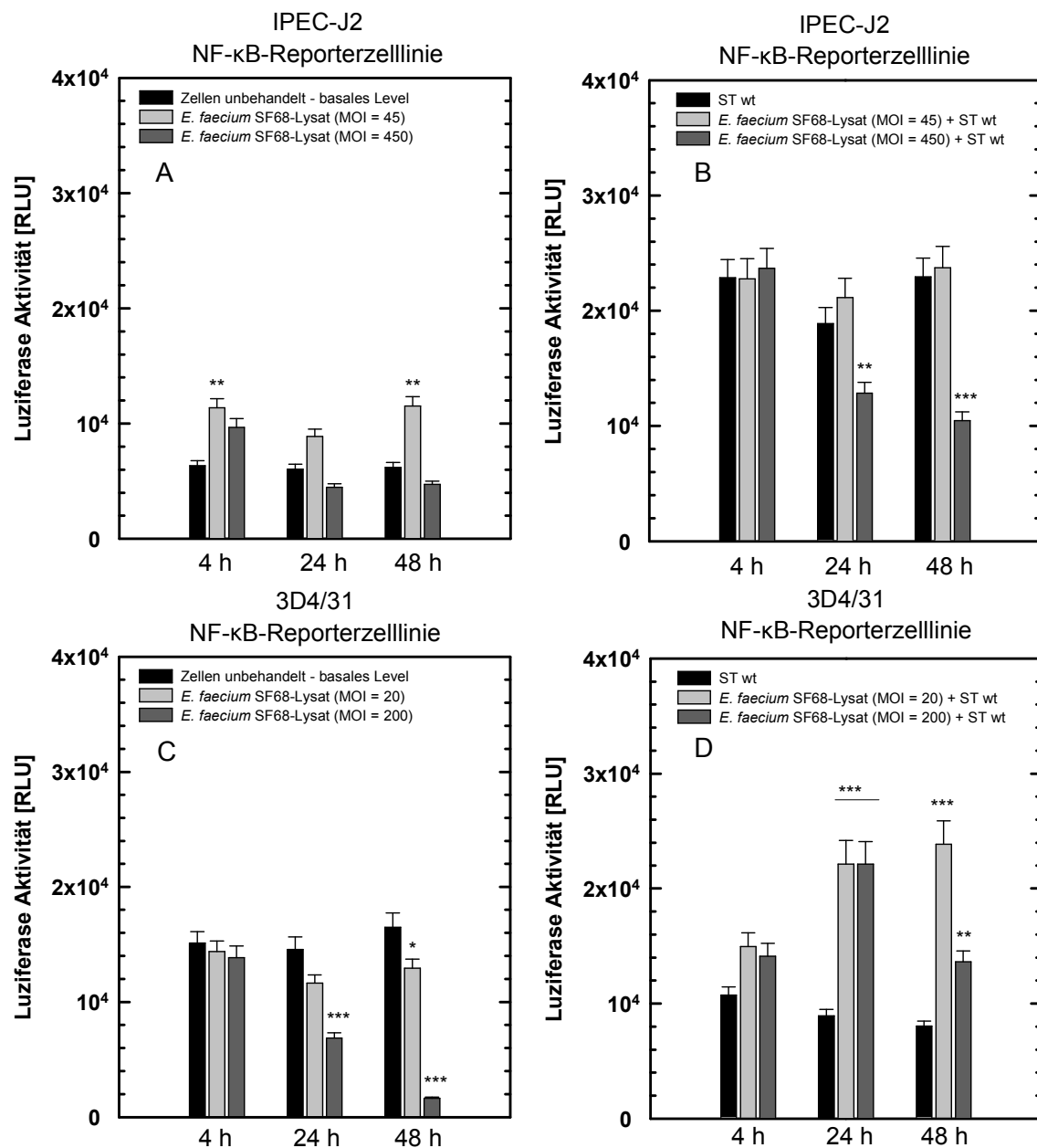


**Abbildung 39: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2; Abb. A, B) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31; Abb. C, D) als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit jedem Tag frischem *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden. Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B und D).**

**39 A/C:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**39 B/D:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



#### 4.3.7.3. Hitzedenaturierung des *E. faecium* SF68-Lysates

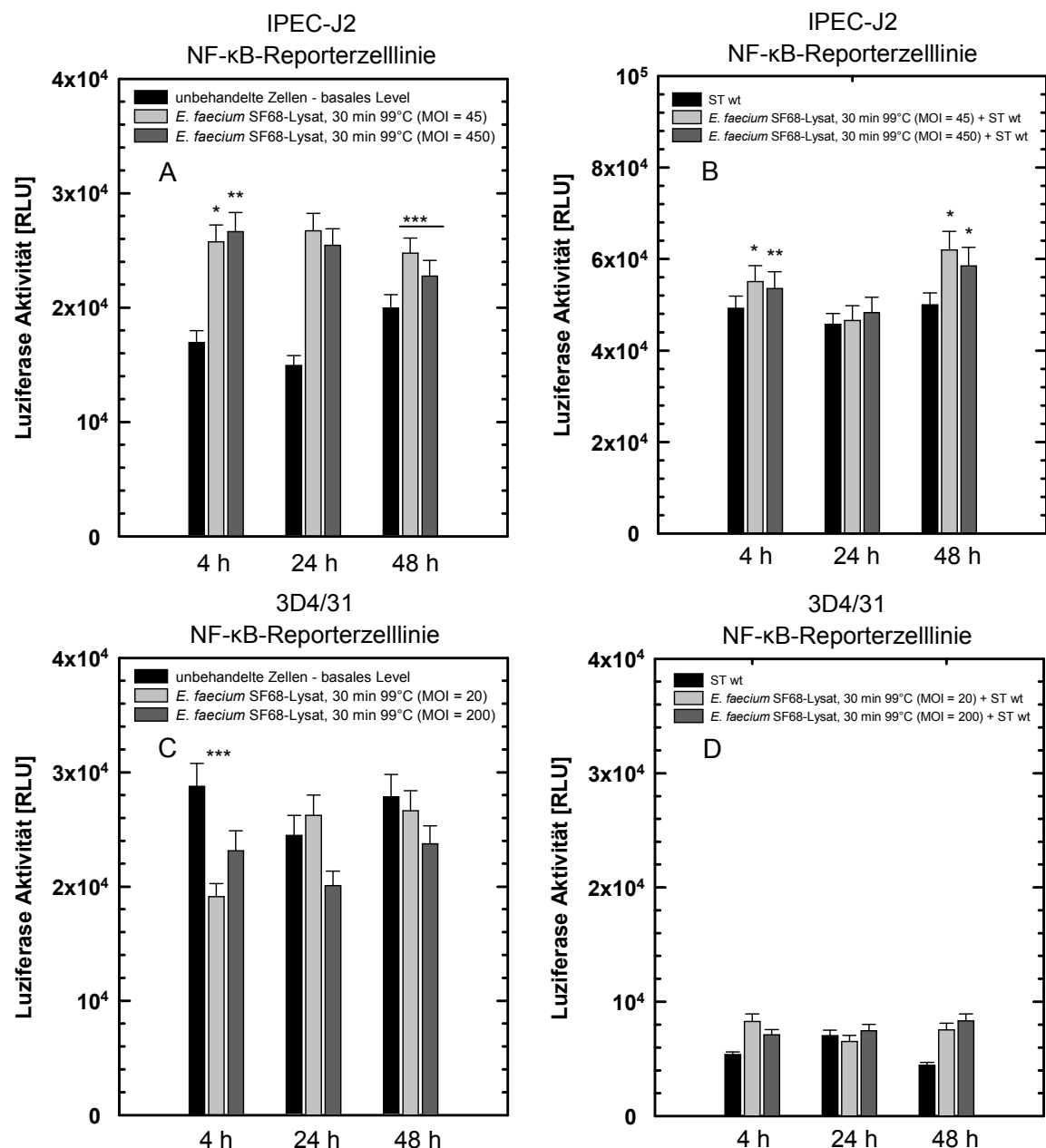
Zur weiteren Charakterisierung der für die Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlichen Substanz wurde untersucht, ob ein 30-minütiges Kochen (99 °C) des *E. faecium*-Lysates die Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindern kann. Mit Hilfe einer Hitzedenaturierung können Enzyme und andere Proteine inaktiviert/denaturiert werden, dadurch ihre biologische Aktivität verlieren und somit ihre Wirkung nicht mehr ausüben. Es kann also überprüft werden, ob Enzyme bzw. Proteine, die im *E. faecium*-Lysat enthalten sind, für die signifikante Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlich sind. In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Behandlung von IPEC-J2 und 3D4/31 mit inaktiviertem Lysat von *E. faecium* SF68 dargestellt. Es wurde sowohl die Auswirkung auf das basale Level der NF- $\kappa$ B-Aktivierung als auch die Wirkungsweise auf die *Salmonella*-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors beobachtet. Wie in Abbildung 40 A gezeigt, führte eine Inaktivierung des *E. faecium* SF68-Lysates in intestinalen Epithelzellen dazu, dass die Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen ausblieb. Es kam, wie schon bei einer Behandlung mit ungekochtem Lysat über 4 Stunden in den IPEC-J2 Zellen gesehen, nach einer Behandlung mit inaktiviertem Lysat über 4, 24 und 48 Stunden zu erhöhten bzw. signifikant erhöhten Werten für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (vergleiche Abbildung 28 A und Abbildung 40 A). In den 3D4/31 Makrophagen konnte dagegen auch nach Hitzeinaktivierung des *E. faecium* SF68-Lysates zum Teil noch eine Reduktion der Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter das basale Level der Zellen gefunden werden (Abbildung 40 C, 4 h: MOI = 20, um ca. 34 % reduziert, \*\*  $p \leq 0,0001$ ). Allerdings gab es im Vergleich zum ungekochten Lysat weniger Signifikanzen und gerade nach einer Behandlung über 48 Stunden wurde nur eine sehr geringe, nicht signifikante Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert (vergleiche Abbildung 29 A und Abbildung 40 C, 48 h: MOI = 20, um ca. 4,4 % reduziert; MOI = 200, um ca. 15 % reduziert). Betrachtet man den Einfluss des inaktivierten Lysates auf die durch *S. Typhimurium* SL1344 induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, so konnte in den IPEC-J2 und 3D4/31 nach einer Behandlung über 4 und 48 Stunden eine erhöhte bis signifikant erhöhte Luziferase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 40 B und D). Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass ein 30-minütiges Kochen bzw. Inaktivieren des *E. faecium*-Lysates dazu führt, dass die Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nur noch sehr gering bzw. kaum vorhanden ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass ein im *E. faecium*-Lysat befindliches Enzym, Protein oder eine proteinhaltige Struktur für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist.

**Abbildung 40: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2; Abb. A, B) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31; Abb. C, D) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem, hitzeinaktiviertem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung und vier Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344. Das basale Level der unbehandelten Zellen bzw. das für die Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat der jeweiligen Konzentration alleine ist für die Abbildungen teilweise schon abgezogen (Abb. B und D).

**40 A/C:** Zeigt die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen durch *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

**40 B/D:** Stellt die Wirkungsweise der Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat auf die durch *Salmonella* ausgelöste NF-κB-Aktivierung dar.

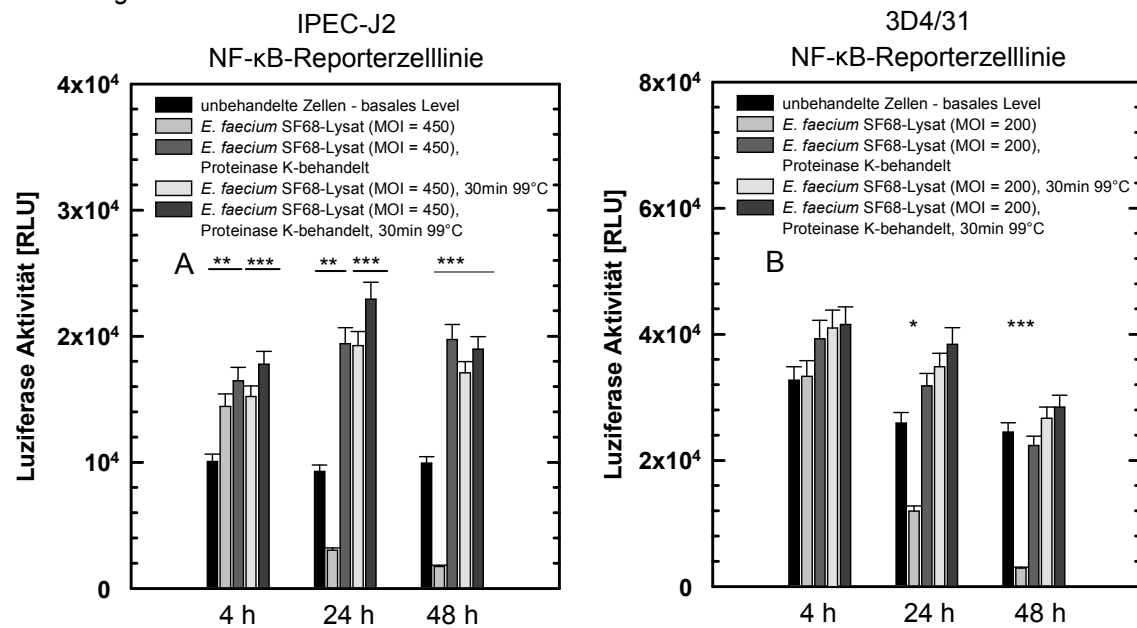
Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



#### 4.3.7.4. Proteinase K-Behandlung des *E. faecium* SF68-Lysates

Um eine weitere Bestätigung dafür zu erhalten, dass es sich bei der für die Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlichen Substanz um ein Enzym, Protein bzw. eine proteinhaltige Struktur handelt, wurden sowohl das zellfreie Bakterienlysat als auch die intakten, mit Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68 mit Proteinase K behandelt. Es wurden 1,25  $\mu$ g Proteinase K/ml Bakterienlysat bzw. Bakteriensuspension eingesetzt. Die Behandlung erfolgte wie in 3.1.5.2 beschrieben. Proteinase K ist eine Serinprotease mit starker proteolytischer Aktivität, die allerdings recht unspezifisch ist (sowohl Endo- als auch Exopeptidase-Aktivität). Zum besseren Vergleich wurden in diesem Versuchsansatz parallel auch hitzeinaktivierte Lysate (30 Min., 99 °C) verwendet. Neben der Proteinase K-Behandlung und der Inaktivierung des *E. faecium*-Lysates mittels Kochens wurde noch eine Kombination aus beidem untersucht. Dazu wurden zunächst intakte *E. faecium* bzw. das LySAT mit Proteinase K behandelt, anschließend wurden die intakten Bakterien lysiert, steril filtriert und das LySAT 30 Min. bei 99 °C inaktiviert. Hier sollte überprüft werden, ob die Proteinase K alleine eine Wirkung auf die Zellen hat. Durch das Kochen wird die Proteinase K inaktiviert und eine negative Auswirkung ausgehend von der Proteinase K auf die Zellen kann ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 41 A und B dargestellt, verhinderte eine Behandlung des zellfreien Lysates mit Proteinase K, ähnlich wie eine Hitzeinaktivierung, die signifikante Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen. In den porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) konnte beim Einsatz von Proteinase K-behandeltem LySAT, hitzeinaktiviertem LySAT und der Kombination aus beidem nach allen untersuchten Behandlungszeiträumen eine signifikant erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B beobachtet werden. Nur die Behandlung mit unbehandeltem zellfreiem Bakterienlysat führte zur Reduktion der Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abbildung 41 A). In 3D4/31 Makrophagen konnte ein ähnliches Ergebnis detektiert werden (Abbildung 41 B). Eine Behandlung mit Proteinase K-behandeltem LySAT, hitzeinaktiviertem LySAT und der Kombination aus beidem führte nach allen drei Behandlungszeiträumen zu erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierungsraten (Abbildung 41 B) und vor allem zu einem Verschwinden der Inhibierung, mit nur vergleichbar bis tendenziell leicht erniedrigten NF- $\kappa$ B-Aktivierungsraten gegenüber denen in unbehandelten Zellen.

**Abbildung 41: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit Proteinase K-behandeltem Lysat von *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung. Gezeigt werden die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen mit Proteinase K-behandeltem *E. faecium* SF68-Lysat unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.

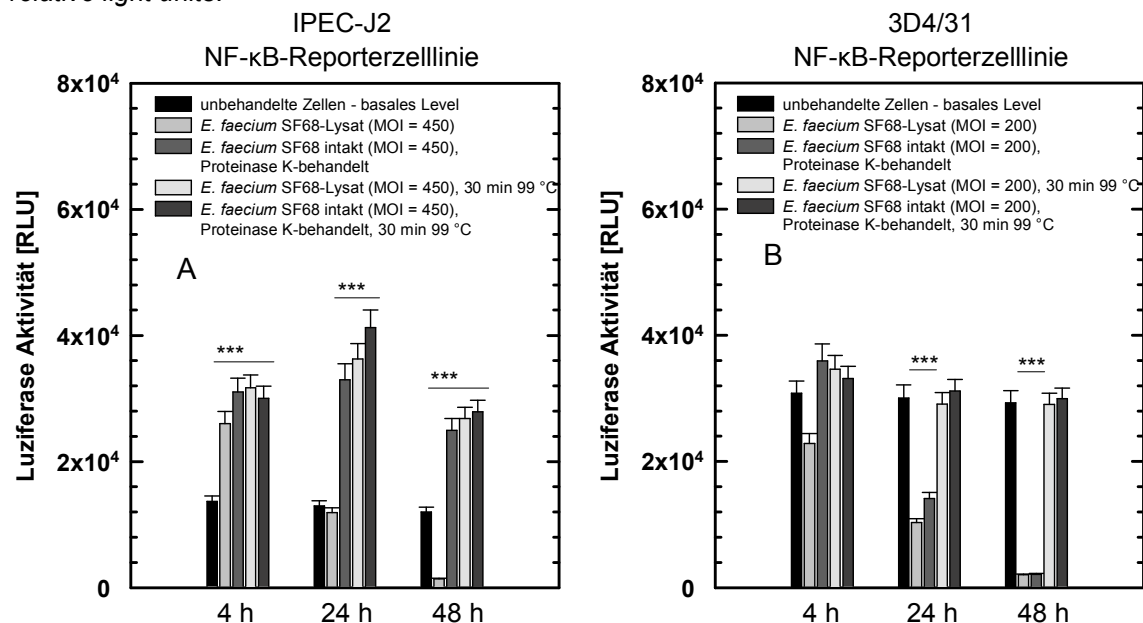


Werden die intakten Bakterien mit Proteinase K behandelt, kann überprüft werden, ob Proteine, die sich auf der Oberfläche der Bakterien befinden oder solche, die ins umgebende Medium abgegeben werden, für die Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich sind. Wie in Abbildung 42 A gezeigt, ähnelte das Muster der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den IPEC-J2 bei einer Behandlung der intakten *E. faecium* SF68 dem bei einer Proteinase K-Behandlung des Lysates (Abbildung 41 A). Nur bei Verwendung des unbehandelten Lysates kam es nach 48-stündiger Behandlung zu einer signifikanten Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen (Abbildung 42 A). In 3D4/31 Makrophagen konnte bei einer Proteinase K-Behandlung der intakten *E. faecium* SF68 allerdings bereits nach einer Behandlung über 24 Stunden eine signifikant reduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ähnlich der, die bei Verwendung des unbehandelten Lysates gefunden wurde, beobachtet werden (Abbildung 42 B). Nach einer Behandlung über 48 Stunden konnte gezeigt werden, dass die Proteinase K-Behandlung der intakten Bakterien im Gegensatz zur Behandlung des zellfreien Lysates nicht ausreicht, um die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu unterdrücken (vergleiche Abbildung 41 B und Abbildung 42 B). Da die 3D4/31 Makrophagen insgesamt deutlich stärker auf das *E. faecium* SF68-Lysat reagieren, kann davon ausgegangen werden, dass Enzyme, Proteine bzw. proteinhaltige Strukturen, welche sich im zellfreien

Bakterienlysat befinden bzw. von den Bakterien sezerniert werden, für die signifikante Inhibierung des zentralen Transkriptionsfaktors verantwortlich sind. Zelloberflächenproteine können aufgrund der hier detektierten Ergebnisse dagegen sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

**Abbildung 42: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit intakten, Gentamycin-abgetöteten, Proteinase K-behandelten *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Behandlung. Gezeigt werden die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen mit intakten, Gentamycin-abgetöteten, Proteinase K-behandelten *E. faecium* SF68 im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.

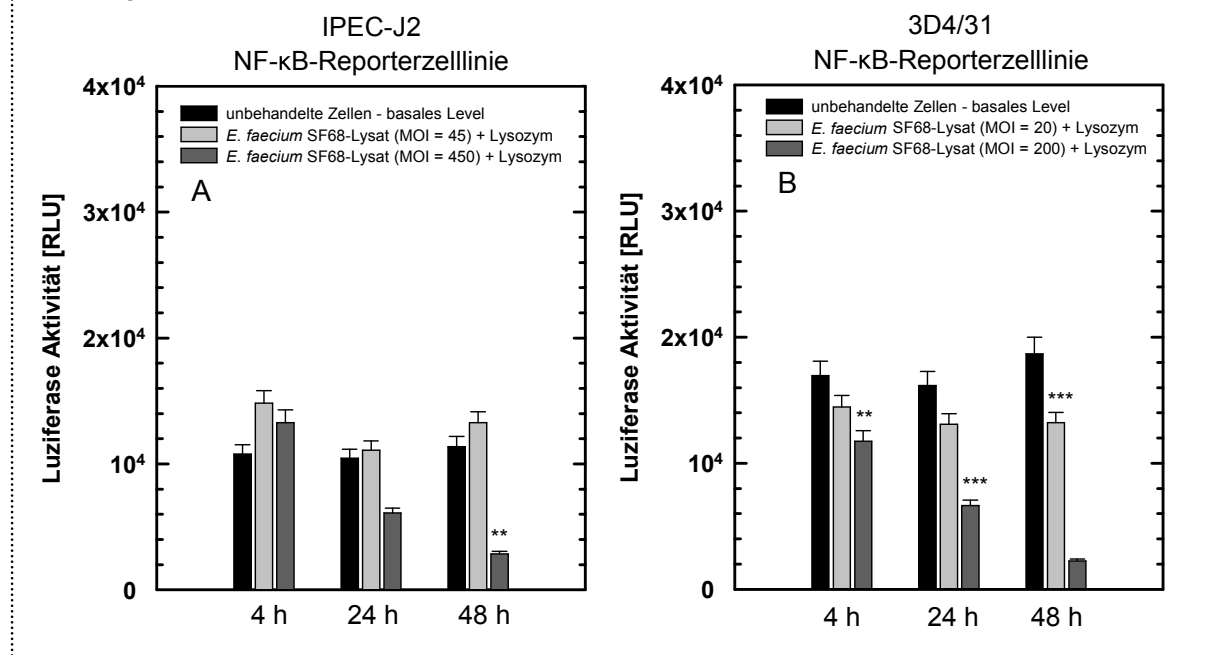


#### 4.3.7.5. Lysozym-Behandlung des *E. faecium* SF68-Lysates

Um zu untersuchen, ob Bestandteile der grampositiven Zellwand der Enterokokken eine Rolle bei der Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielen, wurde das zellfreie Bakterienlysat noch zusätzlich mit Lysozym (0,2  $\mu$ g/ml) behandelt. Lysozym spaltet die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin im Peptidoglykangerüst der Bakterienzellwand. Die durch eine FastPrep<sup>®</sup>-Lyse entstandenen Peptidoglykanfragmente werden so weiter abgebaut. In Abbildung 43 sind die Ergebnisse für die Inkubation der Zellen mit Lysozym-behandeltem Bakterienlysat dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Lysozym-Behandlung des Lysates keinerlei Einfluss auf die Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat. Die Ergebnisse für die Lysozym-Behandlung waren nahezu identisch mit denen für die Lysat-Behandlung alleine (vergleiche Abbildung 28 A, Abbildung 29 A, Abbildung 43 A und B). Ein weiterer Abbau der Peptidoglykanfragmente

der grampositiven Enterokokken hat demnach keine Wirkung auf die Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B.

**Abbildung 43: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit Lysozym-behandeltem *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Behandlung. Gezeigt werden die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen mit Lysozym-behandeltem *E. faecium* SF68-Lysat im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.



#### 4.3.7.6. Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat und Zugabe von Katalase bzw. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK

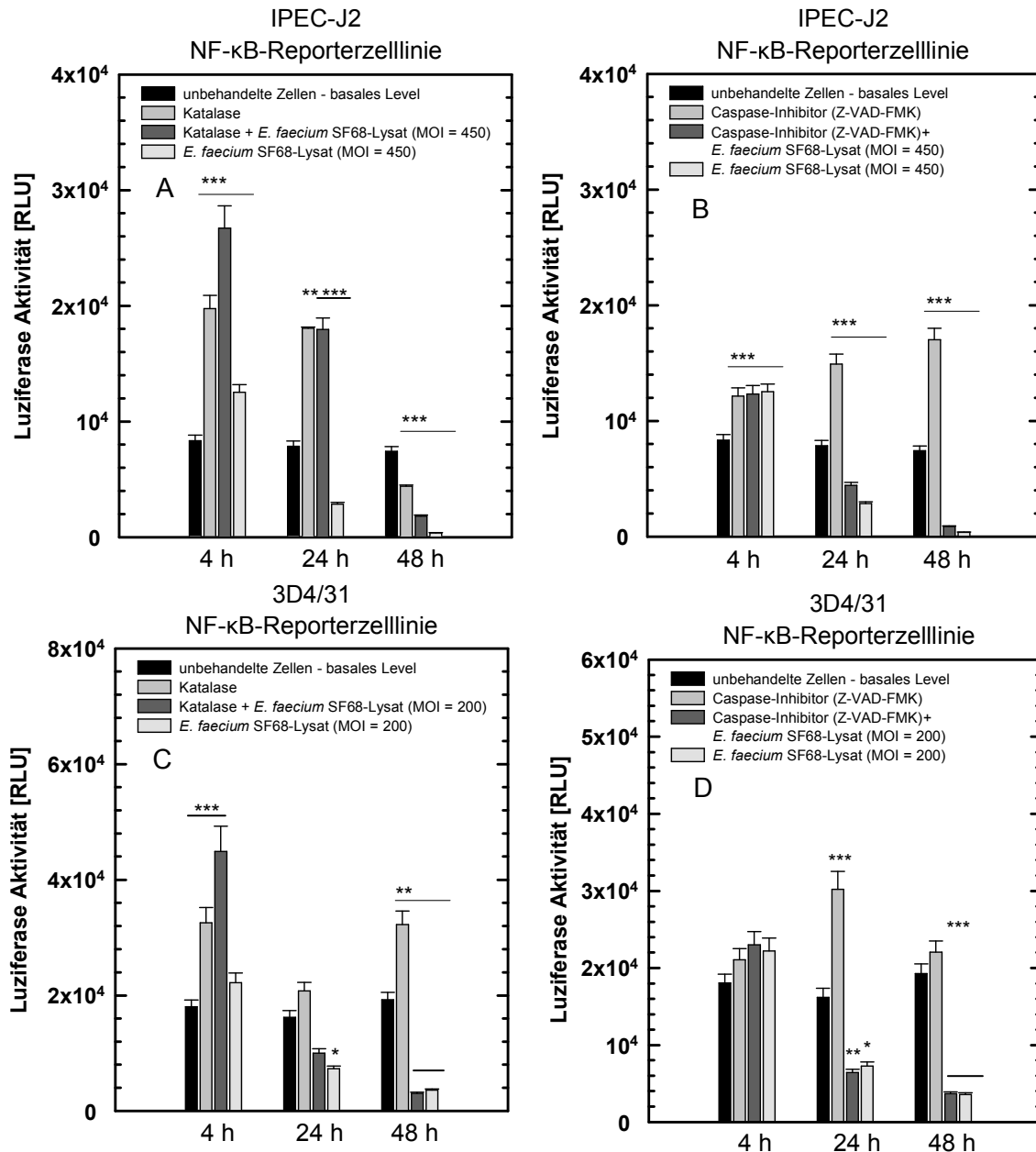
In diesem Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob das im zellfreien Lysat eventuell vorhandene Wasserstoffperoxid einen negativen Einfluss auf die Zellen hat und so für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist, was schon in anderen Studien gezeigt wurde [750, 751]. Dafür wurden die Zellen parallel zur Behandlung mit dem zellfreien Lysat ebenfalls mit Katalase (2500 U/100  $\mu$ l) behandelt.

Eine weitere Fragestellung war, ob die zellfreien Lysate von *E. faecium* apoptotische Vorgänge in den Zellen induzieren und es durch das Absterben der Zellen zu einer so geringen Aktivierungsrate des zentralen Transkriptionsfaktors kommt. Für diese Untersuchungen wurde ein zellpermeabler Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) eingesetzt, der irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspase Proteasen bindet. Z-VAD-FMK inhibiert z. B. die Aktivität der ICE-ähnlichen Proteasen und so auch die Apoptose der Zellen [752–754]. Erfolgt also eine Blockierung der Apoptose, so dürfte es nicht zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommen, falls apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen. Die Zellen

wurden für diese Versuche gleichzeitig mit zellfreiem Lysat und 10 µg/ml Z-VAD-FMK behandelt. In Abbildung 44 sind sowohl die Ergebnisse für die Behandlung mit Katalase (Abb. A und C) als auch die für die Verwendung des Caspase-Inhibitors V-ZAD-FMK (Abb. B und D) in beiden Zelllinien dargestellt. In intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) hatte die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 und Katalase keinen Einfluss auf die durch das Lysat verursachte Inhibierung der Aktivierung von NF-κB (Abbildung 44 A und C). Nach einer Behandlung über 24 Stunden in den 3D4/31 und über 48 Stunden (3D4/31 und IPEC-J2) kam es auch nach Katalase-Zusatz zu einer signifikanten Reduktion der NF-κB-Aktivierung. Die Katalase-Behandlung der Zellen alleine führte zu einer signifikant erhöhten NF-κB-Aktivierung nach 4-stündiger Behandlung in beiden Zelllinien und ebenfalls nach 24-stündiger Behandlung in den IPEC-J2 (Abbildung 44 und C). Für die Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor V-ZAD-FMK konnten ebenfalls eindeutige Ergebnisse detektiert werden (Abbildung 44 B und D). Nach 4-stündiger Behandlung wurden zunächst in beiden Zelllinien tendenziell bis signifikant (IPEC-J2) erhöhte Aktivierungsraten von NF-κB für alle untersuchten Behandlungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gemessen. Erfolgte die Behandlung über 24 und 48 Stunden, so konnte für IPEC-J2 und 3D4/31 bei Lysat-Behandlung und bei gleichzeitiger Behandlung mit Z-VAD-FMK eine signifikant erniedrigte Aktivierung von NF-κB beobachtet werden (Abbildung 44 B und D). Eine Inhibierung der Apoptose der Zellen konnte dementsprechend die Reduktion der NF-κB-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen ebenso wenig verhindern, wie eine Zugabe von Katalase zum Abbau des eventuell vorhandenen Wasserstoffperoxids. Daraus lässt sich schließen, dass weder apoptotische Prozesse noch das Vorhandensein von reaktivem Wasserstoffperoxid an der Inhibierung der Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors beteiligt sind.



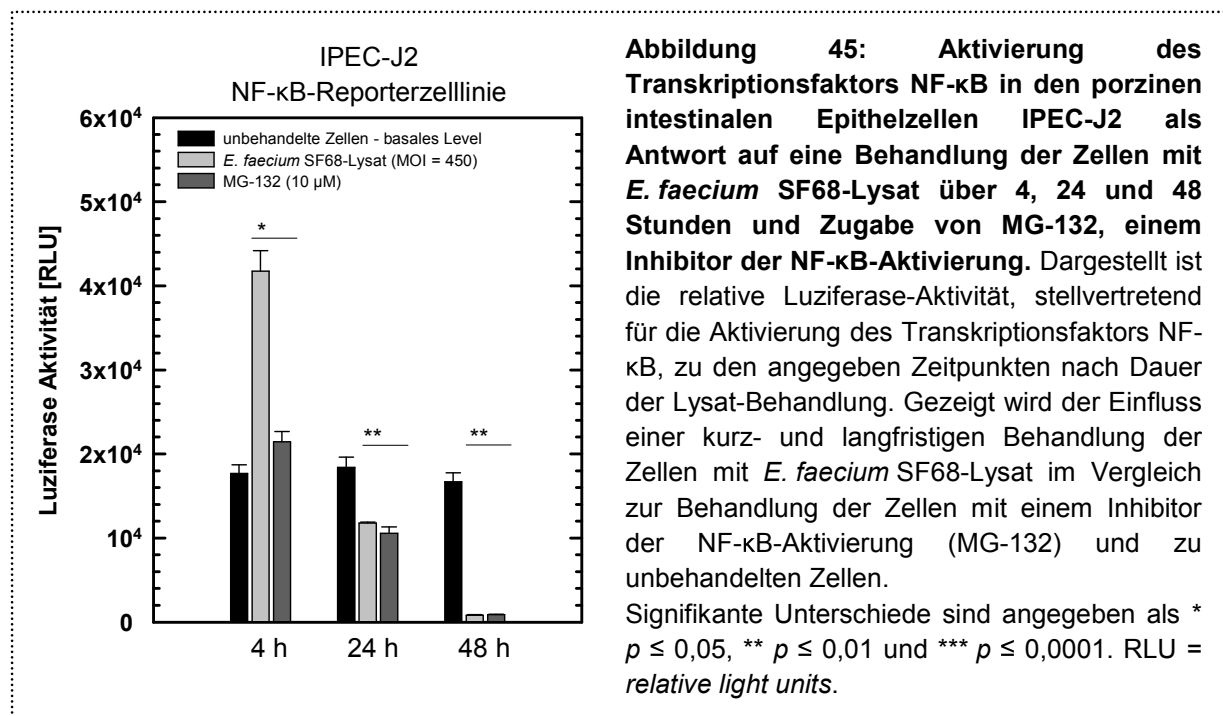
**Abbildung 44: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden und Zugabe von Katalase (Abb. A und C) bzw. dem Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (Abb. B und D).** Dargestellt ist jeweils die relative Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB zu den angegebenen Zeitpunkten nach Dauer der Lysat-Behandlung. Gezeigt werden die Einflüsse einer kurz- und langfristigen Behandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat unter Zugabe von Katalase bzw. dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RLU = relative light units.



#### 4.3.7.7. Behandlung der Zellen mit *E. faecium* SF68-Lysat bzw. MG-132, einem Inhibitor der NF-κB-Aktivierung

MG-132 ist ein wirksamer, zellpermeabler Proteasom Inhibitor. Es handelt sich um ein Peptidaldehyd, welches als Substratanalogon selektiv die proteolytische Aktivität des 26S

Proteasoms blockiert [755]. Dies führt zu einer reduzierten Degradierung von Ubiquitin-konjugierten Proteinen in Säugetierzellen, z. B. wird auch die proteosomale Degradation von I $\kappa$ B (IC<sub>50</sub> = 3  $\mu$ M) verhindert. Dementsprechend führt die Behandlung mit MG-132 zu einer Inhibierung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B [755]. In diesem Versuchsansatz steht der Vergleich der Wirkungsweise des *E. faecium* SF68-Lysates mit dem des Inhibitors der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (MG-132) im Fokus. Hierzu wurde die porcine intestinale Epithelzelle (IPEC-J2) betrachtet (Abbildung 45). Nach einer Behandlung der Zellen über vier Stunden mit dem Bakterienlysat konnte eine signifikant erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 45). Bei einer 4-stündigen Behandlung der Zellen mit MG-132 konnte nur eine tendenziell leicht erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors gemessen werden. Erfolgte die Lysat- bzw. MG-132-Behandlung über 24 und 48 Stunden, so konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Bei beiden Behandlungen kam es zu einer signifikant reduzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Abbildung 45). In den IPEC-J2 führte der Inhibitor nach Behandlung über 24 und 48 Stunden dementsprechend zu der erwarteten Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

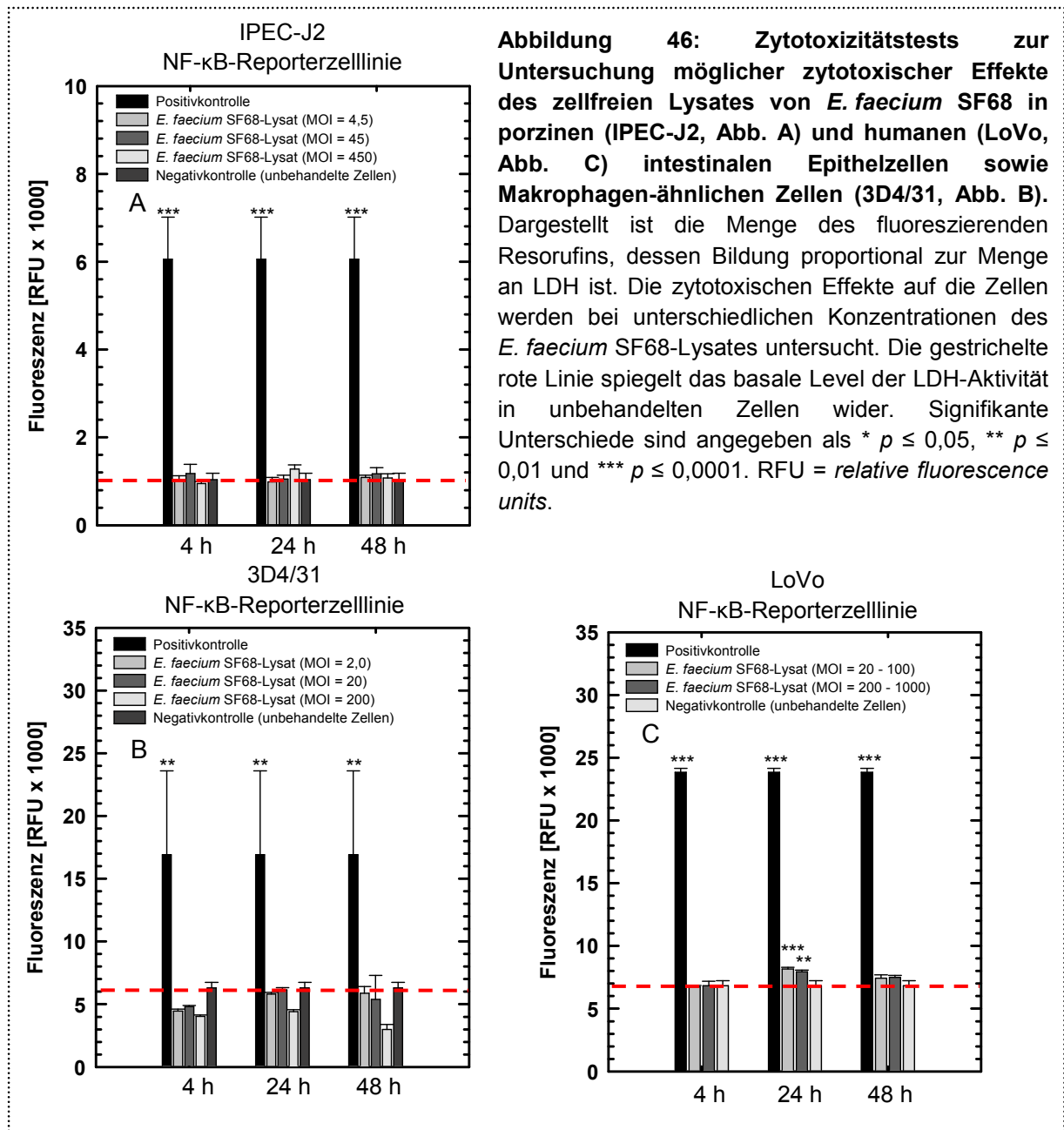


#### 4.4. Untersuchung der möglichen zytotoxischen Effekte von zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat

Für die Überprüfung möglicher zytotoxischer Effekte von Bestandteilen des zellfreien Lysates von *E. faecium* SF68 wurden Zytotoxizitätstests (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega) durchgeführt. Diese Untersuchung ist besonders wichtig, da untersucht werden soll, ob es aufgrund von zytotoxischen Effekten des Lysates zu einem Absterben der Zellen kommt. Ein Absterben sollte demzufolge als Ursache für die

Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausgeschlossen werden. Die Membranintegrität der behandelten sowie der unbehandelten Zellen wird hier verglichen. Nach Akkumulation im Zellüberstand wird die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) aus Zellen mit zerstörter und somit permeabler Membran fluorimetrisch gemessen. Als Positivkontrolle wurde der im Kit mitgelieferte Lysispuffer verwendet. Die Abbildung 46 A – C zeigen die Ergebnisse für die Zytotoxizitätstests mit *E. faecium* SF68-Lysat-Behandlung der Zellen über 4, 24 und 48 Stunden. Es wurden dabei drei verschiedene Konzentrationen des Lysates untersucht:  $10^6$  lysierte Bakterien/ml (MOI= 2 – 10),  $10^7$  lysierte Bakterien/ml (MOI= 20 – 100) und  $10^8$  lysierte Bakterien/ml (MOI= 200 – 1000). In den porzinen intestinalen Epithelzellen war die prozentuale Anzahl abgestorbener Zellen nach Behandlung mit dem Lysispuffer (Positivkontrolle) um ca. 482 % gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht (Abbildung 46 A, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Eine Behandlung mit dem zellfreien Lysat von *E. faecium* SF68 führte dagegen nicht zu einem erhöhten Anteil abgestorbener Zellen. In porzinen 3D4/31 Makrophagen konnte ein nahezu identisches Ergebnis gefunden werden (Abbildung 46 B). Hier wurde der Anteil an abgestorbenen Zellen durch Zugabe des Lysispuffers um ca. 169 % (\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ ) erhöht, eine Lysat-Behandlung mit den drei unterschiedlichen Konzentrationen hatte jedoch wiederum keine Wirkung auf die Freisetzung der LDH (Abbildung 46 B) in 3D4/31 Zellen. Dementsprechend scheint das Lysat keinen wesentlichen Einfluss auf die Membranintegrität der Zellen zu haben und weitergehend auch nicht zu einem signifikant erhöhten Absterben der IPEC-J2 und 3D4/31 zu führen. Daraus lässt sich folgern, dass in den untersuchten porzinen Zellen ein Absterben der Zellen, aufgrund von zytotoxischen Effekten des Lysates, nicht für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist.

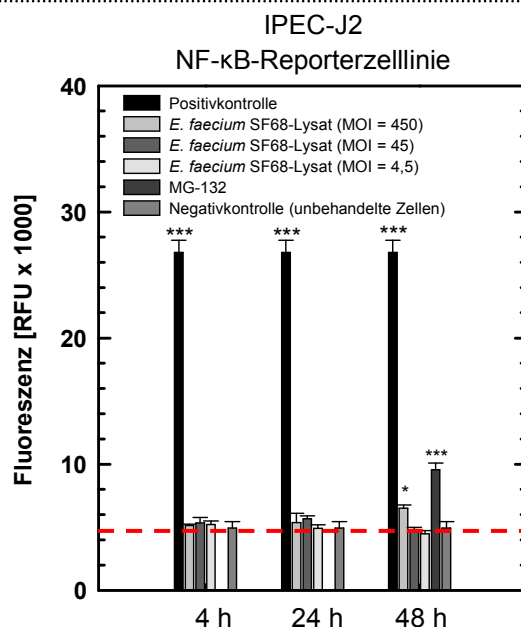
Die Freisetzung der LDH als Maß für den Anteil abgestorbener Zellen war in den humanen Kolonkarziomzellen (LoVo) nach Lysispuffer-Behandlung ebenfalls verstärkt (Abbildung 46 C, um ca. 249 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Daneben konnte für eine 24-stündige Behandlung mit dem *E. faecium* SF68-Lysat in den LoVo's ebenfalls ein gegenüber den unbehandelten Zellen signifikant erhöhter Anteil abgestorbener Zellen detektiert werden (Abbildung 46 C, MOI = 20 – 100: um ca. 19 % erhöht, \*\*\*  $p = 0,0001$ ; MOI = 200 – 1000: um ca. 16 % erhöht, \*\*  $p = 0,001$ ). Der prozentuale Anteil abgestorbener Zellen nach Lysat-Behandlung war allerdings deutlich geringer, als der nach Lysispuffer-Behandlung ermittelte (vergleiche Lysispuffer: 349 % und Lysat-Behandlung: 16 – 19 %).



Neben der möglichen zytotoxischen Wirkung des *E. faecium* SF68-Lysates wurde ebenfalls die Wirkung des Proteasom-Inhibitors MG-132 (Inhibitor der NF-κB-Aktivierung) untersucht. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests in den IPEC-J2 sind im Vergleich zur Lysat-Behandlung in Abbildung 47 dargestellt. Die Behandlung mit Lysispuffer (Positivkontrolle) führte zu einer um ca. 444 % signifikant (\*\*\*)  $p \leq 0,0001$  erhöhten Freisetzung von LDH, der Anteil der abgestorbenen Zellen war demnach deutlich erhöht. Erfolgte die Inkubation mit MG-132 über 48 Stunden, so konnte in den intestinalen Epithelzellen ebenfalls eine signifikant erhöhte Anzahl von abgestorbenen Zellen detektiert werden (Abbildung 47, um ca. 93 % erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Für die höhere MOI des zellfreien Bakterienlysates konnte in diesem Versuch ebenfalls eine gegenüber unbehandelten Zellen um ca. 32 % erhöhte LDH-Freisetzung als Maß für den Anteil an abgestorbenen Zellen detektiert werden (\*  $p =$

0,03). Allerdings lagen diese prozentualen Anteile an abgestorbenen Zellen weit unter denen, die durch die Zugabe des Lysispuffers als Positivkontrolle erhalten werden konnten. Eine Inhibierung der NF-κB-Aktivierung über einen längeren Zeitraum, wie sie durch das Bakterienlysat bzw. MG-132 ausgelöst wird, könnte nach einer gewissen Dauer zu einer Apoptose führen, da wichtige regulatorische Gene nicht mehr exprimiert werden. Diese Apoptose würde wahrscheinlich im Vergleich zur Behandlung mit dem Lysispuffer, der sofort zum Absterben einer Vielzahl von Zellen führt, deutlich langsamer beginnen. Ein Hinweis auf Apoptose konnte in 3D4/31 Makrophagen nicht gefunden werden, die insgesamt sensibler auf das zellfreie Bakterienlysat der Enterokokken zu reagieren scheinen. In IPEC-J2 Zellen (Abbildung 47) konnte nach 48-stündiger Behandlung eine zwar signifikant erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen gefunden werden, aber prozentual war dieser Anteil deutlich geringer, als der durch den Lysispuffer erhaltene Wert.

**Abbildung 47: Zytotoxizitätstests zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte des zellfreien Lysates von *E. faecium* SF68 und MG-132 in porcinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2).** Dargestellt ist die Menge des fluoreszierenden Resorufins, dessen Bildung proportional zur Menge an LDH ist. Die zytotoxischen Effekte auf die Zellen werden bei unterschiedlichen Konzentrationen des *E. faecium* SF68-Lysates und nach Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 untersucht. Die gestrichelte rote Linie spiegelt das basale Level der LDH-Aktivität in unbehandelten Zellen wider. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RFU = *relative fluorescence units*.

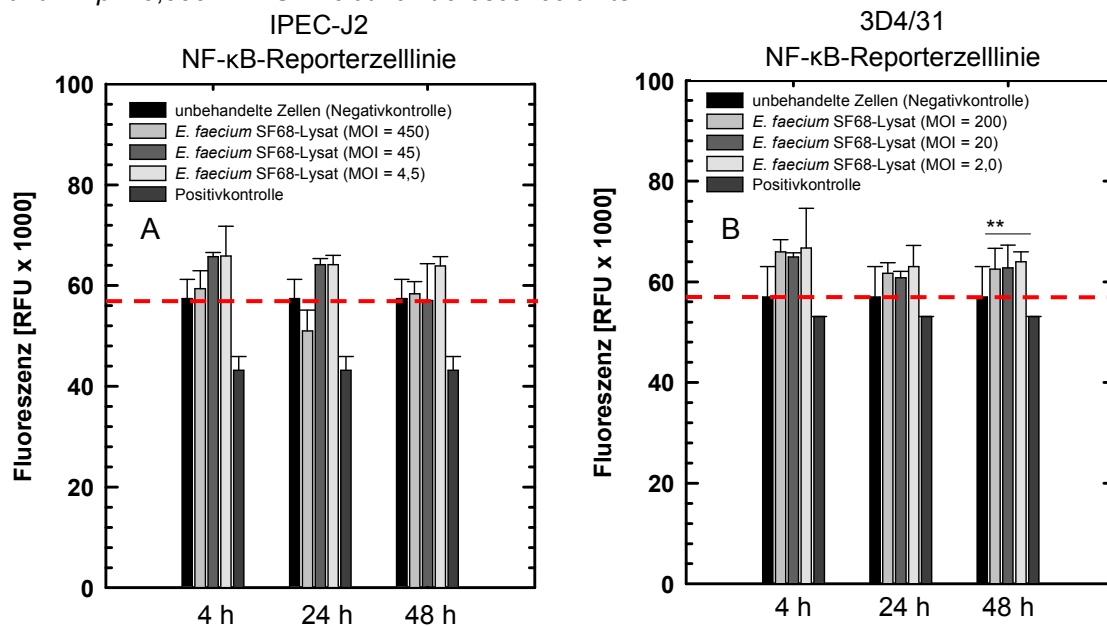


#### 4.5. Untersuchung der möglichen Effekte von zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat auf die Viabilität der Zellen

Die Zellviabilitätsassays (CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assays, Promega) wurden durchgeführt, um die Wirkung des zellfreien *E. faecium* SF68-Lysates auf die Viabilität der Zellen zu untersuchen. Die relative Zahl lebender, viabler Zellen kann dabei detektiert werden. Der Assay beruht auf einem zellpermeablen Peptidsubstrat (GF-AFC), welches in intakte, lebende Zellen eindringt und dort durch eine Protease gespalten wird, die auf viable Zellen beschränkt ist und bei Verlust der Membranintegrität inaktiv wird. Die Menge eines dadurch gebildeten fluoreszierenden Produktes (AFC) ist dabei proportional zur Anzahl viabler Zellen in Kultur. Als Positivkontrolle wurde ein Lysispuffer verwendet. Abbildung 48 A und B stellen die Ergebnisse der Zellviabilitätstests in intestinalen Epithelzellen und 3D4/31

Makrophagen dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass mittels Zellviabilitätstest keine signifikant erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen nach Lysat-Behandlung in IPEC-J2 und 3D4/31 detektiert werden konnte (Abbildung 48 A und B). Eine Behandlung mit dem zellfreien Lysat scheint eher zu einer tendenziell bis signifikant (Abbildung 48 B, 3D4/31, 48 h) verstärkten Aktivität der Protease, als Maß für die Anzahl viable Zellen, zu führen.

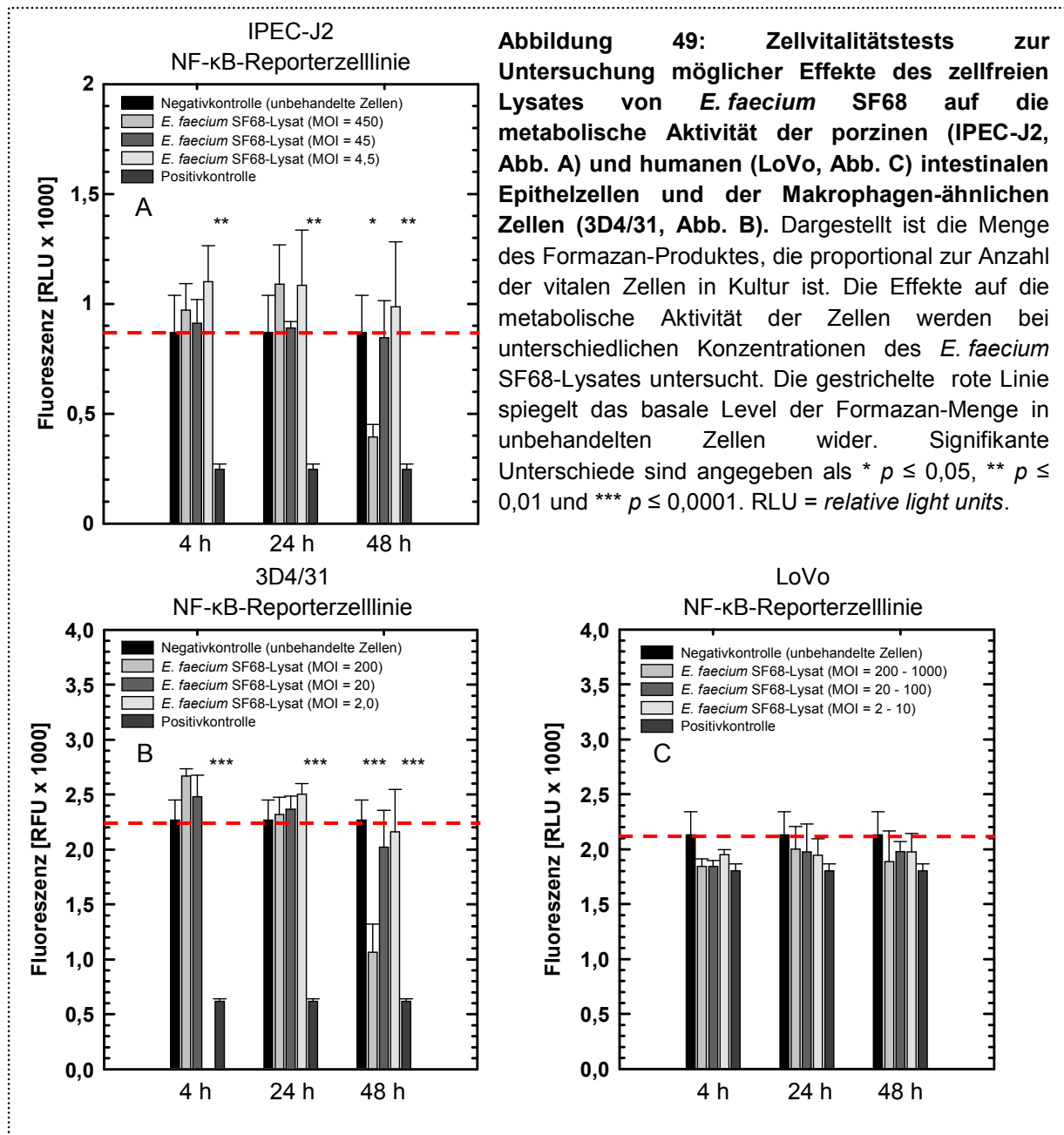
**Abbildung 48: Zellviabilitätstests zur Untersuchung möglicher Effekte des zellfreien Lysates von *E. faecium* SF68 auf die Zellviabilität in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B).** Dargestellt ist die Menge des fluoreszierenden AFC, dessen Bildung proportional zur Anzahl viable, lebender Zellen ist. Die Effekte auf die Zellen werden bei unterschiedlichen Konzentrationen des *E. faecium* SF68-Lysates untersucht. Die gestrichelte rote Linie spiegelt das basale Level der AFC-Fluoreszenz in unbehandelten Zellen wider. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . RFU = *relative fluorescence units*.



#### 4.6. Untersuchung der möglichen Effekte von zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat auf die metabolische Aktivität der Zellen

Neben der Bestimmung möglicher zytotoxischer Effekte bzw. der Effekte auf die Viabilität der Zellen, wurde auch untersucht, welchen Einfluss das zellfreie Lysat von *E. faecium* SF68 auf die metabolische Aktivität (Vitalität) der Zellen hat. Dazu wurde der CellTiter-6® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) verwendet. Grundlage dieses Assays ist die reduktive Umwandlung einer Tetrazolium-Komponente (MTS) in ein lösliches, farbiges Formazan-Produkt. Diese Reduktion geht wahrscheinlich auf die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zurück, die durch Dehydrogenasen in vitalen, metabolisch aktiven Zellen produziert werden. Die Menge der umgesetzten MTS-Komponente wird indirekt durch die Menge des gemessenen Formazan-Farbstoffs detektiert, wobei die Menge des Formazan-Produktes direkt proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in Kultur ist. Die

Ergebnisse der Zellvitalitätstests in den porzinen IPEC-J2, 3D4/31 und den humanen LoVo sind in Abbildung 49 A – C dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sowohl in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2), als auch in Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 die metabolische Aktivität der Zellen nach Zugabe des Lysispuffers (Positivkontrolle) um ca. 72 % (Abbildung 49 A, IPEC-J2, \*\*  $p = 0,001$ ) bzw. 73 % (Abbildung 49 B, 3D4/31, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) reduziert war. Eine ebenfalls signifikant reduzierte Anzahl metabolisch aktiver Zellen konnte nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat (Abbildung 49 A, IPEC-J2: MOI = 450, um ca. 55 % reduziert, \*\*  $p = 0,01$ ; Abbildung 49 B, 3D4/31: MOI = 200, um ca. 53 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) gefunden werden. Dies macht deutlich, dass eine langfristige Lysat-Behandlung der porzinen Zellen einen Einfluss auf ihre Vitalität, ihre metabolische Aktivität zu haben scheint. In humanen LoVo-Zellen konnte durch den Lysispuffer nur eine geringfügig reduzierte metabolische Aktivität der Zellen detektiert werden. Diese Reduktion ist vergleichbar mit der, die ebenfalls durch die Bakterienlysate ausgelöst wird (Abbildung 49 C). Es konnten allerdings keine Signifikanzen ermittelt werden.



#### 4.7. Bestimmung der Invasionseffizienz und der intrazellulären Persistenz

Für diese Arbeit wurden sechs verschiedene *S. Typhimurium* Mutanten-Stämme in drei verschiedenen porzinen Zelllinien (Epithelzelllinie: IPEC-J2, Makrophagen-ähnliche Zelllinien: 3D4/31, PLN/C2) zur Infektion verwendet und hinsichtlich ihrer Invasionseffizienzen und intrazellulären Persistenz über 20 Stunden getestet. Daneben wurden auch Versuche mit verschiedenen Zink-Inkubationen (1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 2 Stunden vor der Infektion, direkt vor der Infektion und 2 Stunden nach der Infektion) durchgeführt.

Epithelzellen unterscheiden sich bezüglich der *Salmonella*-Invasion von Makrophagen-ähnlichen Zellen. Bei Epithelzellen erfolgt die Aufnahme ausschließlich über das aktive Eindringen der Bakterien. Dabei kommt es zunächst mittels Adhäsinen zur Anheftung an die Wirtszelle. Anschließend erfolgt durch das SPI1-codierte T3SS-1 die Injektion von

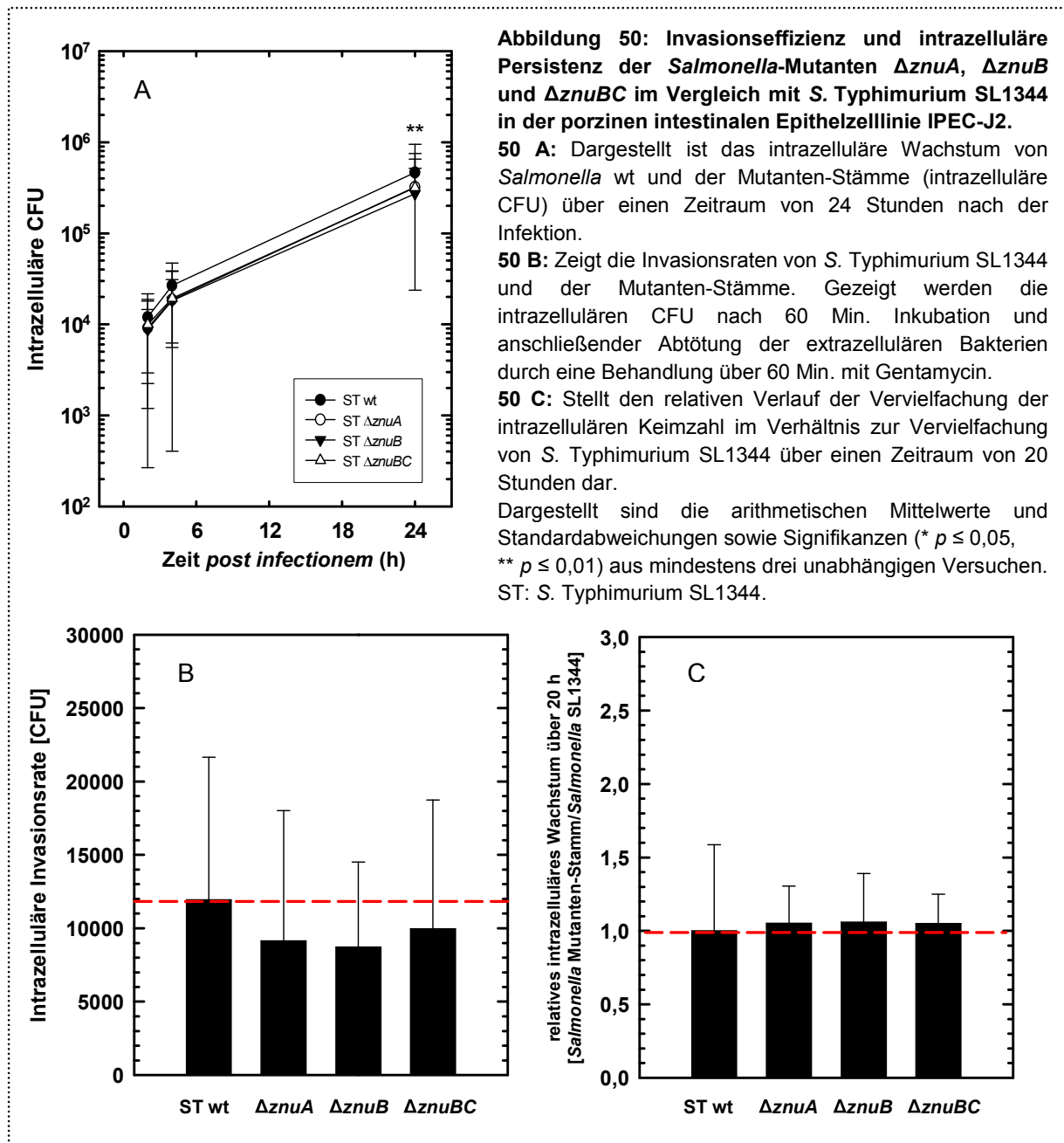


Effektorproteinen in die Zielzelle, welche das sogenannte „*membrane ruffling*“ auslösen und die Aufnahme von *Salmonella* durch Makropinozytose in die Wirtszelle ermöglichen. Bei Monozyten/Makrophagen-ähnlichen Zellen spielt daneben noch ein weiterer Aufnahmeprozess eine Rolle. Hier erfolgt die Aufnahme nicht ausschließlich über das aktive Eindringen der Bakterien, sondern zusätzlich über die Phagozytose der Makrophagen. Dementsprechend erfolgte die Infektion mit *Salmonella* in den Makrophagen aufgrund der gegenüber den Epithelzellen erhöhten Aufnahme teilweise nur über 30 und nicht über 60 Min.

### 4.7.1. Untersuchung der $\Delta znuABC$ -Mutanten

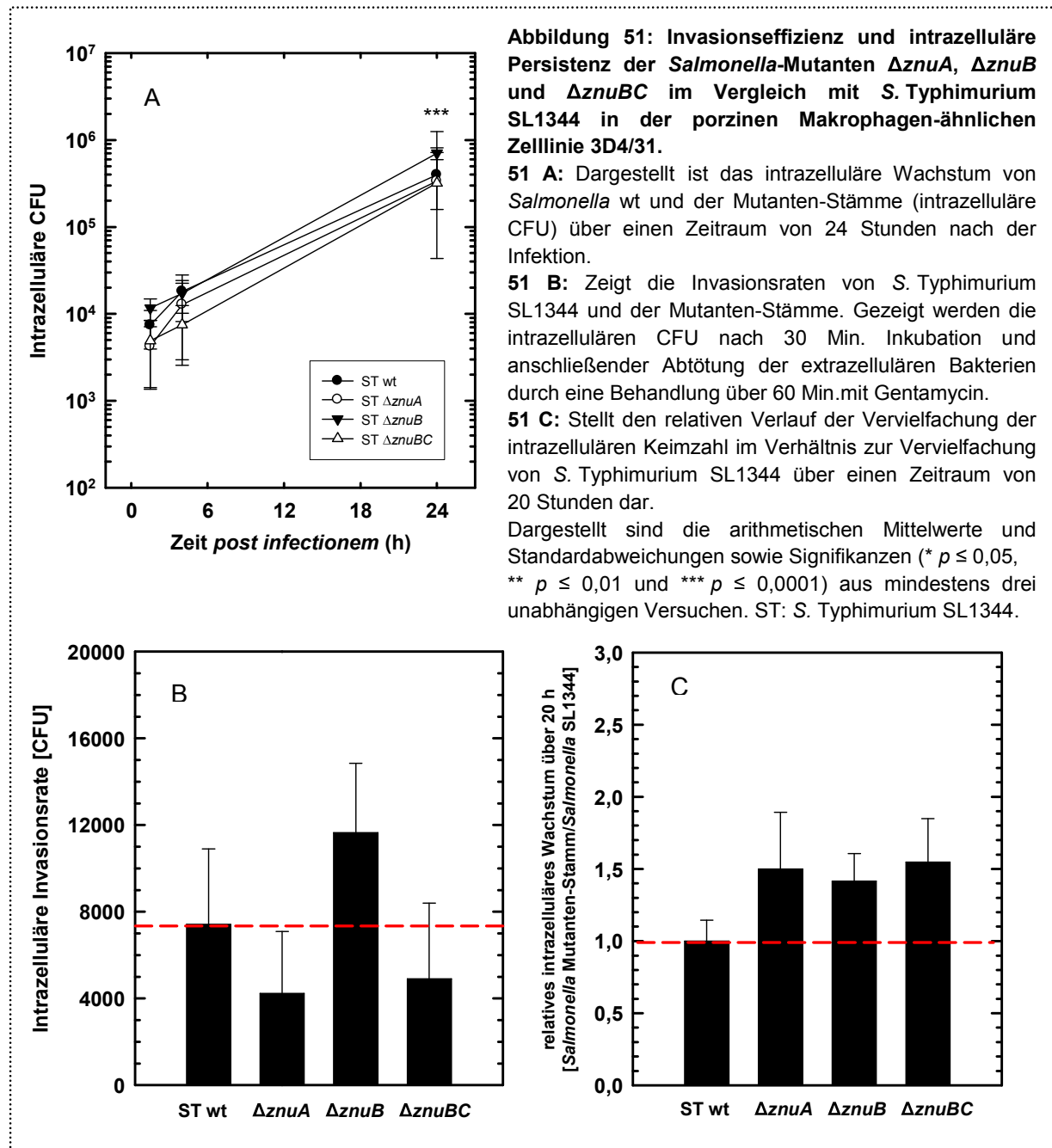
Der ZnuABC-Transporter besteht aus drei Untereinheiten: ZnuA, der periplasmatischen Zinkbindenden Untereinheit, der Membrankomponente ZnuB sowie der ATPase, ZnuC. Für die Versuche wurden  $\Delta znuA$ -,  $\Delta znuB$ - und  $\Delta znuBC$ -Mutanten im Vergleich zu *S. Typhimurium* SL1344 (Wildtyp) verwendet.

In porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) zeigten die intrazellulären Invasionsraten der *znuABC*-Mutanten zwar keine signifikanten Unterschiede verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344, allerdings war für alle drei Mutanten-Stämme die Invasivität tendenziell gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 verringert (Abbildung 50 B,  $\Delta znuA$ : 23,3 %;  $\Delta znuB$ : 30,5 %;  $\Delta znuBC$ : 16 %). Innerhalb von 20 Stunden (24-h-Wert/4-h-Wert) nahm die intrazelluläre Keimzahl von *S. Typhimurium* SL1344 um das 17-Fache zu (Abbildung 50 A). Das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden (Abbildung 50 C) keines der untersuchten *Salmonella*-Mutanten unterschied sich signifikant vom Wildtyp *S. Typhimurium* SL1344. Die intrazellulären CFU der  $\Delta znuB$ - und  $\Delta znuBC$ -Mutante waren zum 24-Stunden-Zeitpunkt gegenüber den Werten von *S. Typhimurium* SL1344 signifikant reduziert (Abbildung 50 A,  $\Delta znuB$ , \*\*  $p = 0,001$ ;  $\Delta znuBC$ , \*  $p = 0,028$ ), was höchstwahrscheinlich auf die geringere Invasionsrate zurückzuführen ist.



Die intrazelluläre Invasivität der  $\Delta znuABC$ -Mutanten unterschied sich auch bei den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 nicht signifikant von *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 51 B). Ebenso wie bei den intestinalen Epithelzellen konnte eine reduzierte Invasionsrate für den  $\Delta znuA$  und den  $\Delta znuBC$ -Mutanten beobachtet werden ( $\Delta znuA$ : 43 %;  $\Delta znuBC$ : 34 %). Im Gegensatz zur ebenfalls verringerten Invasivität des  $\Delta znuB$ -Mutanten in IPEC-J2 Zellen konnte in 3D4/31 Makrophagen eine deutlich erhöhte Invasionseffizienz für diesen Mutanten gezeigt werden (vergleiche Abbildung 50 B und Abbildung 51 B; 57 % gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 erhöht). Das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden zeigte in den Makrophagen-ähnlichen Zellen wie in Abbildung 51 C dargestellt im Gegensatz zu den IPEC-J2 gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 tendenziell eine Erhöhung. Für die intrazellulären CFU konnte zum letzten gemessenen Zeitpunkt (24-

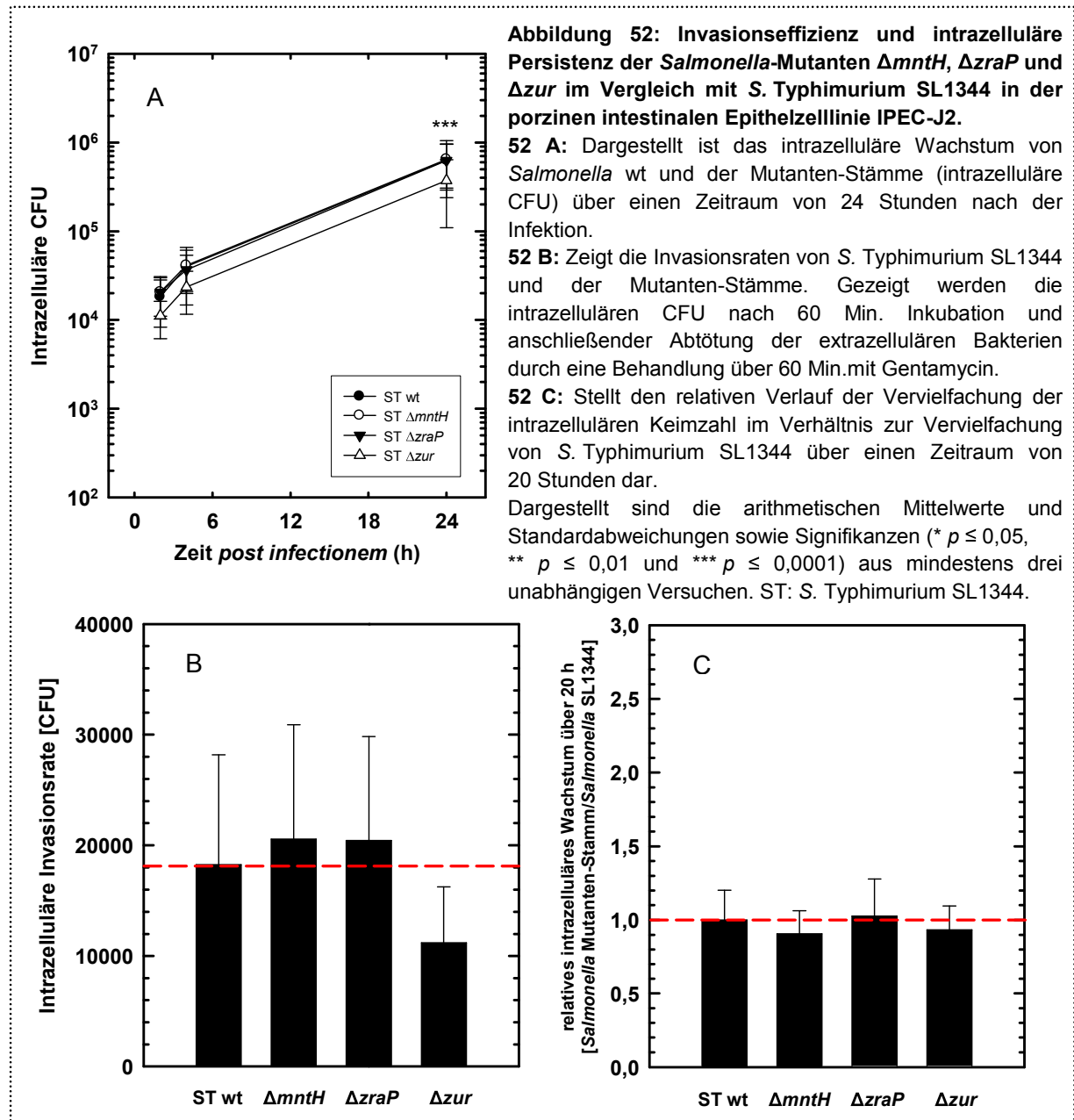
Stunden-Wert) eine signifikant erhöhte intrazelluläre Keimzahl des  $\Delta znuB$ -Mutanten verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 ermittelt werden (Abbildung 51 A; 1,7-fach erhöht, \*\*\*  $p = 0,0001$ ).



#### 4.7.2. Untersuchung der $\Delta mntH$ -, $\Delta zraP$ - und $\Delta zur$ -Mutanten

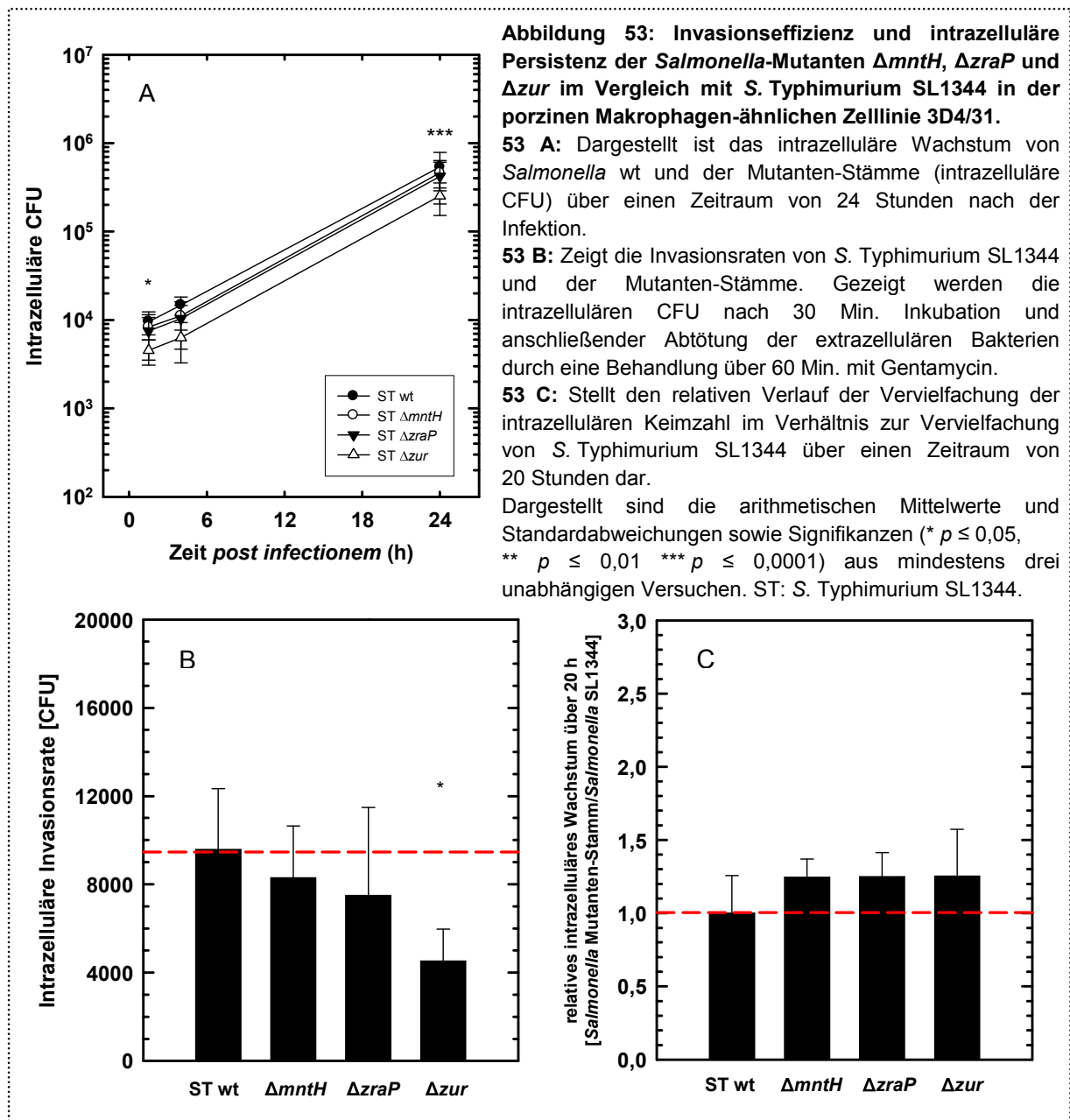
Beim Zur-Protein handelt es sich um den Repressor des *znu*-Genclusters. ZraP spielt eine wichtige Rolle bei der Zink-Toleranz und kann Zink binden. MntH ist das NRAMP-Homolog von *Salmonella* und ein Protonen-abhängiger Metallionen-Transporter. Es wurden  $\Delta mntH$ -,  $\Delta zraP$ - und  $\Delta zur$ -Mutanten zusammen mit dem Wildtyp *S. Typhimurium* SL1344 für die Invasions-Assays eingesetzt.

Die Invasionseffizienzen von  $\Delta mntH$  und  $\Delta zraP$  zeigten in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) eine erhöhte Tendenz gegenüber *S. Typhimurium* SL1344. Im Gegensatz dazu war die Invasivität der  $\Delta zur$ -Mutante deutlich verringert (Abbildung 52 B; 38,6 %). Der relative Verlauf des intrazellulären Wachstums über 20 Stunden zeigte bei allen untersuchten *Salmonella*-Mutanten keinen Unterschied verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 52 C). Die intrazelluläre Keimzahl nach 24 Stunden war bei der  $\Delta zur$ -Mutante signifikant gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 verringert (Abbildung 52 A, 40 % reduzierte intrazelluläre CFU, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

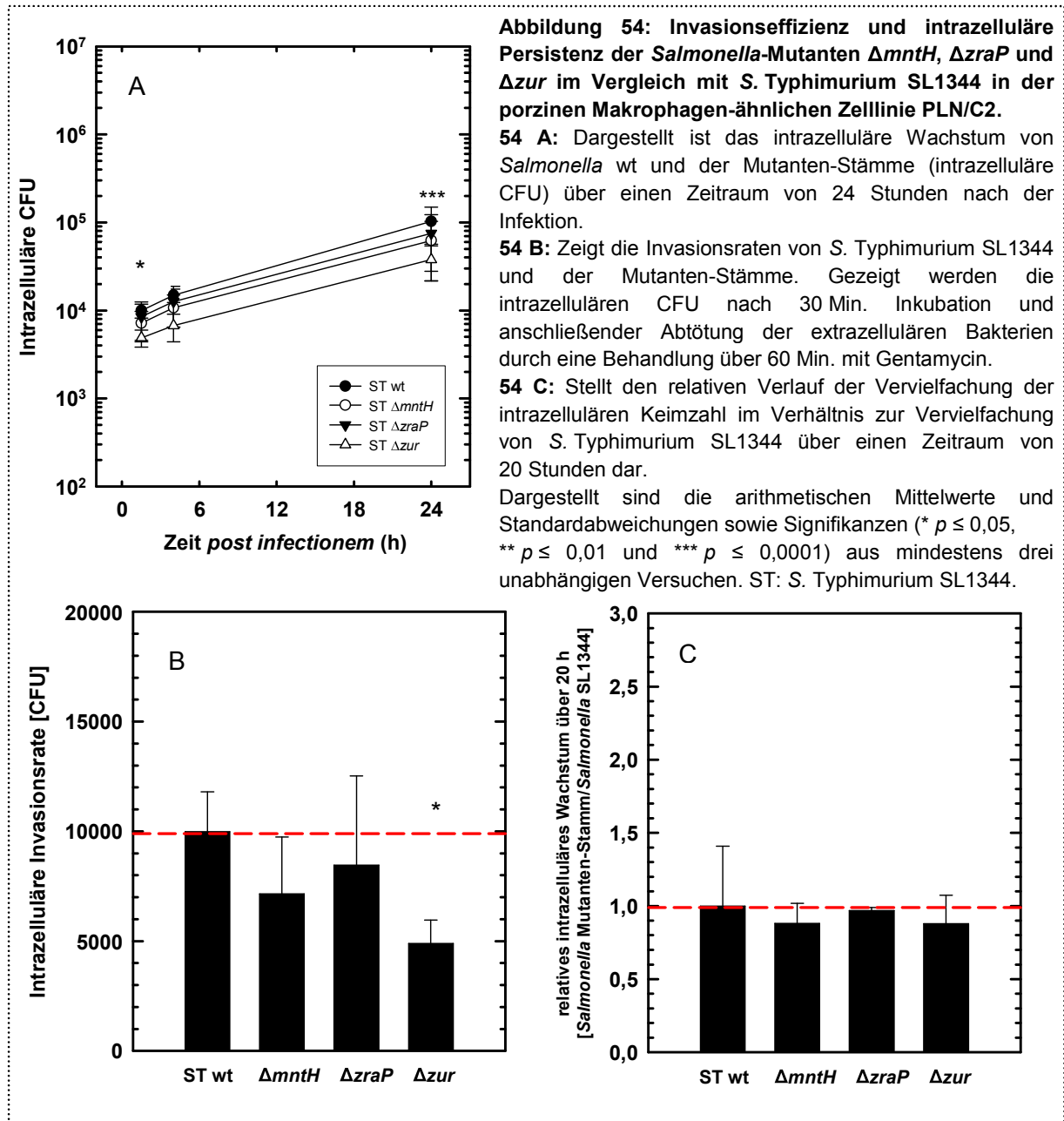


In den Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 waren die intrazellulären Invasionsraten verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 bei allen drei untersuchten Mutanten-Stämmen reduziert. Für die  $\Delta zur$ -Mutante konnte eine signifikant verringerte Invasionseffizienz (um

53 % reduzierte Invasivität, \*  $p = 0,043$ ) beobachtet werden (Abbildung 53 B). Das relative Wachstum über einen Zeitraum von 20 Stunden war bei allen Mutanten-Stämme wie in Abbildung 53 C dargestellt gegenüber dem Vergleichsstamm *S. Typhimurium* SL1344 erhöht. Allerdings konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Die intrazelluläre Keimzahl in 3D4/31 war für den  $\Delta zur$ -Mutanten-Stamm 1,5 Stunden nach der Infektion signifikant gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 reduziert (Abbildung 53 A, um 53 %, \*  $p = 0,043$ ). Zum späten Zeitpunkt (24-Stunden-Wert) konnte ebenfalls, ähnlich wie in den IPEC-J2, ein signifikant verringerter Wert für die intrazellulären CFU im Vergleich zu dem für den Vergleichsstamm ermittelten Wert detektiert werden (Abbildung 53 A, um 53 % reduzierte intrazelluläre CFU, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Daneben war die intrazelluläre Keimzahl für den  $\Delta zraP$ -Mutanten zum 24-Stunden-Zeitpunkt auch signifikant gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 reduziert (Abbildung 53 A, um 22 % reduzierte intrazelluläre CFU, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).



Die intrazelluläre Invasivität der drei untersuchten *Salmonella*-Mutanten nach 30 Min. Inkubation und anschließendem Abtöten durch Zugabe von Gentamycin für 60 Min. war in den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen (PLN/C2) gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 reduziert (Abbildung 54 B,  $\Delta mntH$ : 28 %,  $\Delta zraP$ : 15 %). Für den  $\Delta zur$ -Mutanten konnte, wie auch für die 3D4/31 Makrophagen, eine signifikant verringerte Invasionsrate im Vergleich zu *S. Typhimurium* SL1344 beobachtet werden (Abbildung 54 B, um 51 % reduzierte Invasivität, \*  $p = 0,037$ ). Das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden zeigte bei den drei untersuchten Mutanten-Stämmen keinen Unterschied verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 54 C). Für die intrazellulären CFU-Werte der  $\Delta zur$ -Mutante konnte nach 1,5 Stunden eine signifikant reduzierte Keimzahl gegenüber dem Wert von *S. Typhimurium* SL1344 ermittelt werden (Abbildung 54 A, 51 %, \*  $p = 0,037$ ). Zum letzten gemessenen Zeitpunkt (24-Stunden-Wert) waren die intrazellulären Keimzahlen, wie in Abbildung 54 A gezeigt, aller drei Mutanten-Stämme signifikant gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 verringert ( $\Delta mntH$ : um 40 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ;  $\Delta zraP$ : um 27 % reduziert, \*  $p = 0,02$ ;  $\Delta zur$ : um 63 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

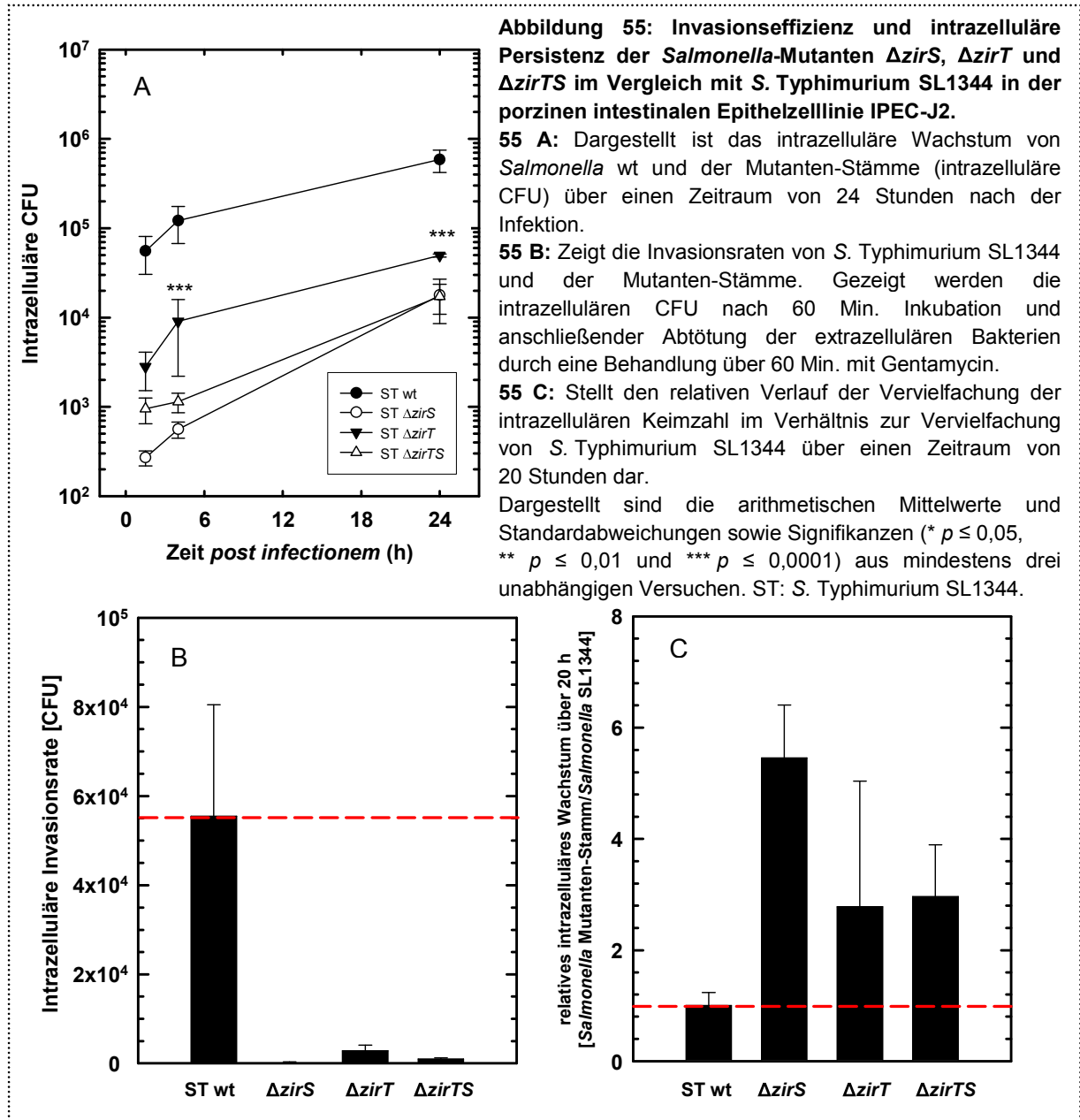


#### 4.7.3. Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten

Das ZirTS-Sekretionssystem von *Salmonella* besteht aus dem „zinc regulated transporter“, ZirT, einem Protein, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist und als Translokator für die weitere Komponente, den sezernierten Partner ZirS, dient. ZirTS spielt eine wichtige Rolle als Antivirulenz-System und ermöglicht so vermutlich eine gesteigerte Transmission auf einen neuen Wirt.

Die intrazelluläre Invasionsrate der drei Mutanten-Stämme  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  liegt in den IPEC-J2 deutlich unter der von *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 55 B;  $\Delta zirS$ : Reduktion um das 206-Fache,  $\Delta zirT$ : Reduktion um das 19,8-Fache,  $\Delta zirTS$ : Reduktion um das 58,4-Fache). Diese reduzierten Invasionseffizienzen sind allerdings nicht signifikant. Bezüglich des relativen Verlaufs der Vervielfachung der verschiedenen *Salmonella*-Stämme konnte beobachtet werden, dass alle drei Mutanten-Stämme ein stärkeres Wachstum in

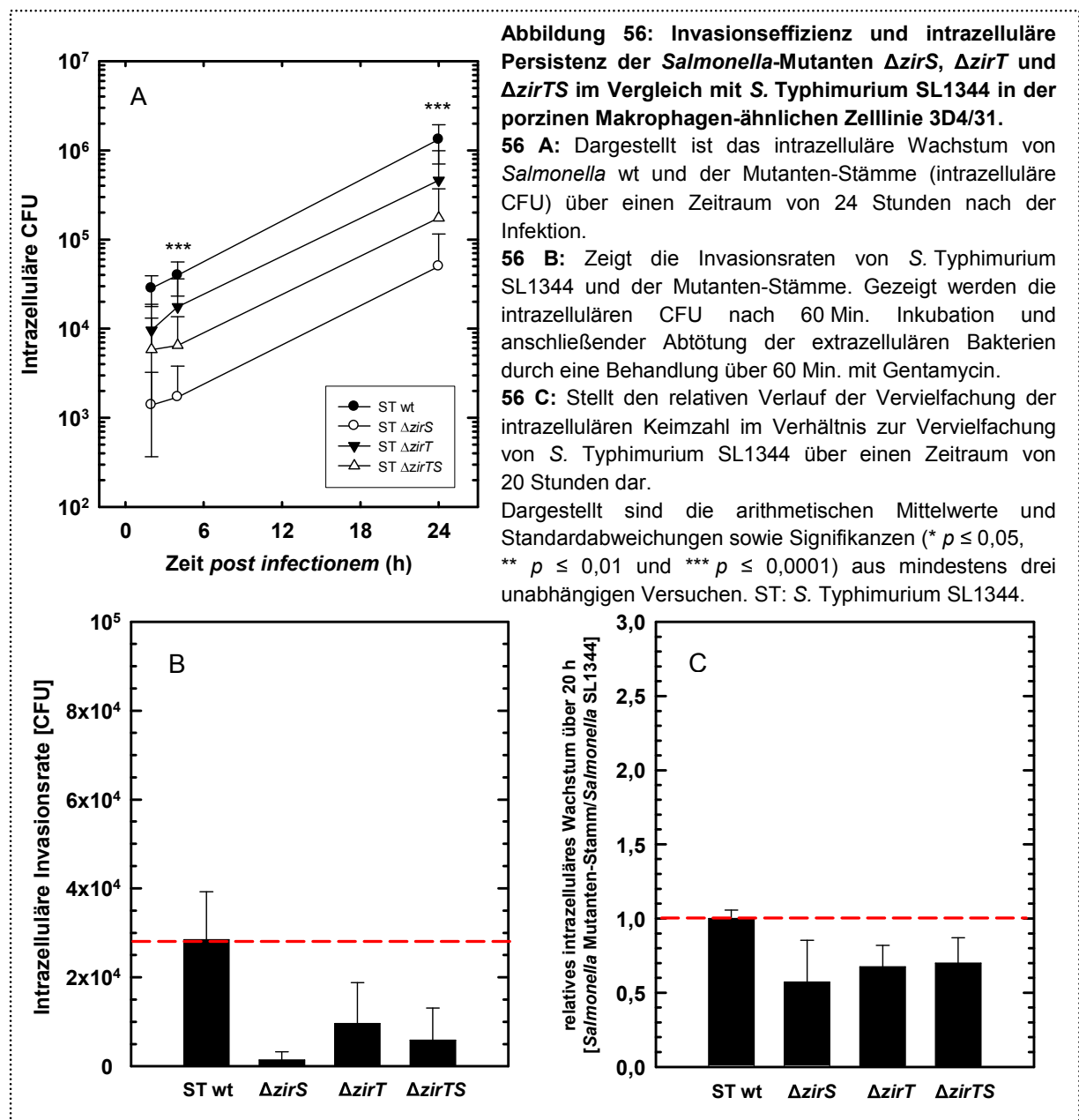
IPEC-J2 zeigen, als *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 55 C). Vor allem  $\Delta zirS$  scheint im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* SL1344 deutlich stärker zu wachsen. Die intrazelluläre Keimzahl von  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  war zum 2-Stunden-Zeitpunkt deutlich, wenn auch nicht signifikant, gegenüber den intrazellulären CFU von *S. Typhimurium* SL1344 reduziert (Abbildung 55 A). Signifikant reduzierte Werte für die intrazelluläre Keimzahl der drei *Salmonella*-Mutanten verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 konnten sowohl vier Stunden *p. i.* ( $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$ ,  $\Delta zirTS$ : \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) als auch 24 Stunden nach der Infektion ( $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$ ,  $\Delta zirTS$ : \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) detektiert werden (Abbildung 55 A).



Auch wenn für die intrazelluläre Invasionsraten in den 3D4/31 Makrophagen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 gezeigt werden konnten, so waren die Invasionseffizienzen der drei *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  ebenso wie in den IPEC-J2 deutlich gegenüber dem Wildtyp-Stamm verringert.



Abbildung 56 B zeigt, dass die intrazelluläre Invasionsrate von  $\Delta zirS$  im Vergleich zu *S. Typhimurium* SL1344 um ca. 95 % reduziert ist ( $p = 0,067$ ), die von  $\Delta zirT$  um ca. 66 % und die Invasivität von  $\Delta zirTS$  um ca. 80 %. Die relative intrazelluläre Persistenz der  $\Delta zirTS$ -Mutanten über 20 Stunden war tendenziell leicht gegenüber dem Wachstum von *S. Typhimurium* SL1344 verringert (Abbildung 56 C). Bezüglich der intrazellulären CFU konnte für den 4-Stunden-Wert eine signifikante Reduktion beim  $\Delta zirT$ -Mutanten gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 beobachtet werden (Abbildung 56 A, um 90 % reduziert,  $*** p \leq 0,0001$ ). Zum 24-Stunden-Wert waren die intrazellulären Keimzahlen aller Mutanten-Stämme signifikant kleiner als der Wert für *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 56 A). Die intrazellulären CFU von  $\Delta zirS$  waren um ca. 99 % gegenüber denen von *S. Typhimurium* SL1344 verringert ( $*** p \leq 0,0001$ ), bei  $\Delta zirT$  war die intrazelluläre Keimzahl um ca. 86 % reduziert ( $*** p \leq 0,0001$ ) und bei  $\Delta zirTS$  um ca. 83 % ( $*** p \leq 0,0001$ ).



#### 4.7.3.1. Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten bei Zinkinkubation

Für diese Versuche wurden die Zellen entweder 2 Stunden vor der Infektion mit *Salmonella* über einen Zeitraum von 2 Stunden mit 1 mM  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  behandelt oder die Behandlung mit 1 mM  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  erfolgte 2 Stunden nach der Infektion über 2 Stunden. Nach der zweistündigen Behandlung erfolgte jeweils ein Mediumwechsel und die Zellen erhielten frisches Medium ohne Zinkzusatz. Der Einfluss einer Zinkbehandlung vor bzw. nach der Infektion soll untersucht werden. Für diesen Versuch wurde *S. Typhimurium* SL1344 mit dem Doppelmutanten  $\Delta zirTS$  verglichen.

Bezüglich der Invasionsrate konnte in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen wie schon in 4.7.3 beschrieben ebenfalls eine deutlich reduzierte Invasivität für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten gefunden werden (vergleiche Abbildung 56 B und Abbildung 57 B). Bei einer Behandlung mit 1 mM  $ZnSO_4$  für 2 Stunden vor der Infektion mit *Salmonella* konnte eine um 54 % reduzierte Invasionsrate von  $\Delta zirTS$  gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 beobachtet werden. Erfolgte die Zink-Behandlung erst nach der Infektion war die Invasionseffizienz des  $\Delta zirTS$ -Mutanten signifikant reduziert im Vergleich zu den Werten von *S. Typhimurium* SL1344 (um 97 % reduziert, \*  $p = 0,028$ ). Bei einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  vor der *Salmonella*-Infektion war die Invasionsrate von *S. Typhimurium* SL1344 deutlich geringer, als wenn die Zink-Behandlung erst nach der Infektion erfolgte (Abbildung 57 B, Invasivität ist um ca. 45 % reduziert). Vergleicht man die Invasionsraten des  $\Delta zirTS$ -Mutanten, so war die Invasionseffizienz bei einer zweistündigen Pre-Inkubation mit Zinksulfat ebenfalls deutlich geringer, als bei einer nachfolgenden Behandlung (um ca. 65 % reduziert,  $p = 0,068$ ). Für das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden in den 3D4/31 Zellen konnten zwar sowohl beim Vergleich des Mutanten mit *S. Typhimurium* SL1344 als auch bei der Gegenüberstellung von *S. Typhimurium* SL1344 bzw.  $\Delta zirTS$  mit Zinkbehandlung vor oder nach der Infektion keine signifikanten Unterschiede für beide Zink-Behandlungen gefunden werden (Abbildung 57 C), allerdings war die relative Persistenz des  $\Delta zirTS$ -Mutanten innerhalb der Zellen bei beiden Zinkbehandlungen im Vergleich zu *S. Typhimurium* SL1344 deutlich verringert. Die intrazelluläre Keimzahl war zwei Stunden nach der Infektion bei Zinkbehandlung der Zellen nach der Infektion für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten signifikant niedriger (um 97 % reduziert, \*  $p = 0,028$ ) als die Keimzahl für *S. Typhimurium* SL1344. Werden die Zellen 2 Stunden vor der Infektion mit 1 mM  $ZnSO_4$  behandelt, so scheint es neben den geringeren Invasionsraten vier Stunden nach der Infektion zusätzlich einen Knick beim Wachstum zu geben. Von da an ist das Wachstum deutlich geringer bzw. bleibt fast ganz aus (Abbildung 57 A). Die intrazellulären CFU nach 24 Stunden waren bezüglich der zweistündigen Behandlung mit Zinksulfat vor der Infektion für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 signifikant reduziert (\*\*  $p = 0,01$ ). Daneben waren beim Vergleich der intrazellulären Keimzahlen bei einer Zinkbehandlung vor bzw. nach der

Infektion für *S. Typhimurium* SL1344 die intrazellulären CFU bei zweistündiger Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat signifikant gegenüber der Zinkbehandlung nach der Infektion reduziert (\*\* $p \leq 0,0001$ ). Bei einer der Infektion nachfolgenden Zinkbehandlung zeigte sich bei Gegenüberstellung von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$ -Mutant, dass die intrazelluläre Anzahl von Bakterien von  $\Delta zirTS$  zum 24-Stunden-Zeitpunkt signifikant niedriger war als die von *S. Typhimurium* SL1344 (Abbildung 57 A, \*\* $p \leq 0,0001$ ). Für das relative intrazelluläre Wachstum über zwei (4-h-Wert/2-h-Wert) bzw. 20 Stunden (24-h-Wert/4-h-Wert) in 3D4/31 Zellen konnten große Unterschiede beim Vergleich der zwei verschiedenen Varianten der Zink-Behandlung gefunden werden (Abbildung 57 D). Das Wachstum über zwei Stunden (Wachstum zwischen dem 2-h- und 4-h-Wert) scheint ebenso wie die intrazelluläre Vervielfachung über 20 Stunden beim  $\Delta zirTS$ -Mutanten verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 bei beiden Zink-Behandlungen (2 h vor der Infektion und 2 h nach der Infektion) geringer zu sein. Eine Behandlung der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  über zwei Stunden vor der Infektion führte zu einer gegenüber der Zink-Inkubation nach der Infektion geringfügig erhöhten relativen Wachstumsrate über zwei Stunden. Betrachtet man das intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden, so kann beobachtet werden, dass das Wachstum bei einer zweistündigen Pre-Inkubation der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  gegenüber dem Wachstum über zwei Stunden für beide untersuchten Bakterienstämme abnimmt. Erfolgte die Behandlung mit Zinksulfat allerdings zwei Stunden nach der Infektion, so war das intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden (Wachstum zwischen dem 4-h- und 24-h-Wert) deutlich gegenüber der intrazellulären Vervielfachung über zwei Stunden erhöht. Für das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden konnte beim Vergleich der beiden Zink-Behandlungen eine signifikant erhöhte Wachstumsrate für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten gefunden werden, welcher auf Zellen wuchs, die zwei Stunden pre-inkubiert wurden, im Gegensatz zu einer Behandlung zwei Stunden nach der *Salmonella*-Infektion (Abbildung 57 C, um das 12-Fache erhöht, \*  $p = 0,023$ ). Eine Zink-Inkubation vor der Infektion mit *Salmonella* führte fast gänzlich zum Erliegen des Wachstums von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  (Abbildung 57 A und Abbildung 57 D).

**Abbildung 57: Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz des *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirTS$  im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 bei Zinkbehandlung in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31.**

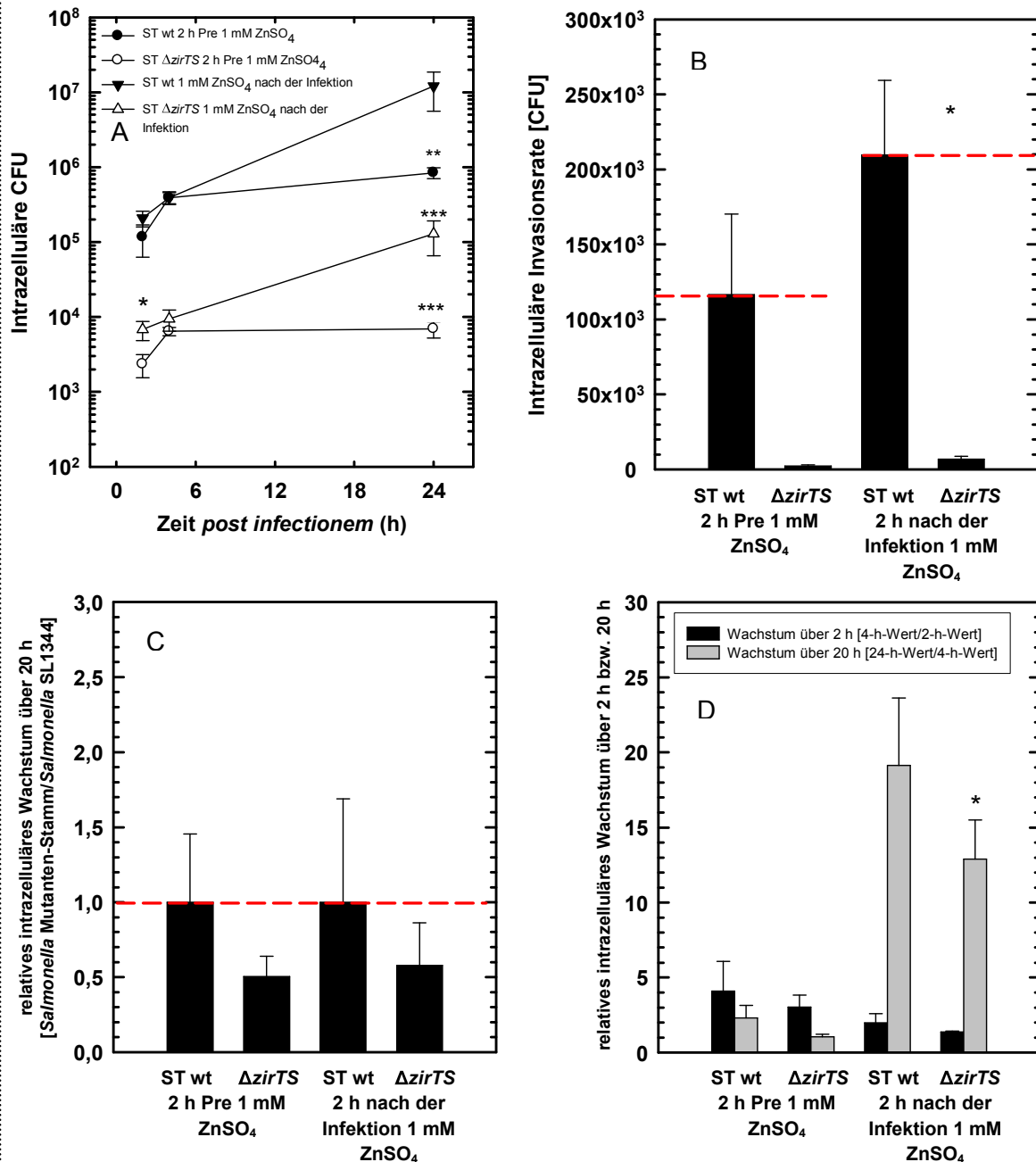
**57 A:** Dargestellt ist das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* wt und des  $\Delta zirTS$ -Mutanten (intrazelluläre CFU) über einen Zeitraum von 24 Stunden nach der Infektion.

**57 B:** Zeigt die Invasionsraten von *S. Typhimurium* SL1344 und des Mutanten. Gezeigt werden die intrazellulären CFU nach 60 Min. Inkubation und anschließender Abtötung der extrazellulären Bakterien durch eine Behandlung über 60 Min. mit Gentamycin.

**57 C:** Stellt den relativen Verlauf der Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl im Vergleich zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von zwei bzw. 20 Stunden dar.

**57 D:** Relativer Verlauf des intrazellulären Wachstums von  $\Delta zirTS$  im Vergleich zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von zwei bzw. 20 Stunden.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Signifikanzen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344.



Die Invasionseffizienzen von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  in den Makrophagen-ähnlichen Zellen PLN/C2 zeigten ein ähnliches Muster, wie es in 3D4/31 beobachtet wurde

(Ergebnisse nicht gezeigt). Für  $\Delta zirTS$  lagen die Invasionsraten unabhängig von der Zinkbehandlung deutlich unter denen von *S. Typhimurium* SL1344. Bei einer zweistündigen Pre-Inkubation der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  vor der Infektion war die Invasionseffizienz des  $\Delta zirTS$ -Mutanten signifikant gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 reduziert (um ca. 98 % reduziert,  $*** p \leq 0,0001$ ; Ergebnisse nicht gezeigt). Beim Vergleich der zwei unterschiedlichen Zinkbehandlungen konnte ein ähnliches Ergebnis wie in den 3D4/31 Zellen detektiert werden. Erfolgte die Behandlung mit Zinksulfat erst zwei Stunden nach der Infektion, so war die Invasionsrate deutlich für *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  gegenüber einer Vorbehandlung mit  $ZnSO_4$  erhöht. Die intrazellulären Vervielfachungen von  $\Delta zirTS$  gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 waren für beide Zink-Behandlungen in PLN/C2 Makrophagen erhöht. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich vom Muster, welches in 3D4/31 Makrophagen gefunden wurde. In den 3D4/31 Zellen wurden im Gegensatz zu den PLN/C2 Makrophagen reduzierte Wachstumsraten für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten bezüglich der zwei unterschiedlichen Zinksulfat-Behandlungen beobachtet (Abbildung 57 C). Das intrazelluläre Wachstum über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigte, ähnlich wie bei den 3D4/31, bei einer Zinksulfat-Behandlung vor der *Salmonella*-Infektion vier Stunden nach der Infektion einen Knick, ab dem das Wachstum deutlich geringer war bzw. fast gänzlich eingestellt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine zweistündige Behandlung mit Zinksulfat vor der Infektion führte in den Makrophagen-ähnlichen Zelllinien 3D4/31 und PLN/C2 zu einer deutlich verringerten Wachstumsrate ab dem 4-Stunden-Wert (Abbildung 57 A, PLN/C2: Ergebnisse nicht gezeigt). Erfolgte die Behandlung mit 1 mM  $ZnSO_4$  im Vergleich dazu erst nach der Infektion, so war die relative intrazelluläre Wachstumsrate gegenüber einer Vorbehandlung deutlich erhöht (Abbildung 57 D). Wird die intrazelluläre Vervielfachung bei Nachbehandlung der Zellen mit Zinksulfat mit der Wachstumsrate ohne Zinkzusatz verglichen, so kann gezeigt werden, dass die intrazellulären Wachstumsraten ähnlich sind (Beispiel 3D4/31, Tabelle 18).

**Tabelle 18: Relative intrazelluläre Wachstumsrate (Vervielfachung) von  $\Delta zirTS$  und *S. Typhimurium* SL1344 über 20 Stunden ohne Zinkbehandlung bzw. mit Zinkbehandlung vor und nach der Infektion (1 mM  $ZnSO_4$ ) in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen.**

Bakterienstamm	Behandlung	Relative intrazelluläre Wachstumsrate über 20 h [24-h-/4-h-Wert]
$\Delta zirTS$	vor der Infektion	5,9
	nach der Infektion	12,9
	ohne Zinkbehandlung	10,6
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	vor der Infektion	2,4
	nach der Infektion	19,1
	ohne Zinkbehandlung	21,8

In weiteren Versuchen wurde die Invasionseffizienz und das intrazelluläre Wachstum von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  bei einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  zwei Stunden vor der Infektion mit einer zweistündigen Zinksulfat-Behandlung direkt vor und während der Infektion verglichen. Abbildung 58 zeigt die Ergebnisse für die Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen. Die intrazelluläre Invasionsrate war bei einer Behandlung direkt vor und während der Infektion gegenüber der zweistündigen Behandlung vor der Infektion für beide untersuchten *Salmonella*-Stämme geringfügig reduziert (Abbildung 58 B). Die Invasionseffizienz von  $\Delta zirTS$  lag, wie bei den anderen Versuchen schon beobachtet, deutlich unter der von *S. Typhimurium* SL1344. Dabei war die Invasionseffizienz von  $\Delta zirTS$  bei einer Zinkbehandlung direkt vor und während der Infektion signifikant im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 verringert (Abbildung 58 B, um ca. 99 % reduziert, \*  $p = 0,031$ ). Das relative intrazelluläre Wachstum, dargestellt in Abbildung 58 C, war bei beiden Zinkbehandlungen für  $\Delta zirTS$  gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 tendenziell erhöht. Allerdings schwankten die Werte, sodass keine Signifikanzen ermittelt werden konnten. Betrachtet man die intrazelluläre Vervielfachung über zwei bzw. 20 Stunden, so wird deutlich, dass die Werte für die Behandlung mit Zinksulfat direkt vor und während der Infektion tendenziell reduziert gegenüber denen für die zweistündige Vorbehandlung sind (Abbildung 58 D). Das Wachstum über 20 Stunden war für  $\Delta zirTS$  verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 tendenziell erhöht. Daneben war die intrazelluläre Persistenz über 20 Stunden bei einer zweistündigen Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat vor der *Salmonella*-Infektion gegenüber der Behandlung direkt vor und während der Infektion tendenziell stark erniedrigt. Signifikanzen konnten allerdings nicht ermittelt werden. Vergleicht man das Wachstum der beiden *Salmonella*-Stämme über 20 Stunden ohne bzw. mit den Zinkbehandlungen vor und direkt vor/während der Infektion, so zeigt sich, dass die intrazelluläre Wachstumsrate ohne Zinkbehandlung der Zellen bei  $\Delta zirTS$  verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 geringfügig reduziert ist (Tabelle 19). Erfolgte eine Zinkbehandlung der 3D4/31 Makrophagen zwei Stunden vor der Infektion, so war die intrazelluläre Persistenz für beide untersuchten *Salmonella*-Stämme deutlich gegenüber keiner Behandlung mit Zinksulfat verringert ( $\Delta zirTS$ : um das 4,5-Fache, *S. Typhimurium* SL1344: um das 14-Fache). Hier scheint das Wachstum von *S. Typhimurium* SL1344 mehr von der Zinkbehandlung beeinflusst zu werden, als die Wachstumsrate von  $\Delta zirTS$ . Dementsprechend war die Vervielfachung von  $\Delta zirTS$  bei zweistündiger Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat gegenüber dem Wachstum von *S. Typhimurium* SL1344 erhöht (Tabelle 19). Betrachtet man nun die Zinksulfat-Behandlung direkt vor und während der Infektion mit *Salmonella*, so kann für beide Stämme im Vergleich zur Messung ohne Zinkbehandlung eine erhöhte Wachstumsrate detektiert werden. Diese war für *S. Typhimurium* SL1344 um ca. 98 %, für den Mutanten-Stamm  $\Delta zirTS$  um ca. 824 % erhöht. Es wird deutlich, dass die Zinkbehandlung der 3D4/31 Makrophagen direkt vor und während der Infektion sich stärker

auf  $\Delta zirTS$  auswirkt als auf den Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* SL1344. Die relative intrazelluläre Persistenz von  $\Delta zirTS$  war hier gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 um das 2,3-Fache erhöht (Tabelle 19).

**Tabelle 19: Relative intrazelluläre Wachstumsrate (Vervielfachung) von  $\Delta zirTS$  und *S. Typhimurium* SL1344 über 20 Stunden ohne und mit Zinkbehandlung (1 mM ZnSO<sub>4</sub>) vor und direkt vor/während der *Salmonella*-Infektion in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen.**

Bakterienstamm	Behandlung	Relative intrazelluläre Wachstumsrate über 20 h [24-h-/4-h-Wert]
$\Delta zirTS$	vor der Infektion	5,9
	direkt vor und während der Infektion	97,9
	ohne Zinkbehandlung	10,6
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	vor der Infektion	2,4
	direkt vor und während der Infektion	43,1
	ohne Zinkbehandlung	21,8

Die intrazelluläre Keimzahl war zwei Stunden nach der Infektion bei beiden Zinkbehandlungen für den Mutanten-Stamm  $\Delta zirTS$  gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 deutlich verringert. Bezüglich der Zinkbehandlung direkt vor und während der Infektion war diese Reduktion signifikant (Abbildung 58 A, \*  $p = 0,031$ ). Nach vier Stunden *p. i.* waren die Werte für die intrazelluläre Keimzahl von  $\Delta zirTS$  weiterhin gegenüber denen von *S. Typhimurium* SL1344 reduziert. Auch hier ist die Reduktion bezüglich der Zinksulfat-Behandlung direkt vor und während der Infektion signifikant (Abbildung 58 A, \*  $p = 0,027$ ). Dabei lagen die Werte für die intrazellulären CFU zum 2- und 4-Stunden-Zeitpunkt bei einer Behandlung direkt vor und während der Infektion für den Wildtyp-Stamm geringfügig, für  $\Delta zirTS$  schon deutlicher unter den Werten, die bei einer Vorbehandlung der Zellen detektiert wurden. Bei der 2-stündigen Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat kam es, wie schon erwähnt, vier Stunden nach der Infektion zu einem Einknicken des Wachstums. Im Gegensatz dazu scheint die intrazelluläre Keimzahl bei beiden *Salmonella*-Stämmen bei einer Behandlung direkt vor und während der Infektion nach einer schwächeren Invasion stetig zu steigen und am 24-Stunden-Zeitpunkt konnten gegenüber der Zinkbehandlung vor der Infektion erhöhte Werte beobachtet werden (Abbildung 58 A).

**Abbildung 58: Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz des *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirTS$  im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 bei Zinkbehandlung zwei Stunden vor bzw. direkt vor und während der Infektion in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31.**

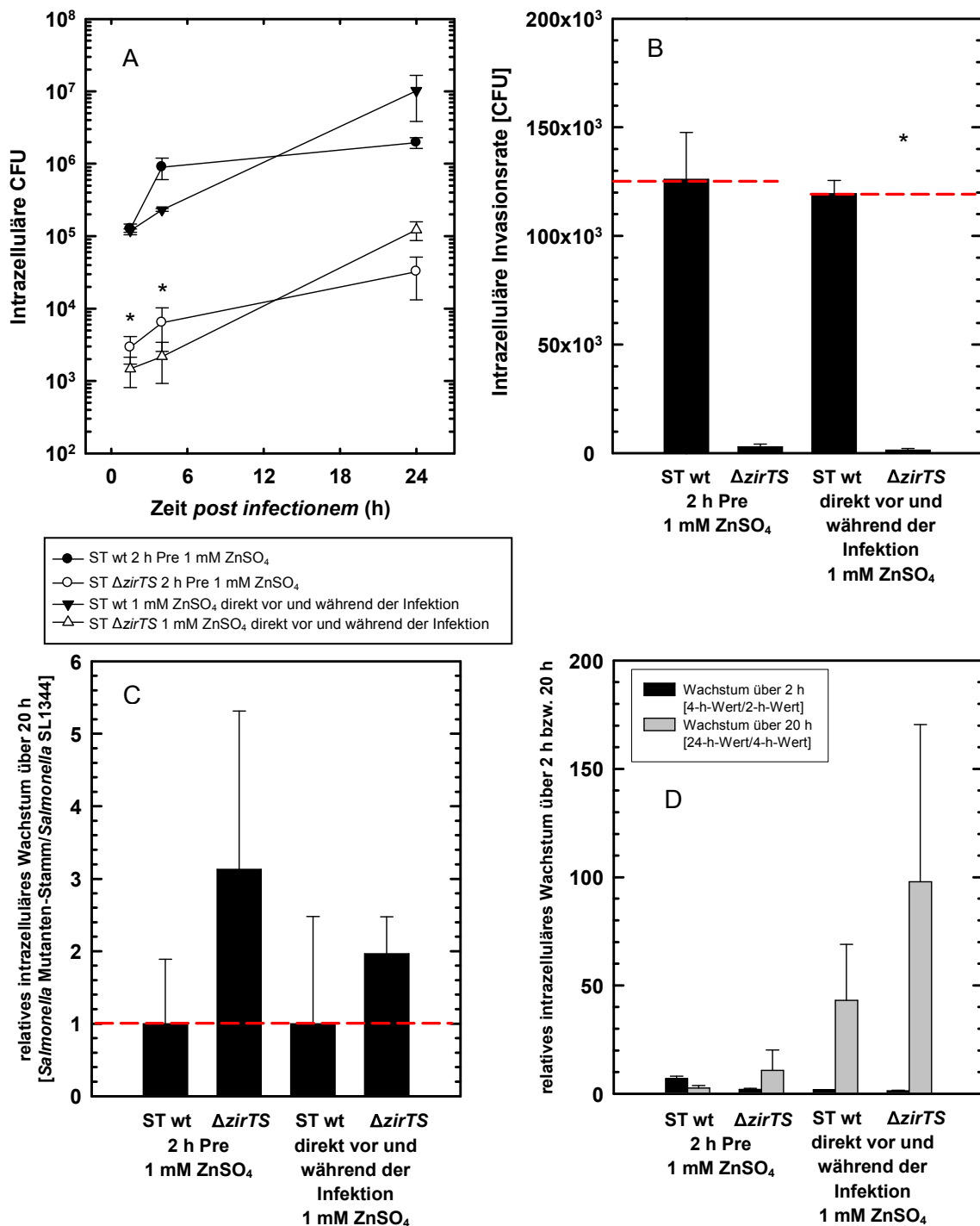
**58 A:** Dargestellt ist das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* wt und des  $\Delta zirTS$ -Mutanten (intrazelluläre CFU) über einen Zeitraum von 24 Stunden nach der Infektion.

**58 B:** Zeigt die Invasionsraten von *S. Typhimurium* SL1344 und des Mutanten. Gezeigt werden die intrazellulären CFU nach 60 Min. Inkubation und anschließender Abtötung der extrazellulären Bakterien durch eine Behandlung über 60 Min. mit Gentamycin.

**58 C:** Stellt den relativen Verlauf der Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl im Vergleich zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von zwei bzw. 20 Stunden dar.

**58 D:** Relativer Verlauf des intrazellulären Wachstums von  $\Delta zirTS$  im Vergleich zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von zwei bzw. 20 Stunden.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Signifikanzen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344.



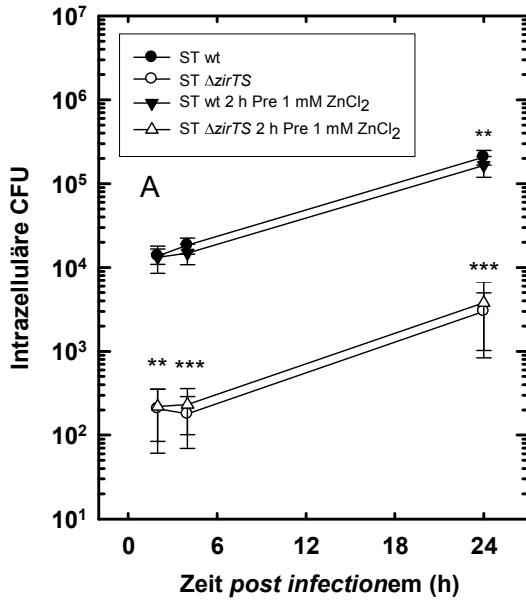


Für die PLN/C2 Makrophagen zeigte sich bezüglich der intrazellulären Invasionsrate ein ähnliches Bild wie bei den 3D4/31 Zellen. Eine Behandlung mit 1 mM ZnSO<sub>4</sub> direkt vor und während der Infektion führte gegenüber der Behandlung vor der Infektion tendenziell zu einer verringerten Invasionseffizienz von beiden untersuchten *Salmonella*-Stämmen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Wachstumsrate von  $\Delta zirTS$  war bei einer Behandlung der PLN/C2 Zellen direkt vor und während der Infektion nicht wie bei den 3D4/31 Zellen gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 erhöht, sondern erniedrigt. Allerdings konnten keine Signifikanzen bezüglich der intrazellulären Vervielfachung über 20 Stunden ermittelt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Muster für die Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl ähnelt in den PLN/C2 Zellen dem Muster, welches in den 3D4/31 Makrophagen beobachtet wurde (vergleiche Abbildung 58 A). Allerdings wird im Vergleich zu dem in 3D4/31 Zellen beobachteten geringen Unterschied bei der Invasionsrate von  $\Delta zirTS$  und *S. Typhimurium* SL1344 abhängig von der Zinkbehandlung in den PLN/C2 eine deutlich verringerte Invasionseffizienz nach Behandlung der Zellen direkt vor und während der Infektion detektiert. Aufgrund dieses größeren Unterschiedes liegen die Werte für die intrazellulären CFU zum 24-Stunden-Zeitpunkt auch nur geringfügig über dem Wert, der in den Zellen nach Vorbehandlung mit Zinksulfat gemessen wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Die intrazelluläre Keimzahl von  $\Delta zirTS$  war gegenüber der *S. Typhimurium* SL1344 zu allen drei gemessenen Zeitpunkten geringer (24-Stunden-Wert, Zinkbehandlung direkt vor und während der Infektion: signifikante Reduktion um ca. 93 %, \*  $p = 0,023$ ).

#### **4.7.3.2. Untersuchung der $\Delta zirTS$ -Mutanten bei Zinkinkubation sowie parallele Messung der durch die Infektion ausgelösten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B**

Neben der Untersuchung der Invasionseffizienzen und der intrazellulären Persistenz von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  wurde für diese Versuche auch die Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsregulators NF- $\kappa$ B betrachtet. Dazu wurden Luziferase-Reporterzelllinien (siehe 3.2.5) verwendet. Die Luziferase-Aktivität zeigt dabei stellvertretend die durch *Salmonella* ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B an. Ziel war es, zu untersuchen, ob die zuvor beobachteten verringerten Invasionsraten von  $\Delta zirTS$  und damit verbunden auch die reduzierten intrazellulären Keimzahlen ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors haben. Ferner sollten die Einflüsse einer zweistündigen Vorbehandlung der Zellen mit Zinkchlorid (1 mM ZnCl<sub>2</sub>) aufgeklärt werden. In Abbildung 59 und Abbildung 60 sind die Invasionsraten sowie das intrazelluläre Wachstum von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$  für die porcine intestinale Epithelzelllinie IPEC-J2 bzw. die Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 dargestellt. Für beide Zelllinien konnte eine deutlich verringerte Invasionseffizienz von  $\Delta zirTS$  gegenüber *S. Typhimurium* SL1344 detektiert werden, unabhängig davon, ob eine Behandlung mit Zinkchlorid stattgefunden hat oder nicht

(Abbildung 59 B und Abbildung 60 B). In den IPEC-J2 Zellen war diese reduzierte Invasion signifikant (Abbildung 59 B;  $\Delta zirTS$  ohne Zinkinkubation: 66-fache Reduktion, \*\*  $p = 0,004$ ;  $\Delta zirTS$  mit Zinkinkubation: 60-fache Reduktion, \*  $p = 0,017$ ). Das relative intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden war in beiden untersuchten Zelllinien für  $\Delta zirTS$  im Vergleich zu *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Zinkinkubation der Zellen gesteigert (Abbildung 59 C und Abbildung 60 C). Dieser erhöhte Wert für die Wachstumsrate von  $\Delta zirTS$  war in den IPEC-J2 Zellen ohne Vorbehandlung der Zellen mit Zinkchlorid signifikant (Abbildung 59 C, 1,8-fach gesteigerte Wachstumsrate, \*\*  $p = 0,001$ ). Betrachtet man den Verlauf der intrazellulären Keimzahl über 24 Stunden, so kann gezeigt werden, dass in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) die intrazellulären CFU von  $\Delta zirTS$  unabhängig davon, ob die Zellen mit Zinkchlorid vorbehandelt wurden oder nicht, zu allen gemessenen Zeitpunkten (2, 4 und 24 Stunden *p. i.*) signifikant gegenüber den Werten für *S. Typhimurium* SL1344 reduziert waren (Abbildung 59 A, 2 Stunden ohne  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*\*  $p = 0,004$ ; 2 Stunden mit  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*  $p = 0,017$ ; 4 Stunden ohne  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 4 Stunden mit  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*\*  $p = 0,009$ ; 24 Stunden ohne  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*\*  $p = 0,003$ ; 24 Stunden mit  $ZnCl_2$ -Behandlung: \*\*  $p = 0,009$ ). Daneben war zum 24-Stunden-Zeitpunkt der Wert für die intrazellulären CFU von *S. Typhimurium* SL1344 bei Vorbehandlung der Zellen mit Zinkchlorid gegenüber dem Wert bei keiner Zinkbehandlung signifikant reduziert (Abbildung 59 A, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Bei den 3D4/31 Makrophagen war nur zum 24-Stunden-Zeitpunkt mit und ohne Behandlung der Zellen mit  $ZnCl_2$  die intrazelluläre Keimzahl von  $\Delta zirTS$  verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 signifikant reduziert (Abbildung 60 A, ohne  $ZnCl_2$ : 1,7-fache Reduktion, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; mit  $ZnCl_2$ : 1,8-fache Reduktion, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).



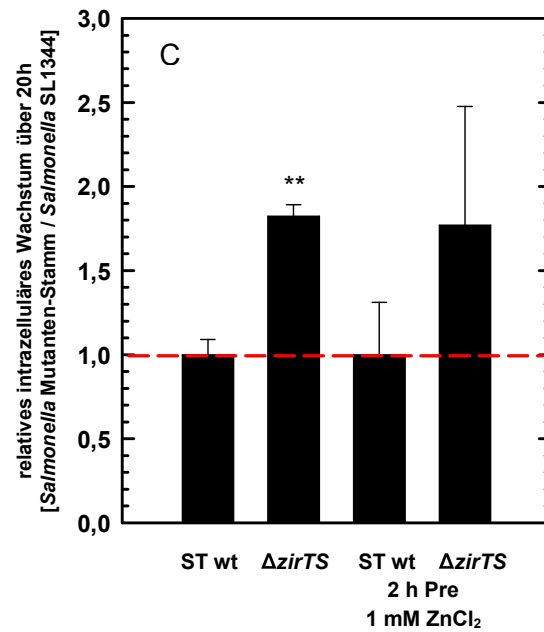
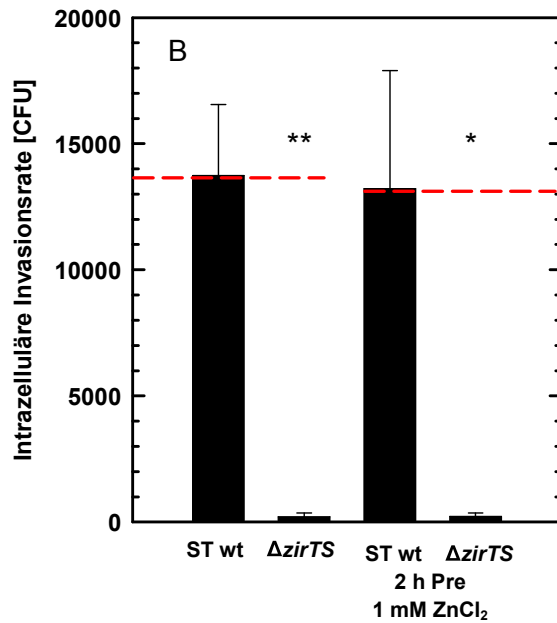
**Abbildung 59: Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirTS$  im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2.**

**59 A:** Dargestellt ist das intrazelluläre Wachstum von *Salmonella* wt und  $\Delta zirTS$  (intrazelluläre CFU) über einen Zeitraum von 24 Stunden nach der Infektion.

**59 B:** Zeigt die Invasionsraten von *S. Typhimurium* SL1344 und  $\Delta zirTS$ . Gezeigt werden die intrazellulären CFU nach 60 Min. Inkubation und anschließender Abtötung der extrazellulären Bakterien durch eine Behandlung über 60 Min. mit Gentamycin.

**59 C:** Stellt den relativen Verlauf der Vervielfachung der intrazellulären Keimzahl im Verhältnis zur Vervielfachung von *S. Typhimurium* SL1344 über einen Zeitraum von 20 Stunden dar.

Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Signifikanzen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. ST: *S. Typhimurium* SL1344.



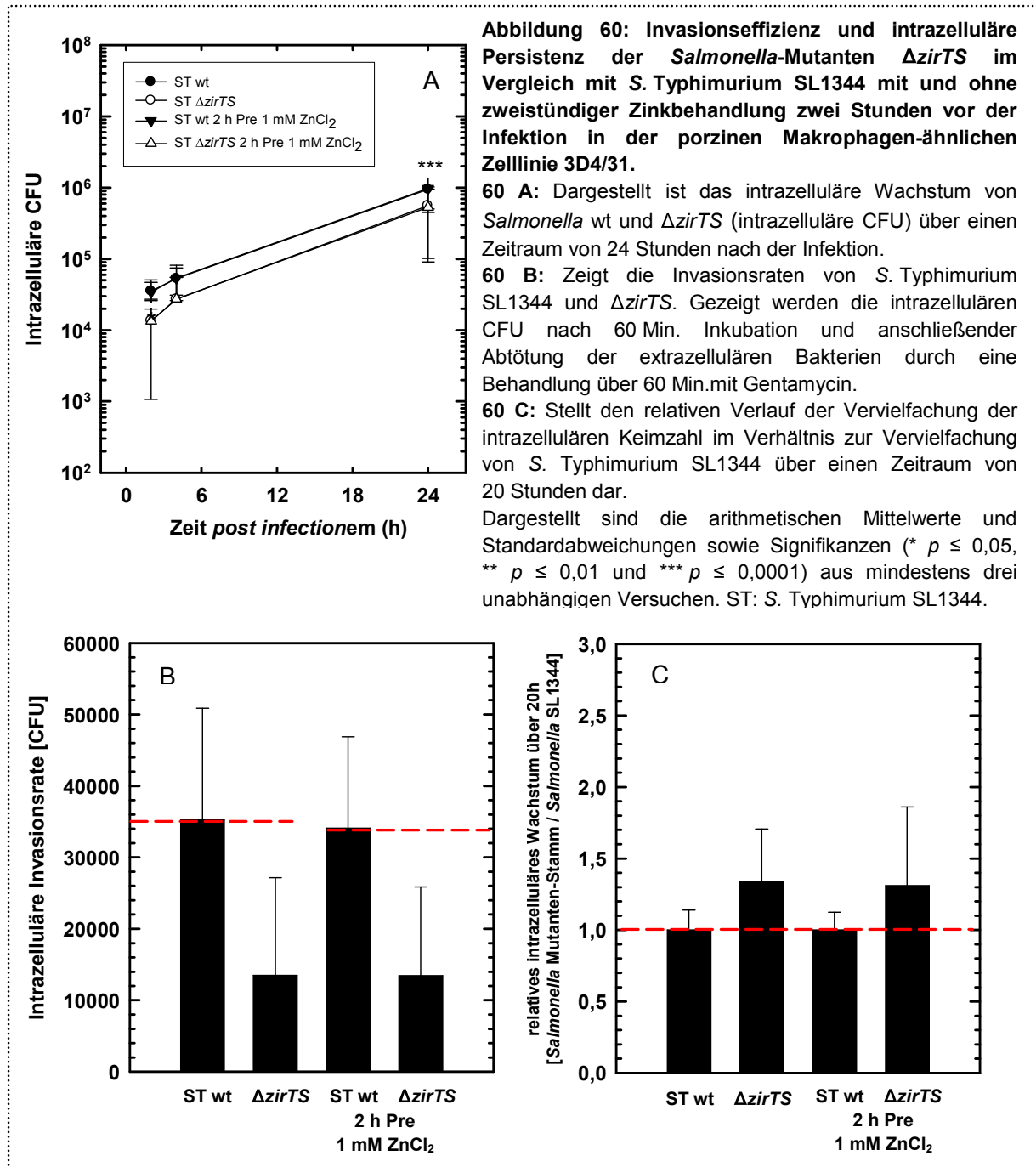


Abbildung 61 und Abbildung 62 stellen die Luziferase-Aktivität stellvertretend für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Antwort auf die Infektion mit  $\Delta zirTS$  bzw. *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne Zinkchlorid-Vorbehandlung der Zellen dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 vier Stunden *post infectionem* ihren Höhepunkt erreicht, bei den 3D4/31 Makrophagen wird dieser erst nach 24 Stunden detektiert (vergleiche Abbildung 61 A und Abbildung 62 A). Trotz der deutlich reduzierten Invasionseffizienzen und intrazellulären Keimzahlen von  $\Delta zirTS$  verglichen mit *S. Typhimurium* SL1344 konnte für den Mutanten-Stamm bezüglich der Luziferase-Aktivität zum 2-Stunden-Zeitpunkt sowohl in den IPEC-J2 als auch in den 3D4/31 Zellen unabhängig davon, ob eine Zinkbehandlung erfolgte oder nicht, kein signifikanter Unterschied festgestellt

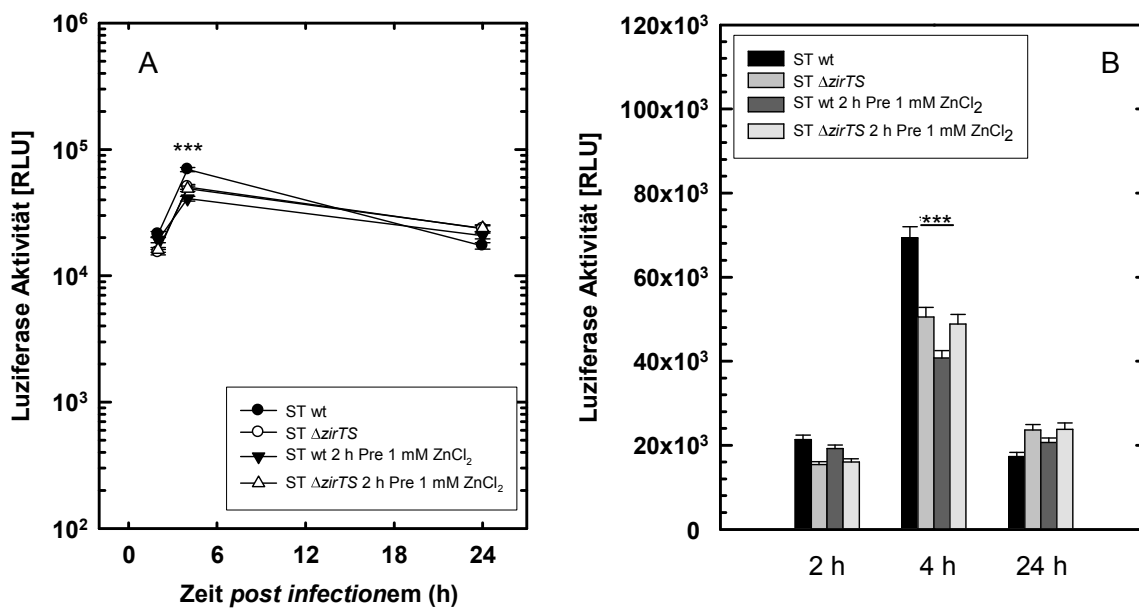
werden (vergleiche Abbildung 59 A und B, Abbildung 61; Abbildung 60 A und B, Abbildung 62). Für den 4-Stunden-Messwert konnte in den IPEC-J2 Zellen ein signifikant reduzierter Wert für die durch  $\Delta zirTS$  ausgelöste Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den Zellen ohne Zinkbehandlung gemessen werden (Abbildung 61 B, um ca. 27 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Daneben war die Luziferase-Aktivität, die durch *S. Typhimurium* SL1344 stimuliert wird bei einer Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM  $ZnCl_2$  signifikant gegenüber dem Wert in unbehandelten Zellen reduziert (Abbildung 61 B, um ca. 51 % reduziert, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Diese signifikanten Unterschiede zeigten sich ebenfalls in den intrazellulären CFU (vergleiche Abbildung 59 A). Zum 24-Stunden-Zeitpunkt war wiederum kein signifikanter Unterschied für die Luziferase-Aktivität zu beobachten.

**Abbildung 61: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 als Reaktion auf eine Behandlung mit dem *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirTS$  im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion.** Stellvertretend für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist die Luziferase-Aktivität dargestellt.

**61 A:** Zeigt den Verlauf der Luziferase-Aktivität.

**61 B:** Stellt die Einzelwerte zu den angegebenen Zeitpunkten dar.

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis und die dazugehörigen Standardabweichungen sowie Signifikanzen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). ST: *S. Typhimurium* SL1344; RLU: *relative luciferase units*.



Bei den 3D4/31 Makrophagen konnte für den 4-Stunden-Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied bezüglich der Aktivierung von NF- $\kappa$ B festgestellt werden (Abbildung 62). Allerdings war beim letzten Zeitpunkt (24-Stunden-Wert) die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Zellen ohne Zinkbehandlung nach Infektion mit  $\Delta zirTS$  gegenüber der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 signifikant verringert (Abbildung 62 B, um ca. 18,4 % reduziert, \*\*  $p = 0,006$ ). Eine signifikant verringerte intrazelluläre Keimzahl konnte für diesen Versuch, wie schon beschrieben und in Abbildung 60 dargestellt, ebenfalls beobachtet werden. Signifikanzen in

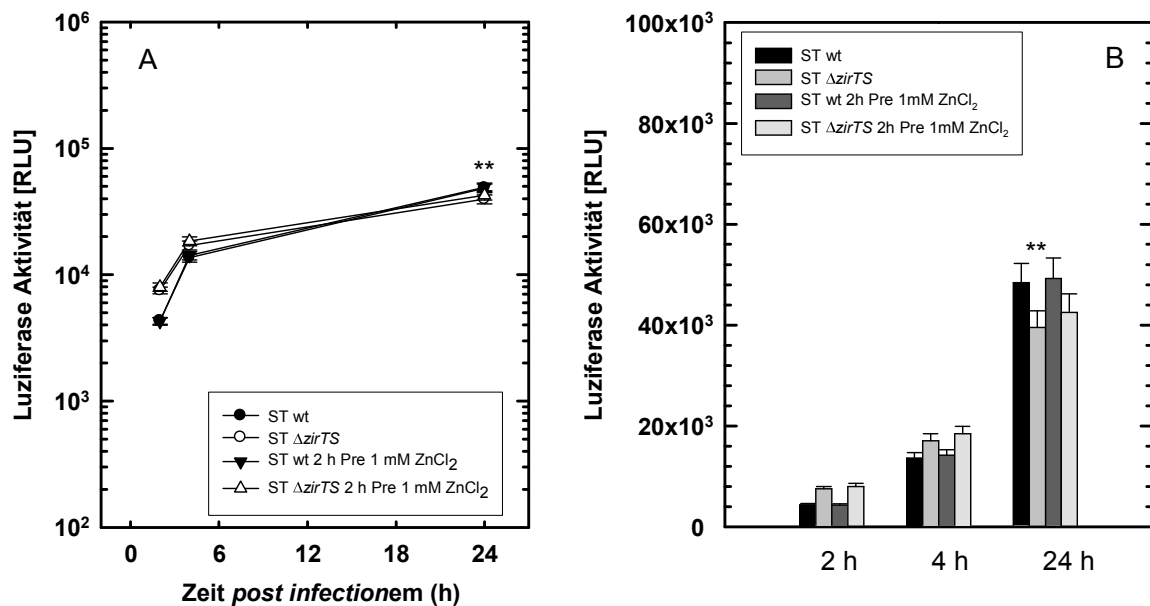
Bezug auf eine Vorbehandlung der Zellen mit Zinkchlorid im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnten nicht detektiert werden. Insgesamt scheint es so zu sein, dass signifikant reduzierte Invasionsraten und Werte für die intrazelluläre Keimzahl von  $\Delta zirTS$  gegenüber dem Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* SL1344 sich nicht unbedingt auch als signifikant verringerte Werte für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B darstellen. Beispielsweise konnte für die IPEC-J2 Zellen zu allen gemessenen Zeitpunkten eine signifikant verringerte intrazelluläre Keimzahl für  $\Delta zirTS$  im Vergleich mit *S. Typhimurium* SL1344 detektiert werden, die Luziferase-Aktivität war allerdings nur zum 4-Stunden-Zeitpunkt ebenfalls signifikant reduziert (siehe Abbildung 61 B und Abbildung 59 A).

**Abbildung 62: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31 als Reaktion auf eine Behandlung mit dem *Salmonella*-Mutanten  $\Delta zirTS$  im Vergleich zum Wildtyp-Stamm *S. Typhimurium* SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion.** Stellvertretend für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist die Luziferase-Aktivität dargestellt.

**62 A:** Zeigt den Verlauf der Luziferase-Aktivität.

**62 B:** Stellt die Einzelwerte zu den angegebenen Zeitpunkten dar.

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis und die dazugehörigen Standardabweichungen sowie Signifikanzen (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). ST: *S. Typhimurium* SL1344; RLU: *relative luciferase units*.

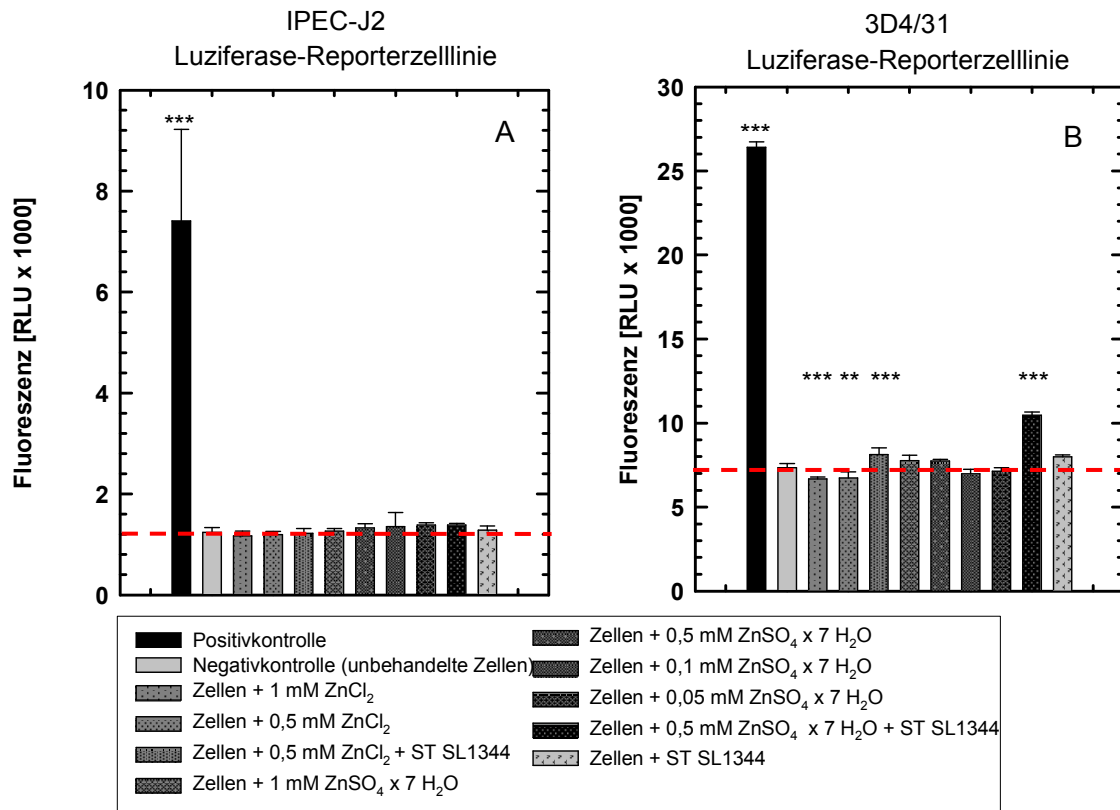


#### 4.8. Untersuchung der möglichen zytotoxischen Effekte von Zinksulfat bzw. Zinkchlorid

Um zu überprüfen, ob die Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit Zinksulfat bzw. Zinkchlorid unterschiedlicher Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Zellen hat, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Dazu wurde der CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega) verwendet. Die Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität erfolgte nach 24-stündiger Behandlung. Die Aktivität der in den Überstand freigesetzten LDH dient als Maß für den Anteil abgestorbenen Zellen und wird als *relative light units* (RLU) ausgegeben. In intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) hatte keine der

untersuchten Behandlungen der Zellen mit Zinksulfat oder Zinkchlorid einen zytotoxischen Effekt (Abbildung 63 A). Für die Positivkontrolle (Lysispuffer) konnte eine signifikant erhöhte Rate an abgestorbenen Zellen ermittelt werden (6-fach gegenüber unbehandelten Zellen erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Bei den 3D4/31 Makrophagen verhielt es sich ähnlich. Allerdings konnten hier leichte zytotoxische Effekte bei einer Behandlung der Zellen mit *S. Typhimurium* SL1344 beobachtet werden (Abbildung 63 B). Beim Vergleich der Behandlung mit der gleichen Konzentration von Zinksulfat bzw. Zinkchlorid konnte in den 3D4/31 gezeigt werden, dass eine Behandlung der Zellen mit  $ZnCl_2$  zu einem signifikant geringeren zytotoxischen Effekt führt, als die Behandlung mit  $ZnSO_4$  (Abbildung 63 B, 0,5 mM  $ZnCl_2$ : \*\*  $p = 0,001$ ; 1 mM  $ZnCl_2$ : \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Erfolgte nach der Behandlung mit Zinkchlorid bzw. -sulfat eine Infektion mit *Salmonella*, so führte diese in 3D4/31 Zellen gegenüber der Behandlung mit Zink alleine zu einem signifikant erhöhten Anteil an abgestorbenen Zellen (Abbildung 63 B, 0,5 mM  $ZnCl_2$  + ST SL1344: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; 0,5 mM  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  + ST SL1344: \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). Auch bei den 3D4/31 konnte für die Behandlung mit Lysispuffer eine deutlich gegenüber unbehandelten Zellen erhöhte Rate absterbender Zellen detektiert werden (3,6-fach erhöht, \*\*\*  $p \leq 0,0001$ ).

**Abbildung 63: Zytotoxizitätstests zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte von Zinksulfat und Zinkchlorid in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B).** Dargestellt sind die Effekte bei unterschiedlichen Konzentrationen von Zinksulfat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) und Zinkchlorid ( $\text{ZnCl}_2$ ). Teilweise wurde zusätzlich eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 (MOI = 2 – 10) durchgeführt. Die gestrichelte rote Linie spiegelt das basale Level der LDH-Aktivität in unbehandelten Zellen wider. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,01$  und \*\*\*  $p \leq 0,0001$ . ST = *S. Typhimurium* SL1344, RLU = *relative light units*.



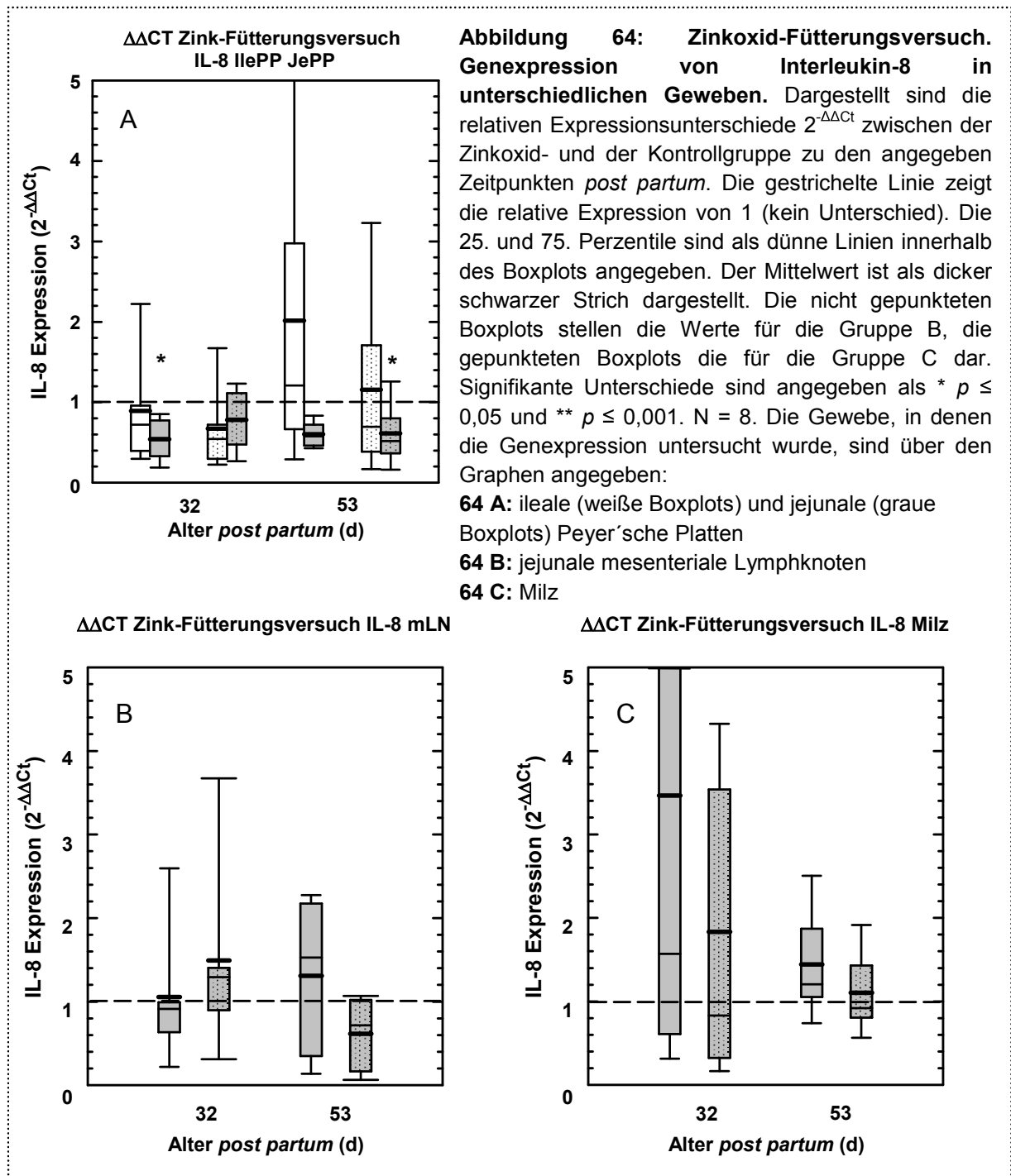
#### 4.8.1. Zinkoxid-Fütterungsversuch

Neben dem *E. faecium* SF68-Fütterungsversuch wurde *in vivo* ebenfalls die Wirkungsweise von Zinkoxid auf die Genexpression unterschiedlicher immunologisch relevanter Proteine untersucht. Dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Zinkoxid im Futter verwendet. In Gruppe B erhielten die Tiere 150 und in Gruppe C 2500 mg Zinkoxid/kg Futter. Gruppe A diente als Kontrollgruppe und wurde mit der minimalen Menge Zinkoxid (50 mg/kg Futter) gefüttert. Ab dem 12. Lebenstag hatten die Ferkel freien Zugang zu den Starterdiäten mit den entsprechenden Zusätzen an Zinkoxid. Die Ferkel wurden im Alter von  $26 \pm 2$  Tagen vom Muttertier abgesetzt. Im Alter von  $32 \pm 1$  und  $53 \pm 1$  Tagen wurden jeweils 8 Tiere pro Gruppe getötet sowie die Gewebeproben entnommen. In Abbildung 64 sind die Effekte einer Zinkoxid-Fütterung auf die Genexpression von Interleukin-8 dargestellt. Kurz nach dem Absetzen, im Alter von 32 Tagen, war die Expression des NF- $\kappa$ B-abhängigen Chemokins IL-8 tendenziell in beiden Gruppen sowohl in den ilealen als auch in den jejunalen Peyer'schen Platten gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 64 A). In den JePP aus Gruppe B



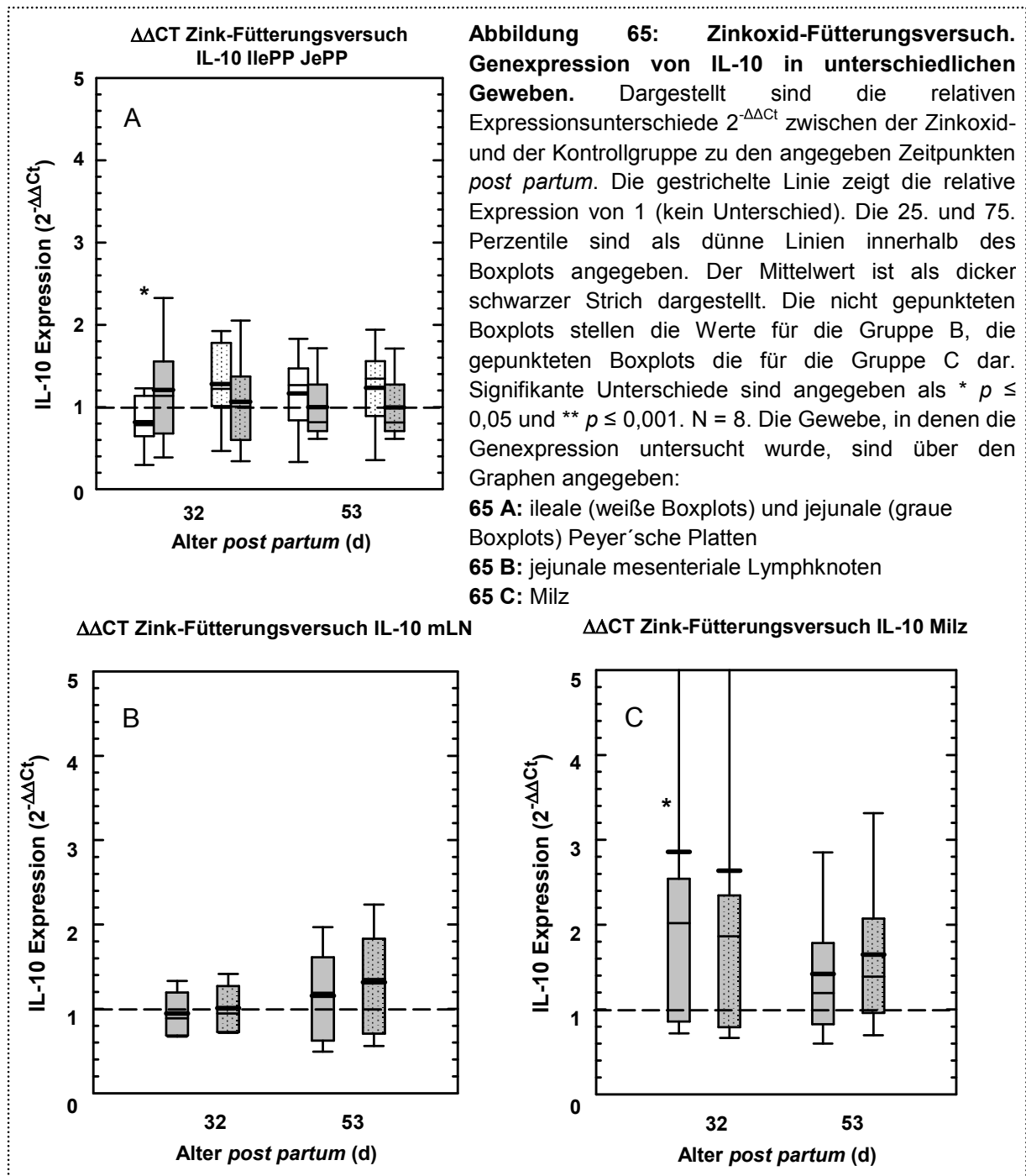
(150 ppm ZnO) war diese reduzierte Genexpression signifikant (Abbildung 64 A, ca. 1,9-fache Reduktion, \*  $p = 0,039$ ). Zum späten Zeitpunkt (53 Tage *post partum*) blieb die Genexpression von IL-8 in den jejunalen Peyer'schen Platten in beiden untersuchten Fütterungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 64 A, Gruppe C, ca. 1,6-fache Reduktion, \*  $p = 0,039$ ). Im Gegensatz dazu war die IL-8-Expression in den IlePP 53 Tage *post partum* tendenziell, verglichen mit der Kontrollgruppe, erhöht (Abbildung 64 A, Gruppe B, 2,1-fach erhöht). In den mesenterialen Lymphknoten scheint kein Unterschied bezüglich der Genexpression von IL-8 für beide Gruppen (B und C) im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu bestehen (Abbildung 64 B). Abbildung 64 C stellt das Genexpressionsprofil von IL-8 in der Milz dar. Kurz nach dem Absetzen (32 Tage *post partum*) scheint die Expression in beiden Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell erhöht zu sein. Allerdings variieren die Werte, sodass keine Signifikanzen ermittelt werden konnten. Im Alter von 53 Tagen war die Genexpressionsrate in Gruppe B und C fast wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe zurückgekehrt (Abbildung 64 C).

Beim Zinkoxid-Fütterungsversuch scheint es ähnlich wie beim *E. faecium*-Fütterungsversuch ebenfalls eine altersabhängige Verschiebung der Genexpression von IL-8 zu geben. Zum Zeitpunkt direkt nach dem Absetzen (32 Tage *post partum*) konnten reduzierte Werte für die beiden untersuchten Zinkoxid-Fütterungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe in den Peyer'schen Platten gefunden werden. Dahingegen war zu diesem Zeitpunkt die Expression von IL-8 in der Milz in beiden Gruppen deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöht. Zum späten Zeitpunkt, 53 Tage *post partum*, war die Expression von IL-8 in Gruppe B und C in den ilealen Peyer'schen Platten erhöht, in den jejunalen dagegen teilweise, verglichen mit der Kontrollgruppe, signifikant reduziert. In der Milz kam es zu einer Annäherung der Werte für die IL-8-Genexpression an die in der Kontrollgruppe gemessenen Werte.



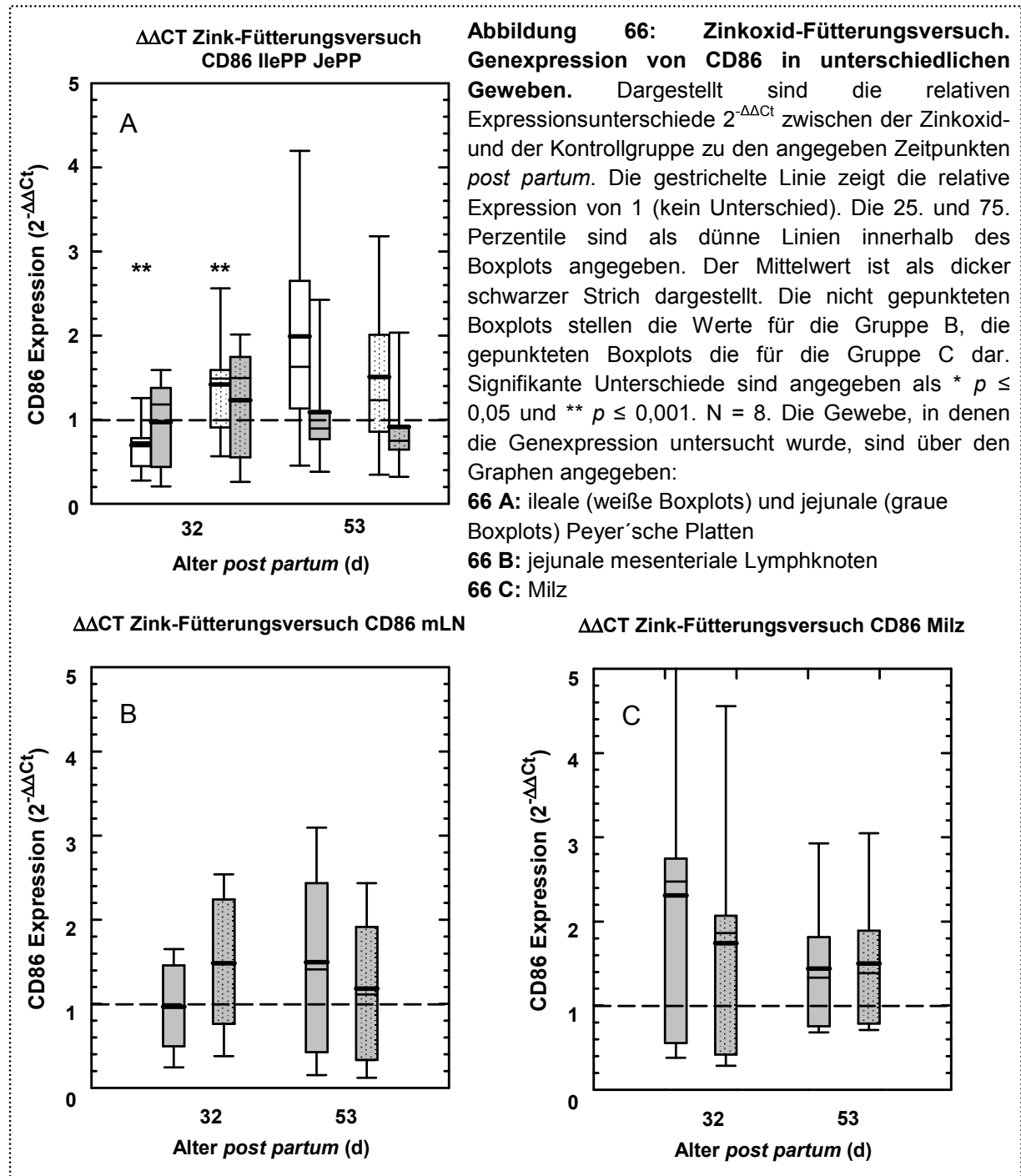
Im Gegensatz zum Genexpressionsmuster des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8, bei dem signifikante Unterschiede beim Vergleich der Fütterungsgruppen B und C mit der Kontrollgruppe in den Peyer'schen Platten aufgetreten sind, zeigte das Profil des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 keine Signifikanzen bei einem Vergleich mit der Kontrollgruppe (Abbildung 65 A). Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der zwei Zinkoxid-Fütterungsgruppen in den Peyer'schen Platten 32 Tage *p. p.* detektiert werden. Die Genexpression von IL-10 in den IlePP war in Gruppe B gegenüber Gruppe C signifikant reduziert (Abbildung 65 A, \*  $p = 0,017$ ). Insgesamt zeigte sich 32 Tage *p. p.* beim Vergleich mit der IL-8-Genexpression in den Peyer'schen Platten für IL-10 ein genau

umgekehrtes Genexpressionsmuster (vergleiche Abbildung 64 A und Abbildung 65 A). Dies macht die engen Zusammenhänge von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen deutlich. Im Alter von 53 Tagen zeigte das Expressionsprofil von IL-10 ein zum Genexpressionsprofil von IL-8 paralleles Muster (vergleiche Abbildung 64 A und Abbildung 65 A), allerdings ohne große Unterschiede zur Kontrollgruppe zu zeigen. In den mLN waren keine signifikanten Unterschiede der Genexpression von IL-10 in den untersuchten Gruppen B und C verglichen mit der Kontrollgruppe detektierbar. 53 Tage *p. p.* scheint die Expression von IL-10 in beiden Gruppen tendenziell erhöht zu sein (Abbildung 65 B). In der Milz war die Expressionsrate von IL-10, ähnlich wie auch die von IL-8, 32 Tage *p. p.* in beiden untersuchten Zinkoxid-Fütterungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 65 C, Gruppe B, ca. 2,9-fach erhöht, \*  $p = 0,017$ ). Im Alter von 53 Tagen näherte sich diese erhöhte Expressionsrate in der Milz wieder dem Expressionsprofil der Kontrollgruppe an, allerdings blieben die Werte leicht erhöht (Abbildung 65 C).



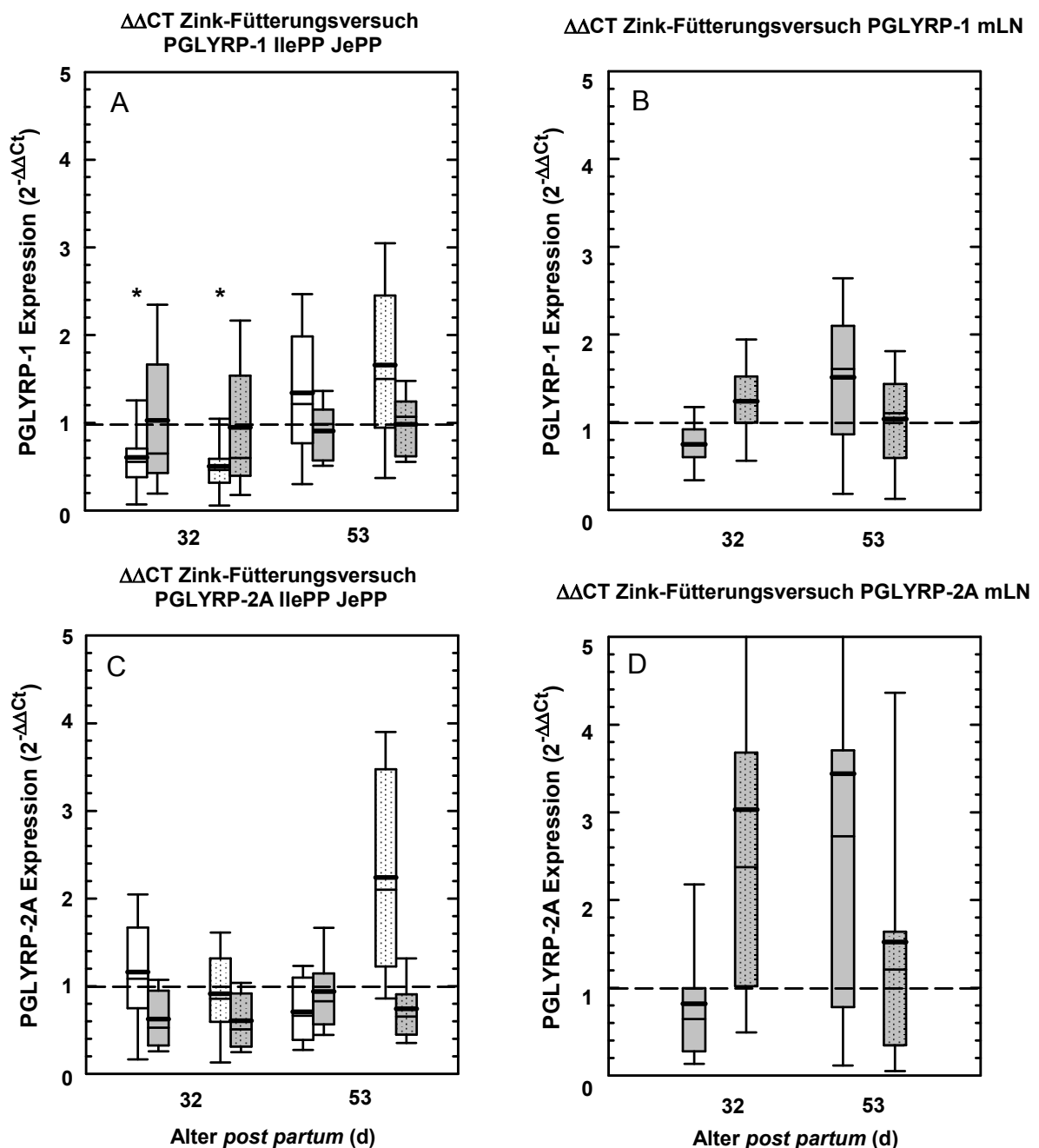
Das Genexpressionsmuster des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2) ist in Abbildung 66 dargestellt. Bezüglich der Genexpression in den Peyer'schen Platten zeigten sich 32 Tage *p. p.* große Differenzen zwischen den untersuchten Zinkoxid-Fütterungsgruppen. In Gruppe B (150 ppm ZnO) war der Unterschied hinsichtlich der Expression von CD86 in den ilealen Peyer'schen Platten gegenüber der Expression, die in Gruppe C (2500 ppm ZnO) gemessen wurde, signifikant (Abbildung 66 A, \*\*  $p = 0,001$ ). In Gruppe B war die Expression von CD86 um das 1,4-Fache gegenüber der Kontrollgruppe reduziert, in Gruppe C um das 1,4-Fache erhöht. Diese Erhöhung der Genexpression von CD86 in den IlePP in Gruppe C verglichen mit der Kontrollgruppe ist signifikant (Abbildung 66 A, \*\*  $p = 0,001$ ). Im Alter von 53 Tagen war die Expression von CD86 in beiden Gruppen in den ilealen Peyer'schen

Platten im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht bzw. bleibt erhöht (Gruppe C, Abbildung 66 A). Hinsichtlich der mesenterialen Lymphknoten zeigten die Genexpressionsanalysen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 66 B). In der Milz war die Genexpression von CD86 32 Tage *post partum* in beiden Gruppen (B und C) erhöht und blieb bei den Ferkeln auch im Alter von 53 Tagen tendenziell erhöht (Abbildung 66 C).



Die Genexpressionsprofile von PGLYRP-1 und -2A sind in Abbildung 67 dargestellt. PGLYRP-1 wurde 32 Tage *post partum* in den ilealen Peyer'schen Platten in beiden Gruppen signifikant weniger exprimiert als in der Vergleichsgruppe A (Abbildung 67 A,

Gruppe B: 1,7-fache Reduktion, \*  $p = 0,011$ ; Gruppe C: 2-fache Reduktion, \*  $p = 0,003$ ). Im Alter von 53 Tagen konnte in den IlePP der Ferkel im Gegensatz dazu allerdings eine tendenziell leicht erhöhte Genexpression von PGLYRP-1 detektiert werden. Für die JePP zeigten sich zu keinem Zeitpunkt und unabhängig von der Zinkoxid-Fütterungsgruppe Unterschiede hinsichtlich der Genexpression von PGLYRP-1 (Abbildung 67 A). Die Genexpression von PGLYRP-2A in den JePP kurz nach dem Absetzen (32 Tage *post partum*) war in beiden Gruppen im Gegensatz zu PGLYRP-1 gegenüber der Kontrollgruppe eher erniedrigt, in den IlePP konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 67 C). In Gruppe C zeigte die Expression von PGLYRP-2A 53 Tage *post partum* in den ilealen Peyer'schen Platten eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Tendenz, in den JePP war sie dagegen eher reduziert (Abbildung 67 C). Das Genexpressionsmuster von PGLYRP-1 und -2A ähnelt sich in den mLN (Abbildung 67 B und D). Dabei zeigten die beiden Fütterungsgruppen B und C Unterschiede. Zunächst war die Expression von PGLYRP-1 und -2A in den mLN bezüglich Gruppe B tendenziell erniedrigt, in Gruppe C dahingegen eher erhöht. Im Alter von 53 Tagen änderte sich dieses Muster. In Gruppe B konnte nun eine tendenziell erhöhte Expression detektiert werden, wohingegen die Genexpression von PGLYRP-1 und -2A in Gruppe C vergleichbar mit der Kontrollgruppe war (Abbildung 67 B und D).



**Abbildung 67: Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-1 und PGLYRP-2A in unterschiedlichen Geweben.** Dargestellt sind die relativen Expressionsunterschiede  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  zwischen der Zinkoxid- und der Kontrollgruppe zu den angegebenen Zeitpunkten *post partum*. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Expression von 1 (kein Unterschied). Die 25. und 75. Perzentile sind als dünne Linien innerhalb des Boxplots angegeben. Der Mittelwert ist als dicker schwarzer Strich dargestellt. Die nicht gepunkteten Boxplots stellen die Werte für die Gruppe B, die gepunkteten Boxplots die für die Gruppe C dar. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,001$ . N = 8. Die Gewebe, in denen die Genexpression untersucht wurde, sind über den Graphen angegeben:

**67 A:** PGLYRP-1 ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

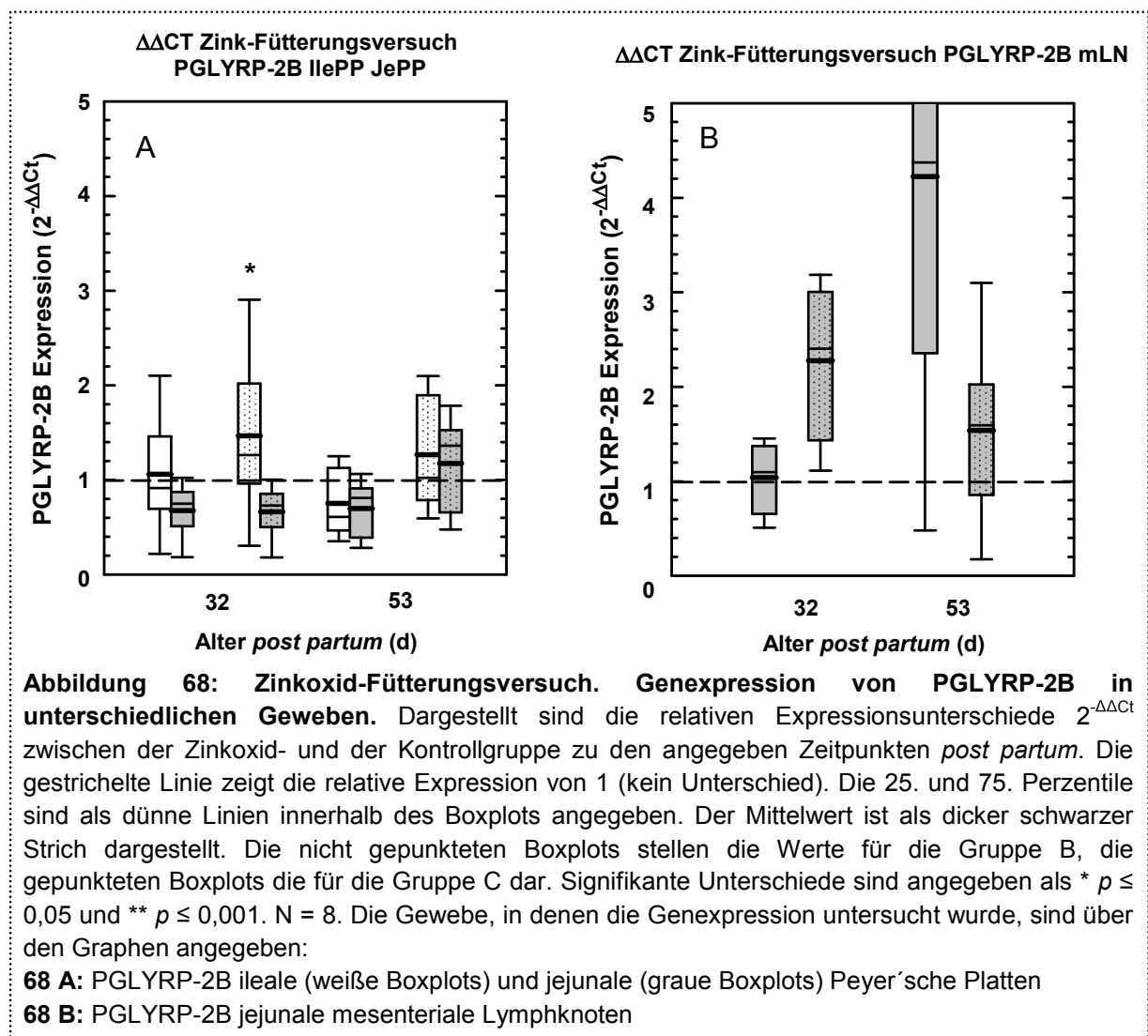
**67 B:** PGLYRP-1 jejunale mesenteriale Lymphknoten

**67 C:** PGLYRP-2A ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

**67 D:** PGLYRP-2A jejunale mesenteriale Lymphknoten

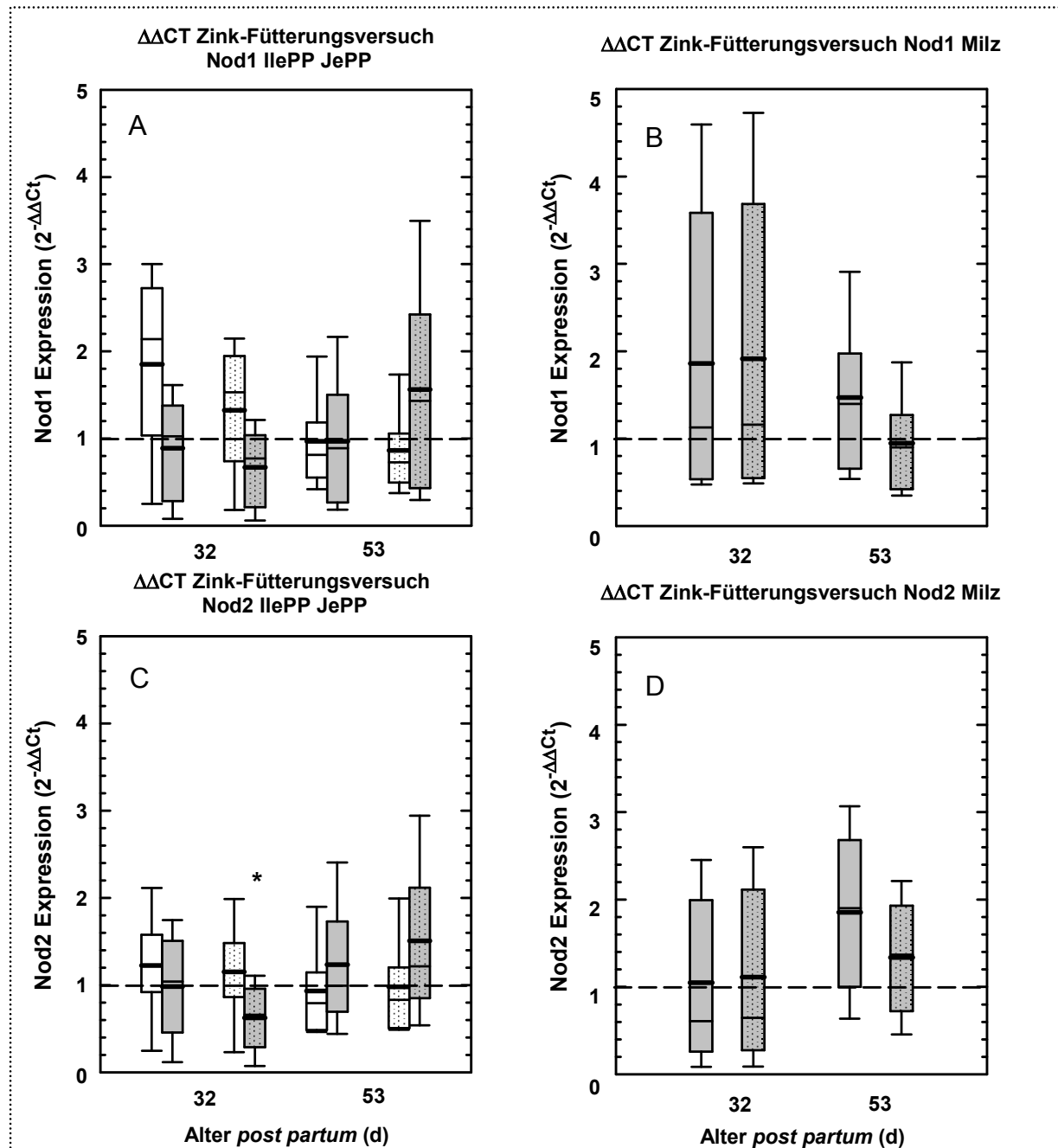
Die Genexpression von PGLYRP-2B in den Peyer'schen Platten sowie den mLN ist in Abbildung 68 A und B gezeigt. Ähnlich wie bei PGLYRP-1 gesehen, war die Expression von PGLYRP-2B in den JePP 32 Tage *p. p.* in Gruppe B und C tendenziell gegenüber der Vergleichsgruppe A erniedrigt (Abbildung 68 A). Dahingegen war die Expression von PGLYRP-2B in Gruppe C in den IlePP verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 68 A, 1,5-fach erhöht, \*  $p = 0,003$ ). Beim Vergleich mit der zweiten Fütterungsgruppe (Gruppe B) wird deutlich, dass der Unterschied ebenfalls signifikant ist (32 d *p. p.*: IlePP, Gruppe B:Gruppe C, \*  $p = 0,031$ ). Zum späten Zeitpunkt, 53 Tage *p. p.*, waren keine signifikanten Unterschiede in Gruppe B bzw. C gegenüber der Kontrollgruppe detektierbar. Tendenziell waren die Werte in Gruppe B eher geringfügig erniedrigt, in Gruppe C dagegen leicht erhöht (Abbildung 68 A). In den jejunalen mLN zeigte sich ein ähnliches Muster für die Genexpression von PGLYRP-2B wie für PGLYRP-1 und -2A (vergleiche Abbildung 67 B und D, Abbildung 68 B). Auch hier gab es gruppenabhängige Unterschiede bei der Genexpression. Zunächst, 32 Tage *p. p.*, war die Genexpression von PGLYRP-2B in Gruppe C erhöht, in Gruppe B gab es keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Betrachtet man dagegen den späten Zeitpunkt (53 Tage *p. p.*), so war die Expression von PGLYRP-2B in Gruppe C wieder vergleichbar mit der in der Kontrollgruppe, in Gruppe B war eine erhöhte Expression detektierbar (Abbildung 68 B).





Bei der Betrachtung der Genexpressionsanalysen von Nod1 und Nod2 wird deutlich, dass sich die Genexpressionsmuster in den Peyer'schen Platten sehr ähneln (Abbildung 69 A und C). Im Alter von 32 Tagen war die Genexpression der beiden Proteine in den IlePP bei beiden Fütterungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell eher erhöht. In Gruppe B zeigte die Expression von Nod1 und Nod2 in den JePP keinen Unterschied zur Vergleichsgruppe A, allerdings konnte für die Gruppe C eine reduzierte Expression detektiert werden (Abbildung 69 A und C). Diese verringerte Expression war für Nod2 signifikant (Abbildung 69 C, 1,6-fache Reduktion, \*  $p = 0,025$ ). Das Genexpressionsmuster für die Nod-Proteine in den Geweben der intestinalen Wand 32 Tage *p. p.* ähnelt den Expressionsprofilen von PGLYRP-2A und -2B (vergleiche Abbildung 67 A, Abbildung 68 A und Abbildung 69 A und C). Hier wird erneut die Verbindung zwischen Nod-Proteinen und PGLYRPs deutlich. Für die Expression der Nod-Proteine in den IlePP waren 53 Tage *p. p.* weder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen noch zur Kontrollgruppe erkennbar. In Gruppe C war die Expression von Nod1 und Nod2 in den JePP tendenziell leicht erhöht (Abbildung 69 A und C). Für die Milz konnten 32 Tage *p. p.* ähnliche Werte für beide Gruppen (A und B) gemessen werden, allerdings waren die Expressionen von Nod1

tendenziell erhöht (Abbildung 69 B und D). Im Alter von 53 Tagen war die Genexpression der beiden Nod-Proteine in den mLN in Gruppe B tendenziell erhöht (Abbildung 69 B und D).



**Abbildung 69: Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von Nod1 und Nod2 in unterschiedlichen Geweben.** Dargestellt sind die relativen Expressionsunterschiede  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  zwischen der Zinkoxid- und der Kontrollgruppe zu den angegebenen Zeitpunkten *post partum*. Die gestrichelte Linie zeigt die relative Expression von 1 (kein Unterschied). Die 25. und 75. Perzentile sind als dünne Linien innerhalb des Boxplots angegeben. Der Mittelwert ist als dicker schwarzer Strich dargestellt. Die nicht gepunkteten Boxplots stellen die Werte für die Gruppe B, die gepunkteten Boxplots die für die Gruppe C dar. Signifikante Unterschiede sind angegeben als \*  $p \leq 0,05$  und \*\*  $p \leq 0,001$ . N = 8. Die Gewebe, in denen die Genexpression untersucht wurde, sind über den Graphen angegeben:

**69 A:** Nod1 ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

**69 B:** Nod1 Milz

**69 C:** Nod2 ileale (weiße Boxplots) und jejunale (graue Boxplots) Peyer'sche Platten

**69 D:** Nod2 Milz

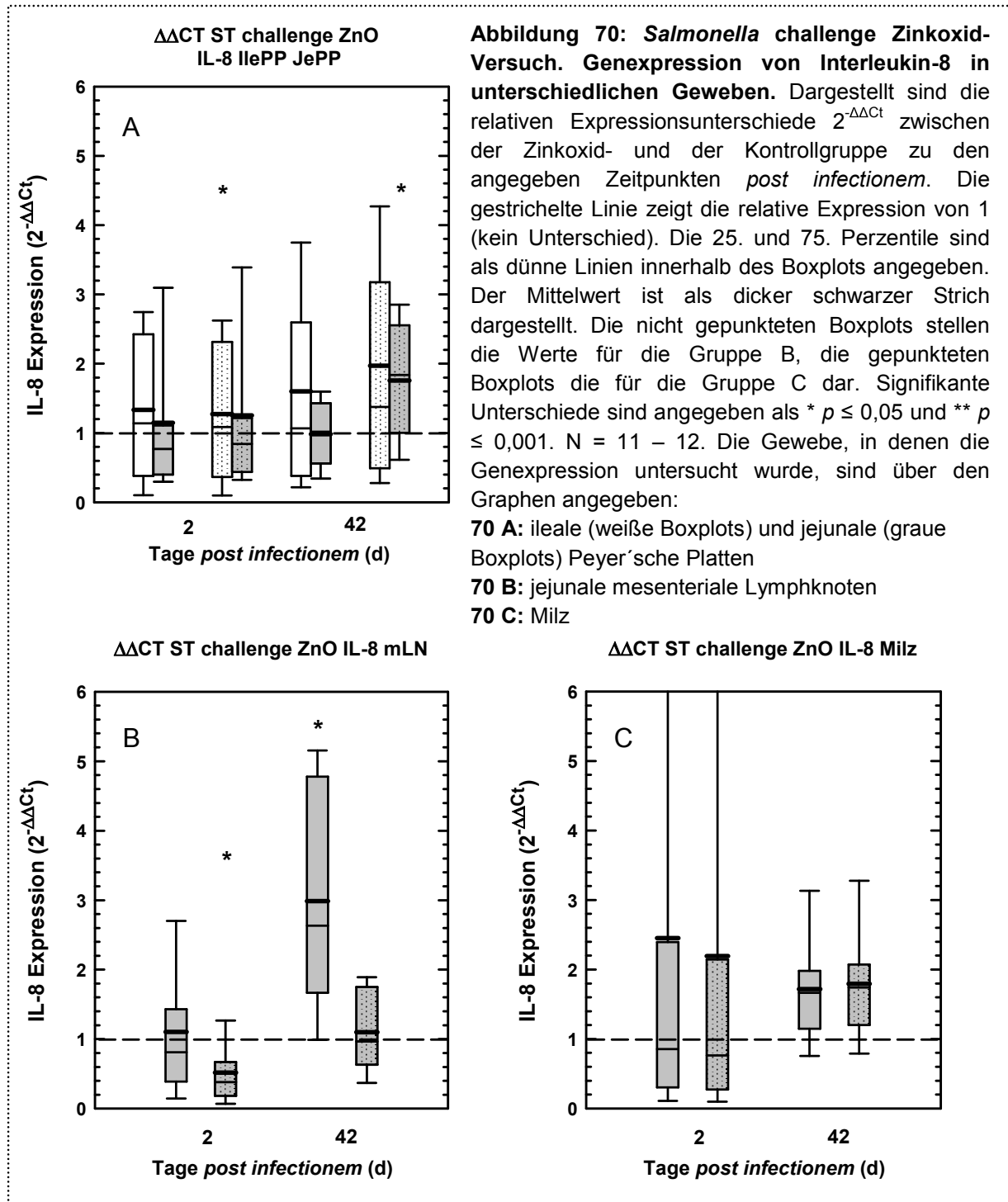
Zusammenfassend konnte zum Zeitpunkt kurz nach dem Absetzen (32 Tage *p. p.*) eine eher anti-inflammatorisch ausgerichtete Immunantwort beobachtet werden. Diese war durch eine zum Teil signifikant verringerte Genexpressionsrate des NF- $\kappa$ B-abhängigen Chemokins IL-8 in den Geweben der intestinalen Wand sowie, für Gruppe B, auch durch eine reduzierte Expression von CD86 in den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten gekennzeichnet. Außerdem war die Genexpression von IL-10 in den Geweben der intestinalen Wand im Vergleich zur Expression von IL-8 höher. Diese anti-inflammatorische Ausrichtung bedingt durch die verringerte Expression von IL-8 auch eine teilweise signifikant reduzierte Expression der PGLYRPs in den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten. Allerdings scheint es hier auch Unterschiede zwischen den drei untersuchten PGLYRPs zu geben. Im Alter von 53 Tagen war die Genexpression des pro-inflammatorischen Chemokins IL-8 in den JePP weiterhin signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert, dahingegen näherte sich das Expressionsprofil von IL-8 in den ilealen Peyer'schen Platten dem der Kontrollgruppe bzw. ist erhöht. Auch CD86 wurde in den ilealen Peyer'schen Platten verstärkt exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass sich die Immunantwort zum späten Zeitpunkt, fast vier Wochen nach dem Absetzen, wieder eher pro-inflammatorisch ausrichtet. Für die PGLYRPs konnten wieder mit der Kontrollgruppe vergleichbare Genexpressionsraten bzw. leicht darüber hinaus erhöhte Raten gemessen werden.

Insgesamt scheint es wenige Unterschiede hinsichtlich der Genexpressionsmuster verschiedener immunrelevanter Gene zwischen den beiden Zinkoxid-Fütterungsgruppen (Gruppe B: 150 ppm ZnO, Gruppe C: 2500 ppm ZnO) zu geben. Differenzen traten vor allem bei den PGLYRPs und den Nod-Proteinen auf, aber auch beim ko-stimulatorischen Molekül CD86. Bei der Expression von CD86 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe B und C 32 Tage *p. p.* in den IlePP. In Gruppe B war die Expression erniedrigt, in Gruppe C dagegen deutlich erhöht (Abbildung 66 A). Bei den PGLYRPs traten gruppenspezifische Unterschiede sowohl 32 als auch 53 Tage *p. p.* in der Milz auf, für die Nod-Proteine waren solche Unterschiede nur 53 Tage *p. p.* in der Milz detektierbar.

### **4.8.2. *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch**

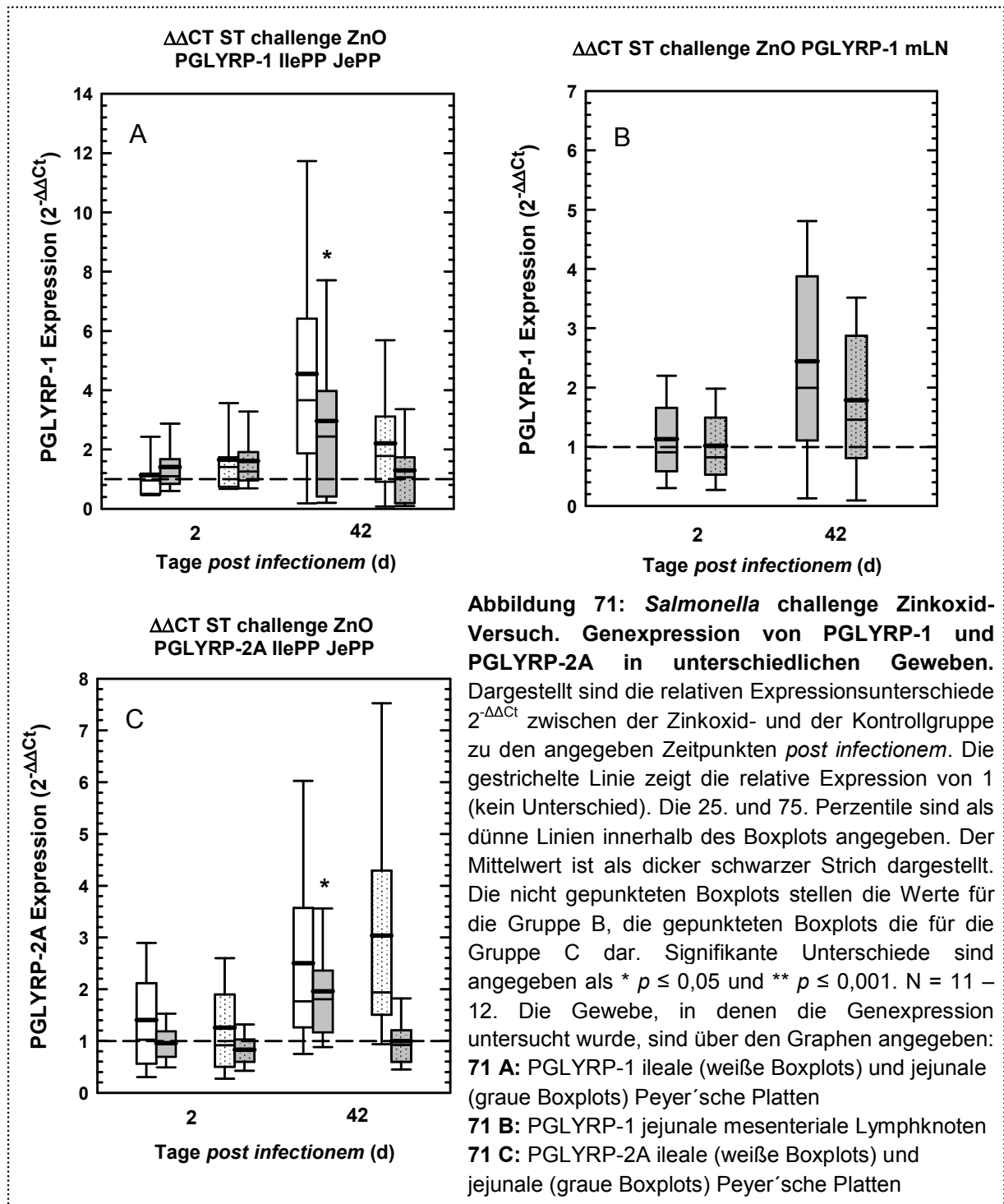
Nachdem zuvor im Laufe des Zinkoxid-Fütterungsversuches Unterschiede bezüglich der Genexpressionsmuster der untersuchten Zytokine/Chemokine sowie anderer immunrelevanten Proteine detektiert werden konnten, sollte in einem nachfolgenden Versuch der Einfluss einer Zinkoxid-Fütterung der Ferkel auf eine nachfolgende Infektion mit enteropathogenen Salmonellen untersucht werden. Von Interesse war, wie sich die Genexpressionsprofile bei einer Infektion mit *Salmonella* DT104 verhalten würden. Dazu wurden die Ferkel im Alter von 32 Tagen mit *S. Typhimurium* DT104 infiziert und zwei bzw. 42 Tage *post infectionem* 11 – 12 Tiere je Gruppe getötet und die Gewebeproben

entnommen. Wie schon im Fütterungsversuch wurden Proben aus den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten, der Milz sowie jejunale mesenteriale Lymphknoten entnommen. In Abbildung 70 ist das Genexpressionsprofil von Interleukin-8 dargestellt. Zwei Tage nach der Infektion war die Genexpression von IL-8 in den ilealen Peyer'schen Platten in Gruppe C gegenüber der Vergleichsgruppe A signifikant erhöht (Abbildung 70 A, ca. 1,3-fach erhöht, \*  $p = 0,029$ ). Auch in Gruppe B war die Expression tendenziell erhöht. Zum späten Zeitpunkt, 42 Tage *p. i.*, scheinen die Expressionsraten von IL-8 in den ilealen Peyer'schen Platten bei beiden Gruppen gegenüber der Kontrolle erhöht zu sein. In Gruppe C war die IL-8-Expression in den JePP signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe aber auch gegenüber Gruppe B gesteigert (Abbildung 70 A, Gruppe C:Kontrolle, ca. 1,8-fach erhöht, \*  $p = 0,017$ ; Gruppe C:Gruppe B \*  $p = 0,012$ ). Die Genexpressionsanalyse in den mLN zeigte, dass IL-8 hier gruppenabhängig exprimiert wird. Zwei Tage *p. i.* war die Expression in Gruppe B vergleichbar mit der in der Kontrollgruppe, dahingegen war sie in Gruppe C signifikant reduziert (Abbildung 70 B, 1,9-fache Reduktion, \*  $p = 0,008$ ). Betrachtet man den Zeitpunkt 42 Tage *p. i.* so zeigte sich für die Gruppe B eine signifikant erhöhte Genexpression von IL-8 in den mLN (Abbildung 70 B, 3-fach erhöht, \*  $p = 0,031$ ), wohingegen bezüglich der Expression in Gruppe C kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten war. Der Unterschied zwischen Gruppe C und Gruppe B ist hier ebenfalls signifikant (\*  $p = 0,016$ ). In der Milz scheint die Expression von IL-8 sowohl zwei Tage als auch 42 Tage nach der Infektion tendenziell gegenüber der Kontrollgruppe erhöht zu sein (Abbildung 70 C). Allerdings variieren die Werte stark.

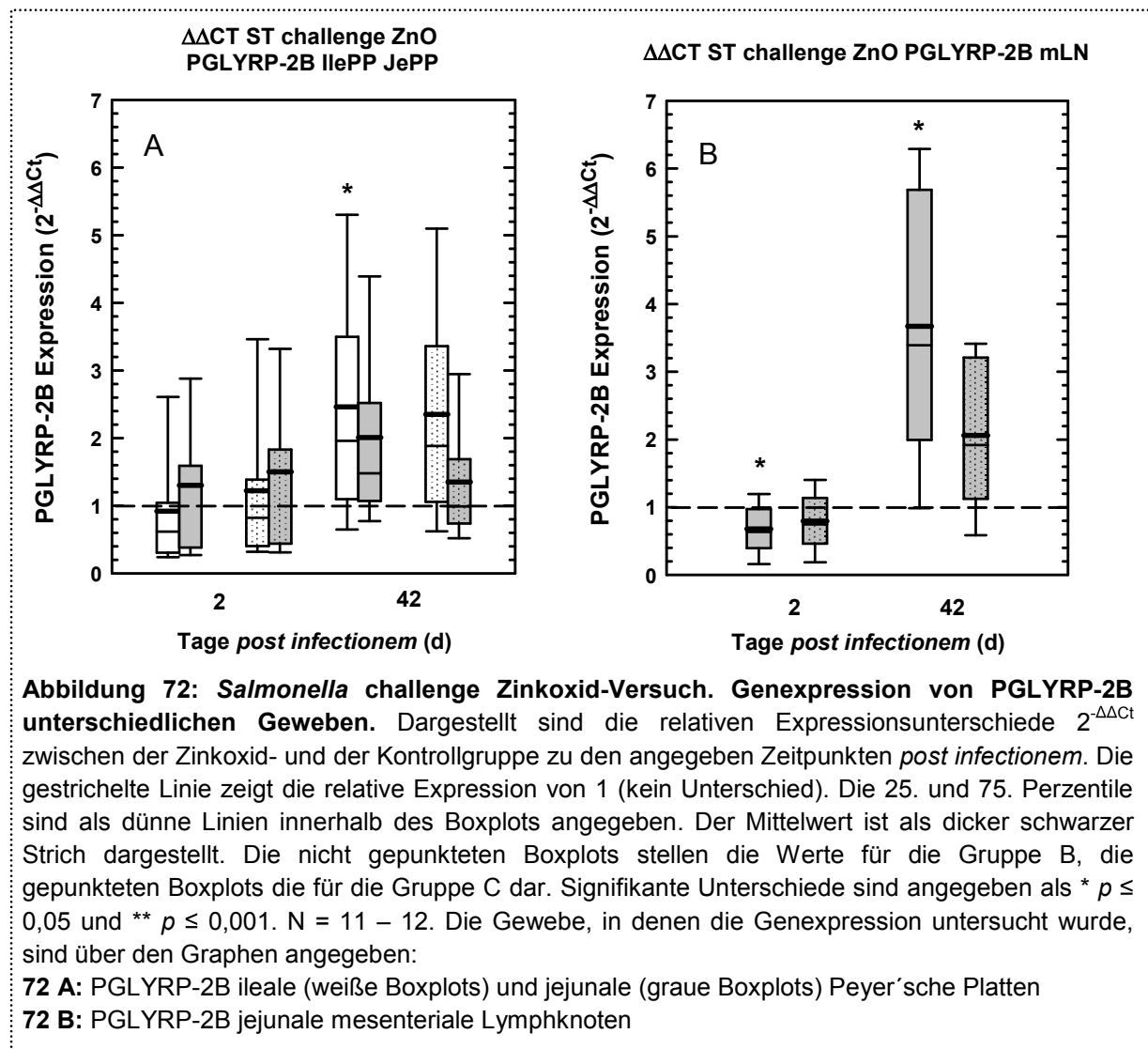


Die Analyse der Genexpression von PGLYRP-1 und -2A (dargestellt in Abbildung 71 ) zeigte zum Zeitpunkt zwei Tage *p. i.* für beide untersuchten Gruppen in Geweben der intestinalen Wand keine wesentlichen oder signifikanten Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe. 42 Tage nach der Infektion war die Expression von PGLYRP-1 in den IlePP für beide Gruppen gegenüber der Vergleichsgruppe A erhöht (Abbildung 71 A, Gruppe B: Kontrolle, ca. 4,6-fach erhöht,  $p = 0,067$ ). In den JePP war die Genexpression von PGLYRP-1 für Gruppe B gegenüber der Kontrollgruppe erhöht und verglichen mit Gruppe C signifikant erhöht (Abbildung 71 A, \*  $p = 0,007$ ). PGLYRP-2A wurde 42 Tage *p. i.* in den IlePP in beiden

Gruppen verstärkt exprimiert (Abbildung 71 C, Gruppe C:Kontrolle,  $p = 0,052$ ). In Gruppe B war die PGLYRP-2A-Genexpression in den jejunalen Peyer'schen Platten signifikant gegenüber der in der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 71 C, ca. 2-fach, \*  $p = 0,035$ ). In den mesenterialen Lymphknoten wurde PGLYRP-1 zum frühen Zeitpunkt in beiden Zinkoxid-Fütterungsgruppen ähnlich wie in den Kontrollgruppen exprimiert, 42 Tage *p. i.* scheint die Genexpression in beiden Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe tendenziell verstärkt zu sein (Abbildung 71 B).



Das Genexpressionsprofil von PGLYRP-2B ähnelt dem der anderen PGLYRPs. Zum frühen Zeitpunkt scheint in den Geweben der intestinalen Wand kein Unterschied bezüglich der Genexpression von PGLYRP-2B verglichen mit der Kontrollgruppe aufzutreten (Abbildung 72 A). Allerdings war ein signifikanter Unterschied 42 Tage *p. i.* zu beobachten. In den IlePP war die Expression von PGLYRP-2B gegenüber der Kontrollgruppe verstärkt (Abbildung 72 A, Gruppe B:Kontrolle, ca. 2,5-fach erhöht, \*  $p = 0,05$ ). In den JePP scheint in beiden Gruppen die Genexpression des PGLYRPs ebenfalls tendenziell erhöht zu sein (Abbildung 72 A). Bei den mLN trat zwei Tage *p. i.* in Gruppe B eine signifikant reduzierte Genexpression von PGLYRP-2B auf (Abbildung 72 B, ca. 1,5-fach reduziert, \*  $p = 0,042$ ). 42 Tage *p. i.* war die Genexpression in Gruppe B dagegen signifikant gegenüber der Expression in der Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 72 B, ca. 3,7-fach erhöht, \*  $p = 0,008$ ). In Gruppe C konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine verstärkte Expression von PGLYRP-2B detektiert werden.



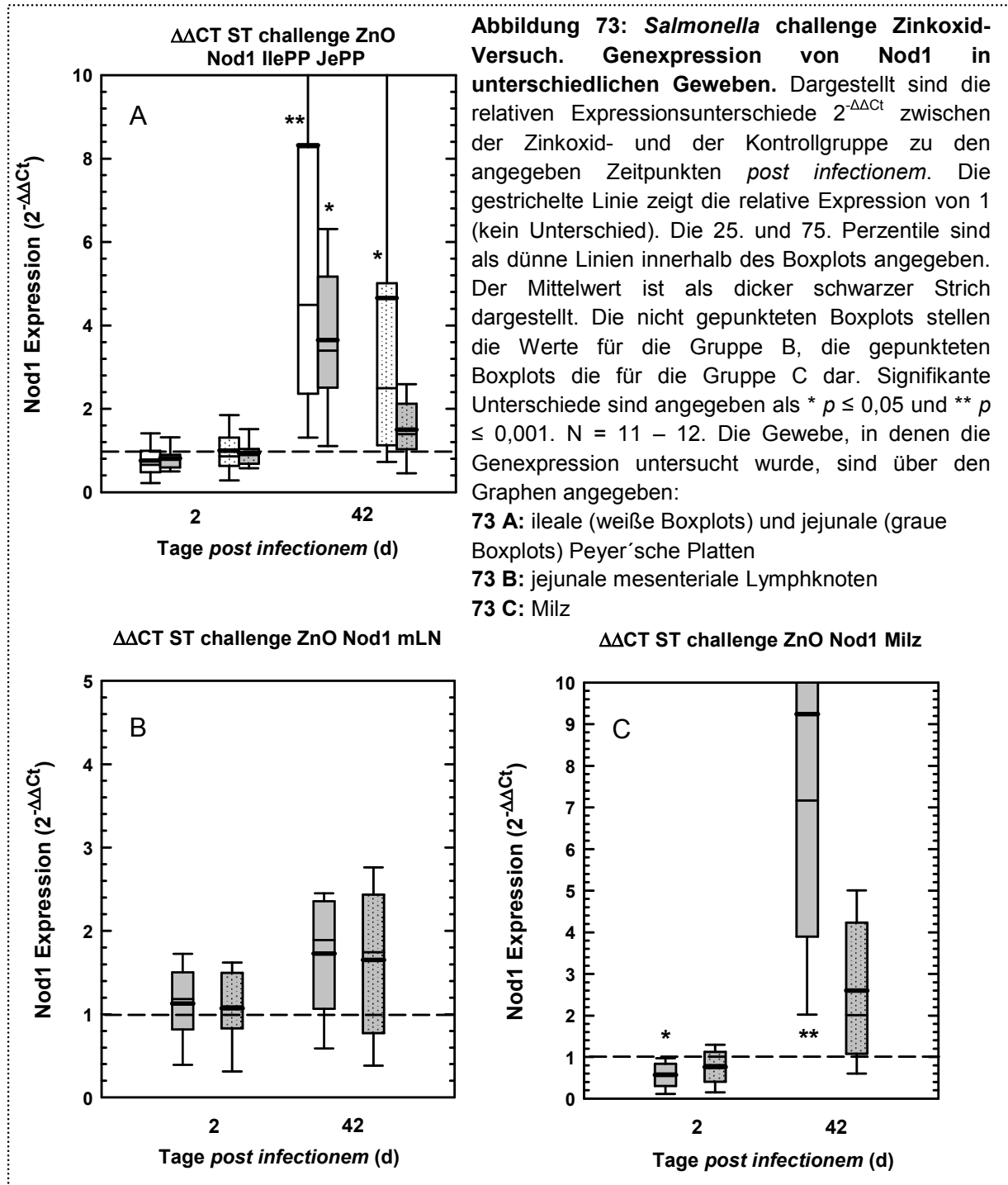
Die größten Unterschiede bezüglich der Genexpression konnten für die beiden intrazellulären Peptidoglykan-Sensoren, Nod1 und Nod2 beobachtet werden (Abbildung 73

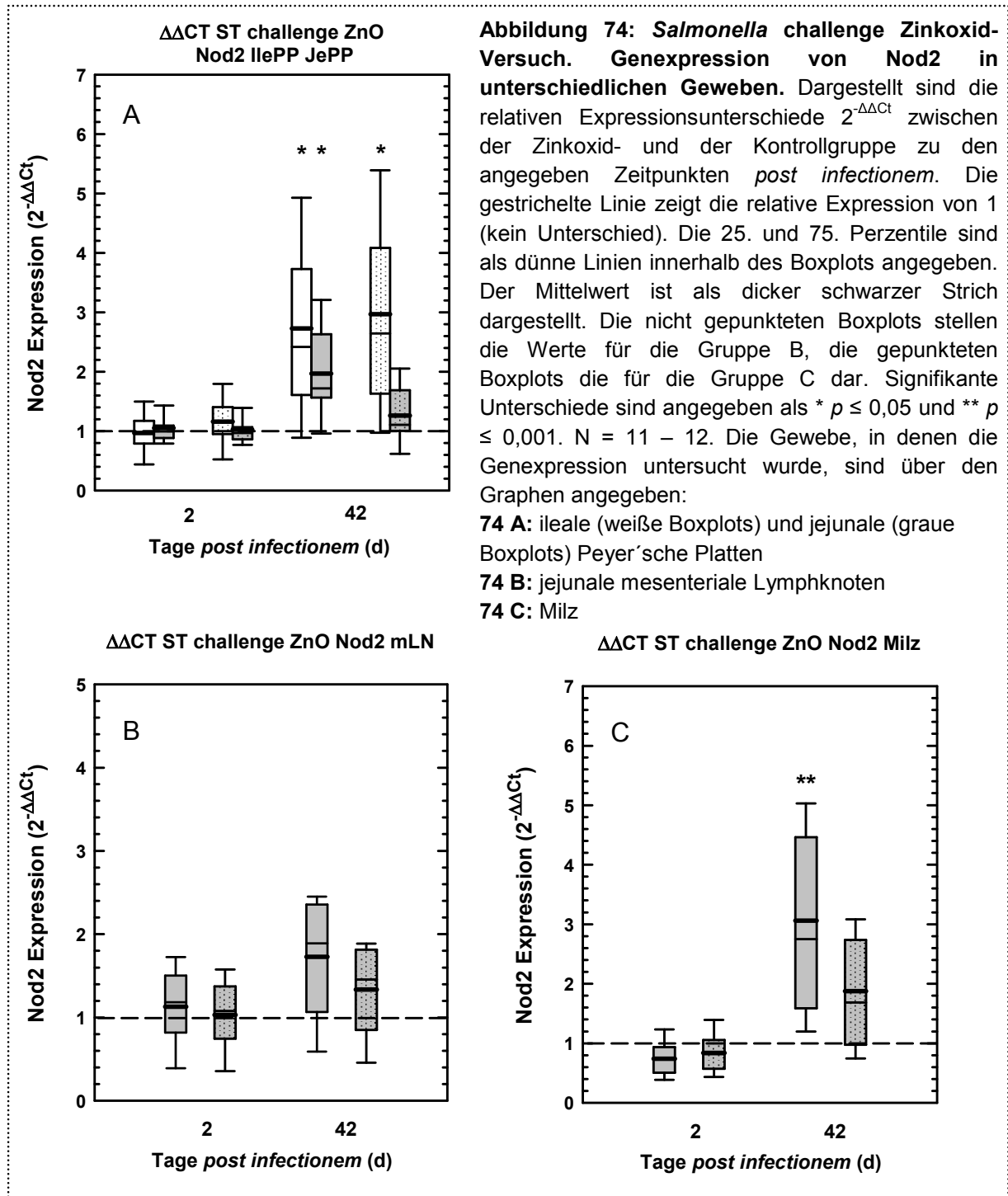
und Abbildung 74). Auch hier konnten zunächst zwei Tage *p. i.* in den Peyer'schen Platten keine Differenzen verglichen mit der Kontrollgruppe für beide untersuchten Zinkoxid-Fütterungsgruppen beobachtet werden. Zum späten Zeitpunkt wurden dagegen einige signifikante Unterschiede detektiert. Die Expression von Nod1 und Nod2 war in den IlePP 42 Tage *p. i.* in beiden Gruppen signifikant erhöht (Abbildung 73 A, Nod1: Gruppe B: Kontrolle, ca. 8,3-fach erhöht, \*\*  $p \leq 0,001$ ; Gruppe C: Kontrolle, ca. 4,7-fach erhöht, \*  $p = 0,022$ ; Abbildung 74 A, Nod2: Gruppe B: Kontrolle, ca. 2,7-fach erhöht, \*  $p = 0,013$ ; Gruppe C: Kontrolle, ca. 3-fach erhöht, \*  $p = 0,005$ ). In den JePP war die Expression von Nod1 und Nod2 42 Tage *p. i.* nur in Gruppe B signifikant verstärkt, in Gruppe C konnten keine wesentlichen Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden (Abbildung 73 A, Nod1: Gruppe B: Kontrolle, ca. 3,7-fach erhöht, \*  $p = 0,003$ ; Abbildung 74 A, Nod2: Gruppe B: Kontrolle, ca. 2-fach erhöht, \*  $p = 0,047$ ). Der Unterschied hinsichtlich der Genexpressionsrate von Nod1 in den JePP zwischen Gruppe B und Gruppe C war ebenfalls signifikant (Abbildung 73 A, \*  $p = 0,046$ ). In den mLN konnte für die Expression von Nod1 und Nod2 zwei Tage *p. i.* kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, 42 Tage *p. i.* war die Expression dagegen in beiden Gruppen tendenziell erhöht (Abbildung 73 B und Abbildung 74 B). Betrachtet man die Expression der Nod-Proteine in der Milz (Abbildung 73 C und Abbildung 74 C), so konnte zwei Tage *p. i.* für Nod1 in Gruppe B, ähnlich wie für PGLYRP-2B gesehen, eine signifikant verringerte Expression gegenüber der in der Vergleichsgruppe A gefunden werden (Abbildung 73 C, ca. 1,8-fache Reduktion, \*  $p = 0,024$ ). 42 Tage *p. i.* war die Expression von Nod1 und Nod2 in den mLN in Gruppe B signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe A erhöht (Abbildung 73 C, Nod1: Gruppe B: Kontrolle, ca. 9,2-fach erhöht, \*\*  $p \leq 0,001$ ; Abbildung 74 C, Nod2: Gruppe B: Kontrolle, ca. 3,1-fach erhöht, \*\*  $p = 0,001$ ). Auch in Gruppe C konnten zu diesem Zeitpunkt *p. i.* tendenziell verstärkte Expressionswerte der Nod-Proteine gemessen werden.

Insgesamt scheint zum frühen Zeitpunkt, zwei Tage *p. i.*, eine Zinkoxid-Fütterung der Ferkel keinen wesentlichen Einfluss auf die Genexpression der PGLYRPs in Geweben der intestinalen Wand zu haben. Auch bei der Betrachtung der Genexpressionsprofile der PGLYRPs in den mLN fällt auf, dass mit Ausnahme von PGLYRP-2B und Nod1 (Gruppe B) keine Unterschiede in der Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe 2 Tage *p. i.* beobachtet werden konnten. Signifikante Differenzen traten vor allem 42 Tage *p. i.* auf. Hier scheint die Gabe von Zinkoxid einen positiven Einfluss auf die Genexpression der PGLYRPs und Nod-Proteine zu haben. Signifikant verstärkte Expressionswerte von IL-8 in den Geweben der intestinalen Wand und den mLN könnten ein Auslöser für die verstärkte Expression der PGLYRPs sein. Die verstärkte Produktion des NF- $\kappa$ B-abhängigen Chemokins könnte auf die Stimulierung von Nod1 durch MDP und das daraus resultierende Nod-Signalling, welches zur Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors führt, zurückgehen. Auf der anderen Seite besitzen die PGLYRPs -2A und -2B eine Amidase-



Aktivität und können Peptidoglykan spalten. Dabei werden Nod2-Liganden (meso-DAP) abgebaut und Liganden für Nod1 (DAP) hergestellt. Sowohl für die Amidase-Aktivität als auch für die bakterizide Wirkung von PGLYRP-1 wird Zink benötigt. Die verstärkte Expression der Nod-Proteine könnte mit der erhöhten Expression der PGLYRPs und der Bereitstellung von Nod-Liganden zusammenhängen.





## 5. Diskussion

Zu den entscheidenden wissenschaftlichen Erfolgen des 20. Jahrhunderts gehörten die Identifizierung von antibiotisch wirksamen Stoffen sowie die Entwicklung von Antibiotikatherapien. Allerdings sind mit den Jahren einige Probleme entstanden, die den anfänglich großen Nutzen mindern und Zweifel daran aufkommen lassen, welchen Nutzen Antibiotika im 21. Jahrhundert haben werden. Es haben sich Pathogene entwickelt, die resistent gegen einzelne und in der Folge auch gegen mehrere Antibiotika sind. In der Nutztierzucht wurden Antibiotika präventiv, als Wachstumsförderer und zur Behandlung von Infektionserkrankungen eingesetzt [1, 756]. Die Verwendung von hohen Antibiotika-Mengen in der Nutztierzucht führte zur Entstehung von Bakterien, die gegenüber Antibiotika resistent sind [1, 757]. Daneben spielt der Transfer von Resistenzgenen zwischen Bakterien eine große Rolle. Aus diesen Gründen wurde im Jahr 2006 die Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer europaweit verboten. Alternativen für Antibiotika sind probiotische Mikroorganismen, aber auch die Verwendung von Zink als Futterzusatzstoff.

Das gastrointestinale Pathogen *S. Typhimurium* wurde sowohl *in vivo* (*S. Typhimurium* DT104) als auch *in vitro* (*S. Typhimurium* SL1344) als Infektionsmodell verwendet. Infektionen mit *Salmonella* spp. sind eine der wichtigsten Ursachen für Gastroenteritis beim Menschen [758]. Obwohl die Fallzahlen insgesamt sinken, traten 2010 in der EU laut EFSA (European Food Safety Authority) 99.020 Fälle auf, das sind etwa 21,5 Fälle/100.000 Einwohner [759]. Dabei dominierten *S. Enteritidis* (ca. 45 %) und *S. Typhimurium* (ca. 22 %) [759]. Der Konsum von kontaminiertem Schweinefleisch bzw. Schweinefleisch-Produkten gilt in 20 % der Salmonellosen beim Menschen als Infektionsquelle [760]. Dies macht deutlich, dass Fleisch bzw. Fleischprodukte weiterhin als potentielle Quelle von Infektionen für den Menschen angesehen werden müssen. *Salmonella* Serovar Typhimurium, vor allem Typ DT104, ist der am häufigsten aus Schweinen isolierte *Salmonella*-Serotyp, der außerdem aufgrund seiner Multiresistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika von Bedeutung ist.

### 5.1. Probiotika – *E. faecium* SF68

Probiotika müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, um sie von den herkömmlichen Bakterienstämmen unterscheiden zu können. Sie müssen natürliche, apathogene Bestandteile der intestinalen Flora sein, eine Magen- und Gallensalzresistenz besitzen, über eine hohe Anheftungsfähigkeit an das Darmepithel verfügen sowie eine gut dokumentierte Wirksamkeit und Sicherheit nachweisen können [14, 761]. Den Probiotika werden zahlreiche positive Effekte zugeschrieben. Dazu gehören eine verstärkte Immunantwort, das Ausbalancieren der Mikroflora des Darms, die Behandlung von Durchfallerkrankungen verschiedener Ursache sowie die Hemmung der Vermehrung und Translokation von pathogenen Keimen durch die Mukosa. In dieser Studie wurde als Probiotikum

*Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415, Cyclatin<sup>®</sup>) eingesetzt. Für diesen Stamm konnten über die Vorbeugung von Antibiotika-assoziiertes Diarrhoe, einer verringerten Übertragungsrate von *Chlamydia* vom Muttertier auf das Ferkel bis hin zur Reduktion der pathogenen Bakterienlast in den Ferkeln viele positive Wirkungen bei der Anwendung in der Nutztierzucht gezeigt werden [19–21, 475]. Allerdings ist der genaue Wirkungsmechanismus von *E. faecium* SF68 bislang kaum aufgeklärt. Allgemein wird bei probiotischen Mikroorganismen davon ausgegangen, dass der „gesundheitsfördernde Effekt“ auf viele Faktoren zurückgeht. Dabei werden einerseits Wirkungen des Probiotikums auf den Wirt, insbesondere auf das darmassoziierte Immunsystem und die Mukosa betrachtet, und andererseits die direkte bzw. indirekte Wirkung auf pathogene Mikroorganismen im Darm. Einige Effekte von *E. faecium* SF68 auf die Immunantwort im Schwein wurden schon beschrieben [20, 733, 738]. Des Weiteren ist bekannt, dass durch die Produktion von Milchsäure und Wasserstoffperoxid das Milieu im Darm verändert wird, wodurch die Anzahl pathogener Keime reduziert wird [384]. Neben diesen Stoffwechselmetaboliten produzieren *E. faecium* SF68 auch antimikrobiell wirksame Substanzen. Im Jahr 1949 berichteten Sherwood *et al.* über einen  $\beta$ -hämolytischen Gruppe D Streptokokken, welcher das Wachstum anderer Bakterien inhibiert. In den folgenden Jahren konnten andere Studien den gleichen Effekt beobachten [466, 762]. Für die beiden Aktivitäten (hämolytische und bakteriozide Aktivität) ist eine einzelne bifunktionelle Komponente verantwortlich, die vorerst als Zytolysin bezeichnet wurde, und später als Bakteriozin [763, 764]. Bakteriozine sind bakteriell produzierte Peptide, die eine bakterizide Wirkung gegenüber anderen Bakterien haben und gegen die der produzierende Mikroorganismus spezifische Immunmechanismen entwickelt hat [765]. Viele Bakteriozine haben eine hohe Spezifität gegenüber klinisch relevanten pathogenen Keimen (inklusive Antibiotika-resistenten Stämmen), wirken anders als Chemotherapeutika und sind stabil [765]. Dementsprechend sind sie als Alternative zu den traditionellen Antibiotika im Gespräch und Gegenstand vieler Studien. Eine Vielzahl von Bakteriozinen aus Enterokokken konnte über die Jahre aufgereinigt und genetisch charakterisiert werden [766]. Die meisten davon wurden aus *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* isoliert [766]. Enterozin A war das erste vollständig charakterisierte Bakteriozin und konnte hauptsächlich in *E. faecium* (z. B. auch *E. faecium* DO/TX0016) gefunden werden [766]. Es konnte gezeigt werden, dass viele Stämme drei oder vier Bakteriozine produzieren [767, 768]. Studien konnten eine signifikante Inhibierung von *Listeria monocytogenes* und enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) durch den Bakteriozinproduzierenden *Lactobacillus casei* Stamm LAFTI L26 beobachten [769, 770]. Auch Bakteriozine von Enterokokken haben einen starken inhibitorischen Effekt auf die grampositiven *Listeria monocytogenes* [771, 772]. Daneben konnte eine verkürzte Dauer von Rotavirus-bedingten Durchfallerkrankungen gezeigt werden, die vermutlich auf der Bakteriozin-Produktion von einigen *Lactobacillus*-Stämmen beruht [773]. Außerdem konnten

Casey *et al.* (2007) beobachten, dass ein Probiotika-Mix aus 5 verschiedenen Stämmen eine *S. Typhimurium*-induzierte Diarrhoe in Schweinen kontrollieren konnte. Dabei dominierte der einzige Bakteriozin-produzierende Stamm (*L. salivarius* DPC 6005) über die anderen [355]. Ein Großteil der Enterozine ist nur gegenüber grampositiven Bakterien aktiv. Die Herausforderung bei der Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien geht darauf zurück, dass das entsprechende Enterozin zunächst über die äußere und in manchen Fällen auch die innere Membran transportiert werden muss. Die Enterozine, denen dies gelingt, wirken auf den DNA-, RNA- und Protein-Metabolismus [774]. Kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein Enterozin von *E. faecium* NCIM5363 synergistisch mit dem Enzym Lipase auf gramnegative Bakterien wirkt [775]. Insgesamt werden allerdings hauptsächlich die Wirkungen auf pathogene Bakterien beschrieben, es gibt kaum Studien, die sich mit der Wirkung der Enterozine auf Zellen in Kultur beschäftigen.

*E. faecium* SF68 wird hauptsächlich bei Durchfallerkrankungen und Darmentzündungen, die sowohl durch eine Antibiotika-Gabe als auch durch eine bakterielle Infektion ausgelöst werden können, eingesetzt [776]. Das Charakteristikum einer akuten Durchfallerkrankung oder Enteritis ist eine intestinale Entzündung. Dies impliziert, dass ein entscheidender Effekt von *E. faecium* SF68 bei diesem Anwendungshintergrund eine anti-inflammatorische Wirkung ist. Insgesamt wurde *E. faecium* SF68 in der Vergangenheit hauptsächlich zu therapeutischen Zwecken eingesetzt (z. B. Enteritis). Dementsprechend ist eine präventive Behandlung mit dem Probiotikum fragwürdig, solange der Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt ist.

Obwohl schon in zwei unabhängigen Fütterungsstudien mit Sauen und Ferkeln gezeigt werden konnte, dass das Probiotikum *E. faecium* SF68 keinen „gesundheitsfördernden“ Effekt bei einer Salmonelleninfektion hat und im Gegenteil zu einer erhöhten Bakterienlast führt [22, 482], konnten auch schon einige positive Wirkungen von probiotischen Mikroorganismen beobachtet werden [355, 396, 418]. In dieser Dissertation stand die weitere Untersuchung der Wirkmechanismen von *Enterococcus faecium* SF68 auf die angeborene Immunantwort im Vordergrund. Dazu wurde einerseits *in vivo* untersucht, welchen Einfluss eine Fütterung des Probiotikums auf die Genexpression immunologisch relevanter Gene hat und weitergehend wie sich diese möglichen Effekte auf eine Infektion mit enteropathogenen Salmonellen auswirken. Andererseits wurde *in vitro* die Wirkung von *E. faecium* SF68 auf den zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B untersucht. Dabei wurden nicht nur intakte Bakterien, sondern auch durch Gentamycin abgetötete und zellfreie Bakterienlysate eingesetzt.

### **5.2. *E. faecium* SF68-Tierversuche**

In dieser Arbeit wurde durch zwei aufeinanderfolgende Tierversuche die Wirkungsweise von *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) als Futterzusatzstoff untersucht. Dabei wurde zunächst ein

Fütterungsversuch durchgeführt und im Anschluss daran die Wirkung des Probiotikums auf eine Infektion mit enteropathogenen Salmonellen überprüft (*Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch). In früheren Untersuchungen mit Schweinen konnte gezeigt werden, dass die mit *E. faecium* SF68-gefütterten Tiere über eine reduzierte Population an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe verfügen [20, 777]. Mafamane *et al.* (2011) haben außerdem gezeigt, dass aufgereinigte Blutmonozyten (PBMCs) aus *E. faecium*-gefütterten Absetzferkeln, die mit *Salmonella* infiziert wurden, *in vitro* eine verringerte Zytotoxizität gegenüber *Salmonella*-infizierten Darmepithelzellen aufwiesen [738]. Daneben konnte mit Hilfe von Proliferationsassays unter Verwendung von aufgereinigten PBMCs die Proliferation gegenüber *Salmonella*-Antigenen aus Blutproben von abgesetzten Ferkeln aus der Kontroll- und der *E. faecium* SF68-Gruppe während einer Salmonelleninfektion beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Versuche ließen darauf schließen, dass die mit dem Probiotikum-gefütterten Ferkel *post infectionem* eine verzögerte Proliferation als Antwort auf die *Salmonella*-Antigene hatten [744]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnte einerseits eine insgesamt reduzierte Population von antwortenden Immunzellen sein, andererseits aber auch eine Inhibierung der Aktivierung der Immunzellen. Allerdings haben Untersuchungen der Immunzellpopulation in PBMC-Aufreinigungen aus derselben challenge Studie mit *S. Typhimurium* DT104 keine signifikanten Unterschiede zum Zeitpunkt der Infektion zeigen können [738]. Dementsprechend scheinen die Wirkungen der *E. faecium* SF68 auf die Funktion oder die Regulation der Immunzellpopulationen zurückzugehen. Um genauer zu untersuchen, welche Immunparameter in den Ferkeln durch das Probiotikum beeinflusst werden, wurden die relativen Genexpressionsraten (qRT-PCR) sowohl von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-8, IL-10) als auch die des ko-stimulatorischen Proteins CD86 (T-Zell Aktivierung) und die des inhibitorischen Proteins CTLA4 (T-Zell-Anergie) untersucht. Dabei wurden die Genexpressionsmuster in den *E. faecium* SF68-gefütterten Tieren mit denen der Kontrolltiere verglichen und Unterschiede aufgezeigt. In der Langzeit-Fütterungsstudie mit Sauen und Ferkeln konnte eine inflammatorische Immunantwort auf geringem Level in intestinalen Geweben während der Periode vor dem Absetzen (im Alter von 12 und 26 Tagen *post partum*) beobachtet werden. Diese ist charakterisiert durch eine erhöhte Genexpressionsrate des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8/CXCL8 (Abbildung 8). Nach dem Absetzen konnte ein Wechsel hin zu einer anti-inflammatorisch ausgerichteten Immunantwort detektiert werden, welche durch signifikant reduzierte Expressionen von IL-8 und CD86 in den ilealen Peyer'schen Platten der Probiotika-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren sichtbar wird (Abbildung 8 und Abbildung 11). Insgesamt scheint es eine altersabhängige Expression von IL-8 zu geben, bei der das Absetzen der Ferkel eine wichtige Rolle spielt. Neben den reduzierten Expressionsraten von IL-8 und CD86 würde man bei einer anti-inflammatorischen Immunantwort eine erhöhte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erwarten. Genau das Gegenteil trat

ein. Es konnte in der *E. faecium* SF68-Gruppe ebenfalls eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduzierte Expression von IL-10 detektiert werden (Abbildung 9). Dementsprechend scheint es einen weiteren inhibitorischen Effekt auf die Expression immunassoziierter Gene zu geben. Kooperationspartner innerhalb des Sonderforschungsbereiches 852 konnten mit Proben aus demselben Fütterungsversuch zeigen, dass die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 im Blutserum in beiden Gruppen 12 Tage *post partum* zwar gleich, in beiden Gruppen tendenziell erhöht, die Blutspiegel des anti-inflammatorischen TGF- $\beta$  in der Probiotika-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe allerdings erhöht waren [744]. Daneben war das pro-inflammatorische IFN- $\gamma$  während der Periode vor dem Absetzen in der Probiotika-Gruppe im Serum nicht nachweisbar, wohingegen die Konzentration in der Kontrollgruppe tendenziell verstärkt war, was übereinstimmend mit den Werten von IL-8 und IL-6 war. IFN- $\gamma$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches essentiell für die angeborene als auch für die adaptive Immunantwort ist. Es wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch von natürlichen Killerzellen (NK) produziert. Demgegenüber steht das anti-inflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ , welches als negativer Regulator auf die Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen und NK wirkt [778–781]. TGF- $\beta$  ist daneben an der Reduktion der Population von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt. Zusammen mit IL-6 ist TGF- $\beta$  an der Inhibierung der IFN- $\gamma$ -Produktion durch pro-inflammatorische T-Zellen beteiligt [779, 780, 782]. Eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$  stellt dementsprechend eine Erklärung für die Abwesenheit von IFN- $\gamma$  in den Probiotika-Ferkeln dar. Die erhöhten Konzentrationen von TGF- $\beta$  in den Probiotika-Ferkeln zeigen des Weiteren den Übergang zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort an, wie sie kurz nach dem Absetzen beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse scheinen insgesamt auf eine initiale inflammatorische Antwort, gefolgt von einem Wechsel hin zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort und auf eine immunsupprimierende T-Zellpopulation im intestinalen Gewebe der Probiotika-Gruppe hinzudeuten. Kreuzer *et al.* (2012) konnten in einer Untersuchung mit Proben aus demselben *E. faecium* SF68-Fütterungsversuch tatsächlich erhöhte Populationen von CD8 $\beta$ <sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen im Blut von Ferkeln im Alter von 12 Tagen *post partum* zeigen [733]. Im Gegensatz dazu war die Population von regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>, definiert als CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-dim</sup>CD25<sup>high</sup>) in den ilealen Peyer'schen Platten zu diesem Zeitpunkt geringer als die in der Kontrollgruppe [733]. Nach dem Absetzen stieg die Population von T<sub>regs</sub> in der Probiotika-Gruppe an. Eine ähnliche Tendenz konnte auch in den ilealen mesenterialen Lymphknoten beobachtet werden [733]. Kreuzer *et al.* konnten einen protektiven Effekt von *E. faecium* SF68 gegenüber einer Rotavirus A- und Astrovirus-Infektionen zeigen. Der Mechanismus geht wahrscheinlich auf eine frühe Immunstimulierung durch das Probiotikum und damit auf eine zeitige Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zurück [733]. Die Ausscheidung der Rotaviren trat in der

Probiotika-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erst zu einem späteren Zeitpunkt auf. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Ferkel in der Phase vor dem Absetzen nur sporadisch *E. faecium* SF68 aufnehmen, was zu einer Immunstimulierung auf niedrigem Niveau führt und zusätzlich noch durch die Sauenmilch geschützt sind. Nach dem Absetzen steht nur noch Futter mit *E. faecium* SF68 zur Verfügung. Die Aufnahme dieser großen Menge des Probiotikums führt wiederum zu einer (lokalen) Immunsuppression. Dieser immunsuppressive Effekt begünstigt die Ausbreitung der Rotaviren und erklärt auch die verzögerte Ausscheidung in der Probiotika-Gruppe. Dementsprechend scheint der Zeitpunkt (vor/nach dem Absetzen) eine entscheidende Rolle zu spielen.

Insgesamt war es aufgrund der Unterschiede von Tier zu Tier (z. B. Größe, Gewicht, Futterraufnahme) schwierig, statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Vor allem bei den Ferkeln in der Periode vor dem Absetzen (im Alter von 12 und 26 Tagen) war die Futterraufnahme und damit die Aufnahme von *E. faecium* SF68 nicht kontrollierbar, vermutlich aber sehr unregelmäßig. Dies erschwert es, gerade in dieser Periode eine statistische Signifikanz zu erhalten. Die verwendete Anzahl der Tiere je Gruppe spielte dabei auch eine Rolle. Während des *E. faecium* SF68-Fütterungsversuches wurden nur sechs Tiere je Gruppe und Zeitpunkt eingesetzt. Trotzdem deuten die Ergebnisse dieser Dissertation zusammen mit weiteren Ergebnissen aus demselben Fütterungsversuch [733] darauf hin, dass das Probiotikum *E. faecium* SF68 in jungen Ferkeln vor dem Absetzen zu einer initialen inflammatorischen Reaktion führt. Obwohl das Probiotikum zur endogenen Mikroflora gehört, löst es tendenziell eine erhöhte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 in Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) sowie den mesenterialen Lymphknoten, 12 Tage und 26 Tage *post partum*, aus. In Studien konnte diesbezüglich schon gezeigt werden, dass es bei neu in die Mikroflora des Gastrointestinaltrakts eingeführten Bakterienspezies zu einer pro-inflammatorischen Antwort kommt. Beispielsweise konnte in einem Modell mit keimfreien Mäusen bei einer Behandlung mit normaler fäkaler Flora und den entsprechenden Antigenen eine initiale pro-inflammatorische Immunantwort, charakterisiert durch die erhöhte Ausschüttung von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17), beobachtet werden [783]. Es kam zu einer vorübergehenden Darmentzündung, welche durch eine nachfolgende anti-inflammatorische Immunantwort (IL-10, IL-4) behoben wird [783]. Diese initiale inflammatorische Immunantwort könnte auf einen Mangel an Toleranz gegenüber den bakteriellen Antigenen in den Saugferkeln hindeuten. Außerdem könnten kommensale Mikroorganismen durch die intestinale Barriere gedrunken sein und danach lokal zu einer Immunreaktion geführt haben. Dabei könnten Antikörper, die über die Kolostralmilch aufgenommen wurden, ebenfalls eine Rolle spielen. Die kaum veränderte Genexpression von CTLA4 in den Peyer'schen Platten und den mesenterialen Lymphknoten, die frühe Hochregulierung der TGF- $\beta$ -Expression (12 und 26 Tage *p. p.*) begleitet von einer verzögerten Proliferationsantwort der PBMCs sowie die signifikant



reduzierte Expression von IL-8 und IL-10 nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) in den Probiotika-Tieren deutet allerdings nur auf kurzzeitige initiale inflammatorische Immunantwort und vor allem auf eine nachfolgende Herabregulierung der Immunantwort hin. Eine weitere interessante Beobachtung während des Fütterungsversuches ist die, im Gegensatz zur tendenziell leicht erhöhten Expression in den Peyer'schen Platten, signifikant verringerte Genexpression von IL-8 in der Milz der Probiotika-Tiere zum frühesten Zeitpunkt (12 Tage *p. p.*, Abbildung 8). Swirski *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Milz das größte Reservoir von undifferenzierten Monozyten des Immunsystems beherbergt [784]. Dieses Monozyten-Reservoir wird zur Regulierung von Entzündungsreaktionen eingesetzt und die Monozyten können zum Ort der Infektion rekrutiert werden [784]. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte IL-8 Genexpression in der Milz wäre ein Auswandern der Monozyten aus der Milz an den Ort der „Infektion“, in diesem Fall ausgelöst durch das Probiotikum, was insgesamt zu einer geringeren Population von IL-8-produzierenden Zellen in der Milz führen würde.

Nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) sind die Ferkel kontinuierlich einer hohen Konzentration von *E. faecium* SF68 in ihrem Futter ausgesetzt, was möglicherweise die anti-inflammatorische Immunantwort verstärkt. Die Genexpressionen von IL-8, CD86 und IL-10 sind signifikant reduziert, die Expression des T-Zell-inhibitorischen Moleküls CTLA4 scheint dagegen kaum beeinflusst zu werden (Abbildung 10). Interessant war außerdem, dass 34 Tage *p. p.* in der Milz von den Probiotika-Tieren sowohl eine erhöhte Genexpression von IL-8, als auch des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 gefunden werden konnte. Dies könnte auf eine Aktivierung von Immunzellpopulationen in der Milz zu diesem Zeitpunkt nach dem Absetzen hindeuten.

Beim *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch konnte eine verspätete oder reduzierte lokale (ileale Peyer'sche Platten) inflammatorische Immunantwort, charakterisiert durch eine reduzierte Expression von IL-8 und tendenziell erhöhte Werte für IL-10 und CTLA4, zwei Tage *p. i.* beobachtet werden (Abbildung 16 – Abbildung 18). Dagegen konnte zum gleichen Zeitpunkt in den jejunalen mLN eine signifikant erhöhte Genexpression von IL-8 (bis zu 4-fach) detektiert werden. Außerdem konnte im selben Tierversuch eine erhöhte Pathogenlast, vor allem in den Lymphgeweben, nachgewiesen werden, sodass in dieser Hinsicht kein gesundheitsfördernder Effekt von *E. faecium* SF68 bei einer Infektion von Ferkeln mit *S. Typhimurium* DT104 gezeigt werden konnte [482]. Auch in einer früheren Tierversuchsstudie konnte eine erhöhte Bakterienlast im Kot und in verschiedenen Organen der *E. faecium* SF68-gefütterten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden werden [22]. Diese Ergebnisse stellen die Verwendung von *E. faecium* SF68 zur Prävention gegenüber bakteriellen Infektionen in Frage. Die erhöhten IL-8 Genexpressionswerte in den mesenterialen Lymphknoten weisen ebenfalls auf eine höhere Translokation von *Salmonella* über die Darmwand hin. Eine tendenziell reduzierte Genexpression von IL-8 konnte in der

Milz zwei Tage *p. i.* im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden (Abbildung 16). Ob diese reduzierte Expression auf eine verminderte Anzahl von IL-8-exprimierenden Zellen oder auf ein Auswandern dieser Zellen zum Ort der Infektion zurückgeht, ist nicht eindeutig geklärt. Allerdings könnten die erhöhten Expressionsraten von IL-8 und CD86 in den jeunalen mLN auf ein Auswandern von Monozyten aus der Milz hindeuten. Dies stimmt außerdem mit den höheren bakteriellen Belastungen in diesen Organen überein [482]. Insgesamt deuten die Ergebnisse und Beobachtungen sowohl des Fütterungsversuches als auch des challenge Versuches darauf hin, dass *E. faecium* SF68 eine lokale anti-inflammatorische bzw. immunsuppressive Immunantwort in Geweben der intestinalen Wand auslöst und so kurzzeitig einen Vorteil für die enteropathogenen Salmonellen schafft. Der Wirt muss zunächst die verbliebene anti-inflammatorische Immunantwort überwinden, um auf die Infektion mit *Salmonella* reagieren zu können. Es kommt dementsprechend zu einer verzögerten Immunantwort. Diese Verzögerung schafft ein Zeitfenster für die Salmonellen und führt zu einer Verbreitung der Bakterien. Dies würde mit den Ergebnissen aus den zwei unabhängigen *S. Typhimurium* DT104-Studien übereinstimmen, bei denen in den Probiotika-Tieren eine erhöhte Bakterienlast gefunden wurde [22, 482]. Außerdem konnte, wie schon beschrieben, kurze Zeit nach der Infektion (3 h, 1 und 3 Tage) eine signifikant reduzierte Proliferation von PBMCs der Probiotika-Tiere als Antwort auf eine Stimulation mit *Salmonella*-Antigenen detektiert werden, was auf eine Fehlregulierung der Immunantwort, möglicherweise auch auf eine T-Zell Anergie hindeutet [744, 785].

Zusammenfassend deuten die Beobachtungen und Ergebnisse aus den Tierversuchen mit *E. faecium* SF68 (Fütterungsversuch und *Salmonella* challenge-Versuch) darauf hin, dass eine anhaltende Fütterung von Sauen und ihren Ferkeln mit dem probiotischen Stamm *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) zu einer anti-inflammatorischen bzw. immunsuppressiven Immunantwort in den Ferkeln führt, welche vor allem in der Phase nach dem Absetzen sichtbar wird. Dies hängt vielleicht auch mit der Abwesenheit der Kolostralmilch und ihrer nach dem Absetzen nicht länger andauernden protektiven Wirkung zusammen. Eine anti-inflammatorische Wirkung von *E. faecium* SF68 könnte auch verschiedene Beobachtungen erklären, z. B. die reduzierte bzw. verzögerte Proliferationsantwort der PBMCs als Antwort auf *Salmonella*-Antigene [744], die erhöhten Bakterienlasten, die im *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch detektiert wurden, aber auch die Veränderungen bei den Immunzellpopulationen nach Fütterung der Tiere mit *E. faecium* SF68.

Für die Peptidoglykan-Sensoren (Nod-Proteine, PGLYRPs) konnte ein enger Zusammenhang zwischen den einzelnen Genen beobachtet werden. Für alle untersuchten Gene (Nod1, Nod2, PGLYRP-1, -2 und -2B) konnte in der Periode vor dem Absetzen (12 Tage *p. p.* und vor allem 26 Tage *p. p.*; Abbildung 12 – Abbildung 15) eine leicht verstärkte Genexpression beobachtet werden, was wahrscheinlich auf eine aktivierende Wirkung von *E. faecium* SF68, welcher neu in die Mikroflora eingeführt wird, zurückgeht. Die Expression

von PGLYRP-2 (2A und 2B) ist in Epithelzellen sowohl durch bakterielle Antigene als auch durch Zytokine induzierbar [181, 187–190]. Dagegen wird PGLYRP-1 in polymorphonukleären Leukozyten (PMN) und M-Zellen (Peyer'sche Platten) exprimiert [173, 191]. Die Transkription von PGLYRP-1 ist von NF- $\kappa$ B abhängig. Lang *et al.* (2008) zeigten, dass die Expression von PGLYRP-1 RelA-abhängig, also abhängig von NF- $\kappa$ B ist [786]. Die Aktivierung von Neutrophilen durch pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ ), bakterielle Komponenten (LPS) oder Peptide (Angiotensin II) ist verbunden mit der Aktivierung des zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [787]. Da PGLYRP-1 in PMNs exprimiert wird, könnte dementsprechend die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression von PGLYRP-1, welches über eine bakterizide Wirkung verfügt, mit zum Repertoire von aktivierten Neutrophilen gehören. Bezüglich der Expression von Nod1 und Nod2 wurde von einigen Wissenschaftlern berichtet, dass MDP der Hauptstimulus für eine Expression der Nod-Proteine ist [110, 111, 788, 789]. Dabei spielt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle für die Expression von Nod2 (NF- $\kappa$ B-Zielgen). Eine NF- $\kappa$ B-Bindungssequenz befindet sich ca. 2,3 kb stromaufwärts des Nod2-Gens, was darauf schließen lässt, dass eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu einer Expression von Nod2 führt [790]. Für das *Nod1*-Gen konnte keine solche NF- $\kappa$ B-Bindungssequenz gefunden werden. Allerdings konnten Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Endotoxine zu einer Nod1-Expression führt [791]. Außerdem wurde berichtet, dass die Expression von Nod2 durch pro-inflammatorische Zytokine wie z. B. TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimuliert werden kann [792]. Takahashi *et al.* (2005) konnten weitergehend eine verstärkte Expression von Nod1 und Nod2 nach Stimulierung durch LPS, LTA und PGN beobachten [793]. Dies unterstützt die Hypothese, dass auch die Expression von Nod1 direkt oder indirekt von NF- $\kappa$ B reguliert wird. Es konnte eine biphasische Hochregulierung der Expression nach Stimulierung mit Endotoxinen oder LPS gefunden werden [793]. Zunächst kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch TLR-Signaling. Diese Aktivierung löst eine Expression von Zielgenen aus, die für pro-inflammatorische Zytokine sowie Nod-Proteine codieren. Im Anschluss daran können die inflammatorischen Zytokine autokrin die eigenen Zellen stimulieren und so zu einer zweiten Hochregulierung der Nod-Expression führen [793]. Tatsächlich konnte in mehreren Studien eine Parallele zwischen der TLR-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) gefunden werden [794, 795].

Dies alles zusammengenommen zeigt, dass die Umgebung bzw. die Umstände eine entscheidende Rolle dafür spielen, wie das Immunsystem auf *E. faecium* SF68 reagiert.

Es kommt sowohl bei der sporadischen Aufnahme des Probiotikums (z. B. vor dem Absetzen der Ferkel), als auch bei einer kontinuierlichen Aufnahme (z. B. nach dem Absetzen der Ferkel) zu einer Immunsuppression. Wahrscheinlich ist der Mechanismus für beide Effekte identisch. Ein wichtiger Faktor ist hier auch der Schutz durch die Aufnahme der Sauenmilch. Bei unregelmäßiger Aufnahme des Probiotikums oder zusammen mit Sauenmilch ist die

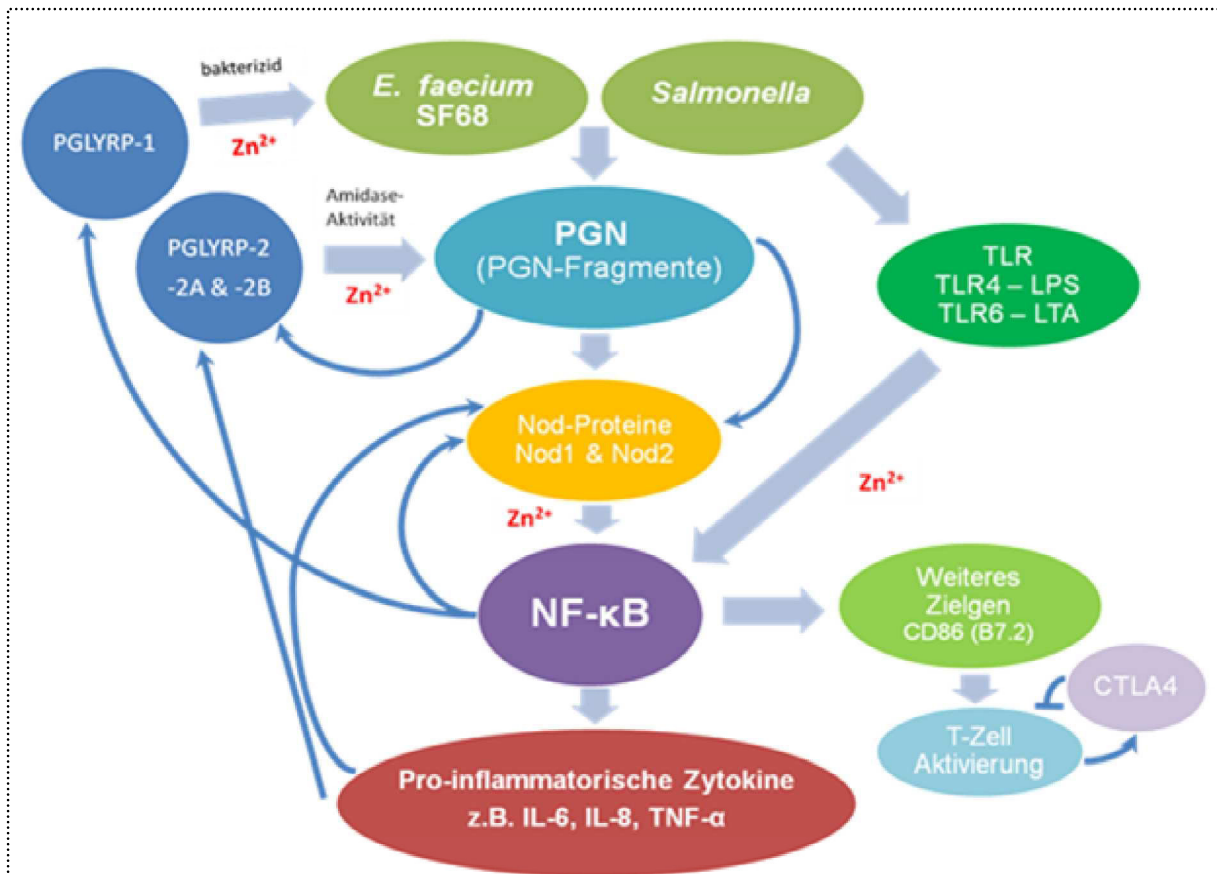
Immunsuppression nur ausreichend für eine leicht erhöhte Anzahl von Darmbakterien, die durch die Darmwand bzw. die Peyer'schen Platten eindringen. Wird das Probiotikum kontinuierlich durch das Futter aufgenommen, so kommt es zu einer anhaltenden Immunsuppression, mit allen daraus resultierenden Folgen.

Die Aufnahme von kleinen Mengen des Probiotikums führt einerseits zur Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der eine aktivierende Wirkung auf die Expression der Nod-Proteine und von PGLYRP-1 hat. Andererseits kommt es, vermutlich als Folge des erhöhten Eindringens von Bakterien oder LPS, auch zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (erhöhte Expression von IL-8), die wiederum selbst eine stimulierende Wirkung auf die Expression der Nod-Proteine (zumindest für Nod2 nachgewiesen) hat. Außerdem können sowohl Zytokine, als auch bakterielle Antigene von *E. faecium* SF68 (PGN-Fragmente) die Expression von PGLYRP-2A und -2B anregen. Die Expression von Nod1 und Nod2 kann daneben auch durch PGN-Fragmente stimuliert werden, welche beispielsweise auch durch die Muramidase-Aktivität von PGLYRP-2B (MDP, Nod1-Ligand) bereitgestellt werden können. Kurz nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) konnte für alle untersuchten Gene in den Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) eine signifikant erniedrigte Expression beobachtet werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen für das pro-inflammatorische Zytokin IL-8 überein. Weitere Hinweise für eine aktivierte Immunantwort vor dem Absetzen, nach erstem Kontakt des Immunsystems mit *E. faecium* SF68, lieferten die Ergebnisse für die Genexpression von PGLYRP-1 im Blut (Abbildung 12). Dort konnten erhöhte Expressionsraten 12 Tage *p. p.* detektiert werden, diese haben sich allerdings im Alter von 26 Tagen wieder dem Wert, welcher in den Kontrolltieren gesehen wurde, angenähert. Außerdem konnte in der Leber, welche PGLYRP-2 (2A und 2B) konstitutiv exprimiert, eine signifikant erhöhte Genexpression von PGLYRP-2B 26 Tage *p. p.* nachgewiesen werden (Abbildung 14). Direkt nach dem Absetzen konnte zunächst eine anti-inflammatorische Immunantwort detektiert werden. Auch hier sind erneut die Zusammenhänge der einzelnen Gene zu erkennen. Eine deutlich reduzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowie der Zielgene (inflammatorische Zytokine) führte ebenfalls zu einer verringerten Expression der PGLYRPs und der Nod-Proteine. Bezüglich der Stimulierung durch bakterielle Antigene (*E. faecium* SF68) scheint eine Herabregulierung des Immunsystems ähnlich einer tolerogenen Immunreaktion stattgefunden zu haben. Die anti-inflammatorisch ausgerichtete Phase scheint mit Erreichen eines Alters der Ferkel von 54 Tagen überwunden zu sein (leicht erhöhte Genexpressionsraten von IL-8, CD86, Nod1, Nod2, PGLYRP-1, -2A, -2B; Abbildung 12 – Abbildung 15). Diese leicht inflammatorische Immunantwort könnte eine Reaktion auf kommensale Mikroorganismen sein, die infolge der anti-inflammatorischen Ausrichtung des Immunsystems 34 Tage *p. p.* über die intestinale Barriere gedrungen sind und nun eine lokale Immunreaktion auslösen.

Wie auch schon für die Genexpressionsraten von IL-8 und CD86 beobachtet, konnte in den Probiotika-Tieren in der Milz auch für Nod1 und Nod2 sowie PGLYRP-2B eine deutlich erhöhte Expressionsrate nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) gefunden werden, was einerseits für eine Aktivierung von Immunzellen in der Milz spricht, andererseits aber auch ein weiteres Mal die enge Verknüpfung der Gene verdeutlicht. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass 54 Tage *p. p.* die Genexpression von PGLYRP-1 in den IlePP sowie den mLN deutlich erhöht war. 34 Tage *p. p.* scheint es zu einer Aktivierung von Immunzellen aus der Milz zu kommen. Diese könnten über den Blutkreislauf in das Zielgewebe, in diesem Fall Gewebe der intestinalen Wand, einwandern und dort (IlePP und mLN) zeigt sich die erhöhte Population von Immunzellen durch die erhöhte Expression von PGLYRP-1 (in PMNs exprimiert). Allerdings wurde 54 Tage *p. p.* nicht nur eine erhöhte Expression von IL-8, CD86, Nod1, Nod2, PGLYRP-2A, -2B und PGLYRP-1 in den IlePP bzw. zum Teil auch in den mLN gefunden, sondern auch eine verstärkte Genexpression von CTLA4, einem Inhibitor der T-Zell-Aktivierung und Marker für die Herabregulierung des Immunsystems (Abbildung 10). Dies könnte ein Hinweis auf eine nachfolgende Inhibierung der T-Zell-Aktivierung, eine T-Zell-Anergie und insgesamt erneut auf eine Herabregulierung des Immunsystems und Rückkehr zum Normalzustand sein.

Im *Salmonella* challenge *E. faecium* SF68-Versuch konnte ein paralleler Verlauf der Genexpression von Nod1, Nod2, PGLYRP-1, PGLYRP-2A und -2B gegenüber IL-8 in den Geweben der intestinalen Wand beobachtet werden (Abbildung 16, Abbildung 20 – Abbildung 22). Es konnte zwei Tage *p. i.* eine reduzierte bzw. verzögerte Immunantwort gefunden werden, welche höchstwahrscheinlich auf die anti-inflammatorische Wirkung von *E. faecium* SF68 kurz nach dem Absetzen zurückgeht. Im Alter von 35 Tagen wurden die Ferkel mit *Salmonella* infiziert. Also zu dem Zeitpunkt, an dem in den Ferkeln das herabregulierte Immunsystem, gekennzeichnet durch reduzierte Expressionsraten von IL-8, CD86, Nod1, Nod2, PGLYRP1, -2A und -2B, gefunden wurden. Die erhöhten Genexpressionsraten von IL-8 zwei Tage *p. i.* in den mLN deuten eine erhöhte Translokation von *Salmonella* an. Weitere Abwehrmoleküle wie z. B. Nod1, Nod2, PGLYRP-1, wurden ebenfalls verstärkt exprimiert. Diese erhöhte Genexpression könnte einerseits auf die Aktivierung durch NF- $\kappa$ B selbst zurückzuführen sein, durch pro-inflammatorische Zytokine oder durch PGN-Fragmente ausgelöst werden, aber auch auf einer synergistischen Wirkung von z. B. LPS (TLR4) und PGN-Fragmenten beruhen.

In Abbildung 75 sind die Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit untersuchten immunrelevanten Molekülen dargestellt.



**Abbildung 75: Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit untersuchten immunrelevanten Molekülen.** Zu den löslichen Peptidoglykan-Sensoren gehören die PGLYRPs. PGLYRP-1 besitzt eine bakterizide Wirkung gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien. PGLYRP-2 (-2A und -2B) hat eine Funktion als N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase. Dies führt zum Abbau von PGN, u. a. von DAP (Nod2-Ligand) und zur Produktion von meso-DAP (Nod1-Ligand). Sowohl die bakterizide Wirkung von PGLYRP-1, als auch die Muramidase-Aktivität von PGLYRP-2 ist zinkabhängig. Zu den zytosolischen Peptidoglykan-Sensoren gehören die Nod-Proteine (Nod1 und Nod2). Die Ligandenbindung führt über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Expression der Zielgene, z. B. der pro-inflammatorischen Zytokine/Chemokine. Auch das TLR-Signaling führt nach Bindung des jeweiligen Liganden (z. B. *Salmonella*: LPS – TLR4; *E. faecium* SF68: LTA – TLR6) zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Expression von inflammatorischen Zytokinen/Chemokinen. Zu den weiteren Zielgenen des zentralen Transkriptionsfaktors gehört auch das ko-stimulatorische Molekül CD86 (B7.2), welches zur Aktivierung von T-Zellen führt. Mit der T-Zell-Aktivierung geht auch die Expression des inhibitorischen Moleküls CTLA4 einher. CTLA4 führt zum Ende der Proliferation der T-Zellen und durch die Konkurrenz um Bindungsstellen zu einer reversiblen T-Zell-Anergie. Sowohl der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, als auch die pro-inflammatorischen Zytokine/Chemokine stimulieren die Expression der Nod-Proteine und von PGLYRP-2A/-2B. Außerdem führen PGN-Fragmente zu einer verstärkten Expression der Nod-Proteine und von PGLYRP-2A/-2B. Zinksignale sind für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig. CTLA4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*; DAP: 2,6-Diaminopimelinsäure, Nod: *nucleotide-binding oligomerization domain*; PGLYRPs: *peptidoglycan recognition proteins*; PGN: Peptidoglykan; TLR: *Toll-like receptor*.

### 5.3. NF- $\kappa$ B-Aktivierungsassays und Bakterienlysatversuche

Parallel zu den *In-vivo*-Versuchen wurden permanente porzine intestinale Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnliche Zellen (3D4/31; PLN/C2) verwendet, die chromosomal-integrierte, NF- $\kappa$ B-abhängige Reporterkonstrukte enthalten, um so eine Untersuchung der Effekte des Probiotikums (*E. faecium* SF68, NCIMB 10415), der zellfreien

Lysate von *E. faecium* SF68 oder aber auch von anderen Futterzusatzstoffen (Zink) auf die angeborene Immunantwort in den Wirtszellen zu ermöglichen. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kann durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden (Tabelle 3). Zu diesen Aktivatoren gehören neben Bakterien und bakteriellen Antigenen (LPS, Flagellin, Muramyl-Peptide) auch oxidativer Stress ( $H_2O_2$ ; Ozon) und verschiedene Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18) [206, 215, 216]. Auf der anderen Seite gehören zu den Zielgenen, welche von NF- $\kappa$ B reguliert werden, beispielsweise Zytokine und Chemokine (z. B. IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ ), Immunrezeptoren/Oberflächenrezeptoren (z. B. CD40, PGLYRP-1, Nod2, TLR2), akute Phase-Proteine (z. B.  $\beta$ -Defensin-2) und Proteine, die essentiell für die negative Rückkopplungsschleife sind (z. B. I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2). Insgesamt wurden bis zum heutigen Zeitpunkt über 500 NF- $\kappa$ B-Zielgene identifiziert, wodurch die zentrale Bedeutung des Transkriptionsfaktors verdeutlicht wird (Abbildung 2) [244]. Der Transkriptionsfaktor spielt eine entscheidende Rolle für eine effektive Immunabwehr, aber auch beispielsweise bei Zellproliferationsprozessen [202].

Zunächst wurde die Wirkung von intakten, lebenden *E. faecium* SF68 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) untersucht. Dabei konnte im Vergleich zu der durch eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 ausgelösten Aktivierung des Transkriptionsfaktors eine signifikant geringere Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach 2-, 4- und 6-stündiger Behandlung gefunden werden (Abbildung 23). Die Infektion mit den enteropathogenen Salmonellen führte in beiden untersuchten Zelllinien zu einer mit der Behandlungsdauer kontinuierlich ansteigenden Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dagegen lösten die endogenen *E. faecium* SF68 nur eine geringe, aber dennoch messbare Aktivierung des Transkriptionsfaktors aus. Diese Aktivierung scheint in den IPEC-J2 eher frühzeitig (2 – 4 h) nach der Infektion aufzutreten und nach sechs Stunden wieder zu verschwinden. In den 3D4/31 Makrophagen konnte über sechs Stunden keine solche Abnahme beobachtet werden. Dementsprechend scheinen die probiotischen *E. faecium* SF68 zumindest eine initiale inflammatorische Immunantwort auf niedrigem Level zu induzieren. Kommt eine neue Bakterienspezies in die vorhandene Mikroflora, so konnte schon in anderen Studien gezeigt werden, dass diese eine frühe pro-inflammatorische Immunantwort auf niedrigem Level auslöst [783].

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer zweistündigen Vorbehandlung mit lebenden, intakten *E. faecium* SF68 auf die *Salmonella*-induzierte Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors beobachtet. Hier sollte überprüft werden, ob sich die leichte inflammatorische Immunantwort, die durch *E. faecium* SF68 ausgelöst wird, auf die *Salmonella*-Infektion (Invasionsrate, Persistenz, NF- $\kappa$ B-Aktivierung) auswirkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder in den IPEC-J2 noch in den 3D4/31 bezüglich der Invasionsrate oder der intrazellulären Persistenz von *S. Typhimurium* SL1344 ein signifikanter Unterschied bei einer Vorbehandlung der Zellen mit lebenden *E. faecium* SF68 gefunden werden konnte.

Allerdings konnte in den intestinalen Epithelzellen eine leicht, wenn auch nicht signifikant, erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung 2, 4 und 24 Stunden nach der Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 bei einer *E. faecium* SF68-Vorbehandlung detektiert werden. Diese erhöhten Werte könnten auf die durch die *E. faecium* SF68 bereits leicht pro-inflammatorisch-ausgerichtete Immunantwort zurückgehen. Es könnte also zu einer Summierung gekommen sein. Außerdem könnte die erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf eine synergistische Wirkung des von grampositiven Bakterien stammenden PGN mit dem LPS der gramnegativen Salmonellen hindeuten. Allerdings wurden die *E. faecium* SF68 zum großen Teil durch einen Mediumwechsel bereits vor der Infektion mit *Salmonella* entfernt. Dementsprechend sind nur wenige Bakterien im Medium übrig, die eine derartige synergistische Reaktion tragen könnten. Bei den verwandten *Staphylococcus* spp. konnte eine solche Synergie, um eine insgesamt höhere pro-inflammatorische Reaktion zu erzielen, zwischen grampositiven Zellwandkomponenten (PGN, LTA) und LPS von gramnegativen Bakterien schon *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden [745–748]. In den 3D4/31 Makrophagen konnte nur 24 Stunden *post infectionem* eine deutlich erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den mit *E. faecium* SF68-vorbehandelten Zellen detektiert werden. Zusammenfassend konnte bei einer Behandlung der Zellen mit lebenden *E. faecium* SF68 eine inflammatorische Reaktion auf niedrigem Level beobachtet werden, die sich auch auf eine nachfolgende Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 auswirkt. Hier scheint es, im Gegensatz zu einer Infektion mit *Salmonella* alleine, aufgrund der bereits inflammatorisch-ausgerichteten Immunantwort zu einer Summierung gekommen zu sein, welche durch die erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B angezeigt wird. Ferner kann eine synergistische Wirkung der grampositiven Zellwandkomponenten mit dem LPS der gramnegativen Salmonellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Signifikanzen konnten für diese Ergebnisse allerdings nicht ermittelt werden.

Eine längere Behandlungsdauer der Zellen mit lebenden *E. faecium* SF68 war aufgrund ihrer Milchsäure-Produktion und der darauf begründeten Ansäuerung des Zellkulturmediums nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die längeren Behandlungen mit Gentamycin-abgetöteten oder mittels FastPrep<sup>®</sup>-lysierten *E. faecium* SF68 durchgeführt. In den porzinen (IPEC-J2) und humanen (LoVo) Epithelzellen führte die Behandlung mit intakten, durch Gentamycin abgetöteten *E. faecium* SF68 über 4, 24 und 48 Stunden zu einer 2- (IPEC-J2) bzw. 4,2-fach (LoVo) signifikant erhöhten Aktivierung von NF- $\kappa$ B. In den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 konnte nur nach einer Behandlung über 4 und 24 Stunden eine ebenfalls erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert werden. Erfolgte die Behandlung über 48 Stunden, so war die NF- $\kappa$ B-Aktivierung niedriger als das basale Level in den unbehandelten Zellen. Diese Ergebnisse scheinen in Epithelzellen auf eine doch nicht, wie zunächst angenommen, kurzfristige, sondern längerfristige pro-inflammatorische Stimulierung der Zellen nach Behandlung mit intakten Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68 hinzudeuten. Es kann jedoch auch sein, dass sich diese längerfristige Stimulierung auf die abgetöteten *E. faecium* SF68 bezieht, da



eine Behandlung über viel mehr als sechs Stunden mit den lebenden *E. faecium* SF68 nicht möglich war und so auch kein Vergleich gemacht werden konnte. Daneben steigen die RLU-Werte abhängig von der Behandlungsdauer an. Insgesamt scheinen die *E. faecium* SF68 doch eine stärker immunogene Wirkung in den intestinalen Epithelzellen zu haben, als zunächst angenommen. Bei 3D4/31 konnte nach leichter inflammatorischer Immunantwort nach Behandlung über 4 und 24 Stunden ein Rückgang der Luziferase-Aktivität (48-h-Behandlung) verzeichnet werden. Dies könnte einerseits auf die erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den unbehandelten Zellen (erhöhtes basales Level) zurückzuführen sein, oder aber auch auf eine Herunterregulierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch sich selbst [796]. Eine anti-inflammatorische Ausrichtung der Immunantwort wurde *in vivo* nach langanhaltender Fütterung der Ferkel mit dem probiotischen Futterzusatz kurz nach dem Absetzen (34 Tage *p. p.*) ebenfalls beobachtet. Es könnte also sein, dass die Makrophagen-ähnlichen Zellen früher von der pro- zur anti-inflammatorischen Immunantwort umschalten als die intestinalen Epithelzellen oder aber früher bzw. schneller die NF- $\kappa$ B-Aktivität herunterregulieren.

Eine der Behandlung mit intakten, abgetöteten *E. faecium* SF68 nachfolgende Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 führte nach nur 4-stündiger Vorbehandlung in den IPEC-J2 und LoVo zu einer signifikant erhöhten NF- $\kappa$ B-Aktivierung verglichen mit der Aktivierung, die durch *Salmonella* alleine ausgelöst wurde. Hier scheint es wiederum zu einer Summierung der pro-inflammatorischen Immunantwort oder auch zu einer synergistischen Wirkung gekommen zu sein. Allerdings konnte bei einer längeren *E. faecium* SF68-Vorbehandlung eine signifikant erniedrigte NF- $\kappa$ B-Aktivierung gefunden werden. Dementsprechend scheint die durch *Salmonella* zusätzlich ausgelöste NF- $\kappa$ B-Aktivierung geringer zu sein, als in den Zellen ohne Vorbehandlung. Eine Erklärung hierfür könnte die schon über 24 bzw. 48 Stunden andauernde Aktivierung des inflammatorischen Transkriptionsfaktors sein. Diese könnte dazu führen, dass die Zellen nicht mehr weiter erregbar sind und die durch *Salmonella* induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung deswegen hinter der in den bis jetzt unbehandelten Zellen zurückbleibt. Die negative Rückkopplungsschleife von NF- $\kappa$ B könnte durch die NF- $\kappa$ B-abhängige Resynthese des eigenen Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  eine noch stärkere Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindern [796]. Für diese Inhibierung der weiteren NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte aber auch eine Komponente von *E. faecium* SF68 verantwortlich sein. Da NF- $\kappa$ B diverse Zielgene reguliert, die eine essentielle Bedeutung z. B. bei der Immunantwort oder Zellproliferation haben, ist es essentiell, dass es nicht zu einer dauerhaften Aktivierung des Transkriptionsfaktors kommt. Dementsprechend erfolgt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in normalen Zellen transient und oszillierend [796, 797]. Kommt es durch unterschiedliche molekulare Veränderungen zu einer dauerhaften Aktivierung, so ist dies auch mit einer dysregulierten Zielgenexpression verbunden. Bei vielen Entzündungskrankheiten ist eine lokale, lang andauernde, erhöhte Aktivierung des Transkriptionsfaktors nachgewiesen worden. Beispiele dafür sind eine durch *Helicobacter pylori* ausgelöste Gastritis oder aber

die chronisch-entzündliche Darmerkrankung (IBD) [798, 799]. Es scheint so, als ob in den 3D4/31 Zellen schon nach einer 48-stündigen Behandlung mit intakten, aber Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68 dieser Punkt erreicht ist und es zu einer Inhibierung der weiteren NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt. Dagegen erfolgte diese Inhibierung in den IPEC-J2 erst nach 24-stündiger Behandlung mit *E. faecium* SF68 und nachfolgender *Salmonella*-Infektion. Im nächsten Schritt wurden zellfreie Lysate von *E. faecium* SF68 hergestellt und ihre Wirkung auf die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B untersucht. Die Hypothese war, dass nicht das intakte lebende Probiotikum *per se* verantwortlich für die beobachteten Effekte auf das Immunsystem ist, sondern zelluläre Komponenten. Sie beruht einerseits darauf, dass in verschiedenen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien eine synergistische Wirkung von *Staphylococcus* spp. Zellwandkomponenten und LPS von gramnegativen Bakterien detektiert werden konnte [745–748]. Andererseits konnten weitere interessante Beobachtungen mit sonifiziertem Extrakt von *E. faecalis* gemacht werden. In zwei aufeinanderfolgenden Studien wurde die Wirkung von Ultraschall-behandeltem Extrakt von *E. faecalis* (ATCC 29212) auf humane periphere Blutlymphozyten (HPBLs) untersucht [800, 801]. Dabei wurde zunächst ein irreversibler Zellzyklusarrest von humanen Lymphozyten konzentrationsabhängig nach Behandlung mit sonifiziertem *E. faecalis*(ATCC 29212)-Extrakt beobachtet [800]. Ferner konnten sie im Extrakt ein Polypeptid (60 kDa) identifizieren, welches diesen Zellzyklusarrest und eine reduzierte Proliferation der Lymphozyten auslöst [800]. In der auf diesen Ergebnissen aufbauenden Studie konnte weitergehend eine signifikante Inhibierung der Produktion von IL-2 und IL-4 durch aktivierte (Phytohämmagglutinin, PHA) T-Zellen nach Behandlung der Zellen mit dem sonifizierten Extrakt von *E. faecalis* detektiert werden [801]. Dabei war die Inhibierung abhängig von der Konzentration des Extraktes. Diese Studien zeigen, dass Ultraschall-behandeltes Extrakt von *E. faecalis* (ATCC 29212) die Lymphozyten-Antwort inhibieren kann und somit insgesamt einen immunsupprimierenden Effekt hat [800, 801]. Auch für die Untersuchungen mit zellfreiem Bakterienlysat wurde zunächst eine kurzfristige Behandlung über zwei Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine 2-stündige Behandlung mit zellfreiem Lysat keinen signifikanten Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den drei untersuchten Zelllinien hat. Dies könnte aber auch daran liegen, dass die Behandlungsdauer nicht ausreichend war. Außerdem erfolgte die Messung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erst zwei Stunden nach der Behandlung mit dem Bakterienlysat. Das bedeutet, dass zum Zeitpunkt der Messung die Lysate nicht mehr auf den Zellen waren. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung könnte dementsprechend in dieser Zeit, nach Entfernen der Lysate, wieder zum Normalniveau zurückgekehrt sein. Auch bei einer nachfolgenden Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 hatte die Lysat-Vorbehandlung keinen signifikanten Einfluss. Tendenziell konnte in den IPEC-J2 aber eine leicht erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung 2, 4, und 24 Stunden nach der Salmonelleninfektion detektiert werden. In den Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31;

PLN/C2) war dies ebenfalls zwei und vier Stunden *p. i.* der Fall. Diese erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B würde mit den Ergebnissen für die Versuche mit der 2-stündigen Vorbehandlung der Zellen mit intakten, lebenden *E. faecium* SF68 und anschließender *S. Typhimurium* SL1344-Infektion übereinstimmen. Allerdings konnte bei einer 2-stündigen Lysat-Behandlung der Zellen ohne nachfolgende *S. Typhimurium* SL1344-Infektion kein Hinweis auf eine immunogene Wirkung des Lysates gefunden werden. Trotzdem könnten die Bestandteile der grampositiven Zellwand (schon an Rezeptoren gebundene) zusammen mit LPS aus *Salmonella* synergistisch wirken und so eine höhere Aktivierung von NF- $\kappa$ B erreichen, als eine *Salmonella*-Infektion alleine.

Um eine Annäherung an die *In-vivo*-Situation zu erreichen und einen von der Behandlungsdauer abhängigen Verlauf der Wirkungsweise der zellfreien Lysate von *E. faecium* SF68 zu erhalten, wurde eine längerfristige Behandlung der Zellen über 4, 24 und 48 Stunden untersucht. Hier konnte, wie erwartet, nach einer 4-stündigen Lysat-Behandlung in den IPEC-J2 eine signifikant erhöhte Luziferase-Aktivität als Maß für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B gefunden werden. Diese verstärkte Aktivierungsrate war abhängig von der Konzentration des Lysates ( $10^8$  bzw.  $10^6$  lysierte Bakterien/ml). Je höher die eingesetzte Konzentration des Lysates war, umso höher war auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abbildung 28). Dies zeigt, dass tatsächlich nicht das Bakterium *per se* benötigt wird, um eine immunogene Wirkung in den porzinen intestinalen Epithelzellen zu erzielen, sondern dass bakterielle Komponenten im zellfreien Lysat dafür ausreichen. Interessanterweise zeigte sich bei einer Lysat-Behandlung über 24 Stunden ein anderes Bild. Hier konnte nur für die niedrigere Lysat-Konzentration (MOI = 4,5) eine signifikant erhöhte Aktivierung detektiert werden. Die höhere MOI (MOI = 450) führte erstaunlicherweise zu einer signifikant reduzierten (um ca. 89 %) NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level in den unbehandelten Zellen. Auch eine noch längere Behandlung mit der höheren Konzentration des *E. faecium* SF68-Lysates führt weiterhin zu einer signifikant erniedrigten NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Es scheint hier dementsprechend zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung gekommen zu sein. Die niedrigere Lysat-Konzentration zeigte auch eine deutlich abnehmende Tendenz. Hier konnte nur noch eine mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in den unbehandelten Zellen vergleichbare Aktivierungsrate detektiert werden (Abbildung 28). Dies ist ein Zeichen dafür, dass auch die niedrigere Konzentration nach einer gewissen Behandlungsdauer zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt. In den porzinen Makrophagen (3D4/31) sank schon nach einer 4-stündigen Behandlung mit zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat die NF- $\kappa$ B-Aktivierung konzentrationsabhängig unter das basale Level in den unbehandelten Zellen (Abbildung 29). Eine längere Behandlungsdauer führte ebenfalls konzentrationsabhängig zu einer noch stärkeren Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Dementsprechend scheinen die porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen empfindlicher auf das Lysat zu reagieren, als die porzinen intestinalen Epithelzellen. Auch

bei einer Behandlung mit intakten abgetöteten *E. faecium* SF68 konnte eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach 48-stündiger Behandlung in den 3D4/31 beobachtet werden (Abbildung 27 B). Diese war allerdings nicht signifikant. Insgesamt scheinen die Ergebnisse darauf hinzudeuten, dass eine bakterielle Komponente oder ein Faktor von *E. faecium* SF68 zu einer bis zu 90%igen Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Vergleich zum basalen Level in den unbehandelten Zellen führt. Eine mittelfristige Behandlung (über vier Stunden) führt allerdings zunächst zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung, was auf eine immunogene Wirkung von *E. faecium* SF68-Komponenten schließen lässt. Da die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei Verwendung von zellfreiem Lysat viel deutlicher ausfällt, als mit den intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68, ist davon auszugehen, dass es sich um eine bakterielle Komponente handelt, die in höheren Mengen im Lysat vorkommt. Ferner war die Inhibierung konzentrationsabhängig. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass es in den humanen Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen nach Lysat-Behandlung über 4, 24 und 48 Stunden nicht zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt (Abbildung 30, Abbildung 31). Hier löste das Bakterienlysate auch noch nach 48-stündiger Behandlung eine signifikant erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung aus (Abbildung 30, Abbildung 31). In den IPEC-J2 (48-Stunden-Behandlung, MOI = 450) konnte weitergehend beobachtet werden, dass diese inhibitorische Aktivität auch eine durch *Salmonella* induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert (Abbildung 28). Dagegen wurde in den 3D4/31 Makrophagen nach 24- und 48-stündiger Vorbehandlung der Zellen mit zellfreiem Bakterienlysate eine signifikant höhere NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *Salmonella* ausgelöst, als bei einer Infektion ohne Vorbehandlung der Zellen (Abbildung 29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Makrophagen-ähnlichen Zellen auch nach Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, ausgelöst durch das *E. faecium* SF68-Lysate, noch dazu in der Lage sind, mit einer starken pro-inflammatorischen Antwort auf eine Infektion mit *Salmonella* zu reagieren. Dies könnte zumindest in den Makrophagen-ähnlichen Zellen ein Hinweis auf eine reversible Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sein.

Übereinstimmende Ergebnisse konnten auch für zellfreie Lysate des pathogenen *E. faecium* TX0016 gefunden werden (Abbildung 32). Allerdings führte das Lysate hier schon nach 24-stündiger Behandlung in den IPEC-J2 und nachfolgender *Salmonella*-Infektion dazu, dass die Zellen nicht mehr mit einer pro-inflammatorischen Immunantwort reagierten. Die Aktivierungsrate von NF- $\kappa$ B ist signifikant niedriger als in den nur mit *Salmonella*-behandelten Zellen. In den 3D4/31 Zellen konnte dagegen wieder eine erhöhte Aktivierungsrate des Transkriptionsfaktors nach Lysate-Vorbehandlung und anschließender *Salmonella*-Infektion detektiert werden. Die Inhibierung scheint hier zwar schneller einzutreten als in den IPEC-J2, allerdings ist diese auch reversibel und kann durch eine *Salmonella*-Infektion zum Teil aufgehoben werden. Es scheint demzufolge Unterschiede zwischen den Epithelzellen und den Makrophagen-ähnlichen Zellen in Bezug darauf zu

geben, wie schnell die Zellen auf das Lysat reagieren bzw. wie schnell das zellfreie Bakterienlysate eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auslöst. Andererseits scheinen die Makrophagen im Gegensatz zu den Epithelzellen trotz der Inhibierung noch sehr gut auf eine *Salmonella*-Infektion reagieren zu können. Diese Wirkungsweise wurde sowohl für den probiotischen als auch den pathogenen *E. faecium*-Stamm beobachtet. Es kann also höchstwahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass diese Wirkung, abhängig vom Vorhandensein der bakteriellen Komponente, einheitlich für *E. faecium*-Stämme ist.

Aufgrund der konzentrationsabhängigen Wirkung der *E. faecium* SF68-Lysate wurde auch untersucht, ob es einen Schwellenwert für die Lysat-Konzentration gibt, ab der es zu einer Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen kommt (Ergebnisse nicht gezeigt). Dazu wurden fünf Konzentrationen zwischen  $10^7$  und  $10^8$  CFU Äquivalente/ml ausgewählt und die Zellen über eine Zeitdauer von 4, 24 und 48 Stunden behandelt. In den 3D4/31 Makrophagen-ähnlichen Zellen wurde nach 48-stündiger Behandlung für alle ausgewählten Konzentrationen ( $10^7$ ,  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7,5 \times 10^7$ ,  $10^8$  lysierte Bakterien/ml) eine gegenüber dem basalen Level der unbehandelten Zellen deutlich erniedrigte NF- $\kappa$ B-Aktivierung gemessen. Bei einer Behandlung über 24 Stunden wurde ab einer Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  lysierte Bakterien/ml eine Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen detektiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Nach 4-stündiger Behandlung führte nur noch die höchste Konzentration ( $10^8$  lysierte Bakterien/ml) zu einer Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Für die intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) zeigte sich ein geringfügig anderes Bild. Nach 48-stündiger Behandlung kam es ab einer Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  CFU Äquivalenten/ml zu einer Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei einer Behandlung über 24 Stunden wurde für eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung eine Konzentration von mindestens  $5 \times 10^7$  lysierte Bakterien/ml benötigt, bei einer 4-stündigen Behandlung führte keine der untersuchten Konzentrationen zu einer Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Diese Ergebnisse verdeutlichen ein weiteres Mal, dass die Wirkung des *E. faecium*-Lysates sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig ist. Dieser zeit- und konzentrationsabhängige Wirkungsverlauf ist dabei außerdem noch abhängig von der Zellart (intestinale Epithelzellen – Makrophagen-ähnliche Zellen). Auffällig war dabei, dass die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Makrophagen wesentlich schneller und effizienter erfolgte als in den intestinalen Epithelzellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den nächsten Schritten versucht, die bakterielle Komponente von *E. faecium*, die für die inhibitorische Wirkung auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist, besser zu charakterisieren. Zunächst wurden die Wirkungsweisen zellfreier Lysate weiterer Bakterien (grampositiv, gramnegativ, pathogen, Laborstamm, probiotisch) untersucht, um zu überprüfen, ob diese Effekte nur durch *E. faecium*-Stämme ausgelöst werden. Sowohl in IPEC-J2 als auch in 3D4/31 Zellen konnte für zellfreie Lysate von *E. coli*

Nissle 1917 (probiotisch) und *E. coli* K-12 MG1655 (apathogener Laborstamm) zunächst eine konzentrationsabhängige initiale NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert werden. Diese geht auf bakterielle Bestandteile wie z. B. LPS, *Flagella* und PGN-Fragmente zurück. Beispielsweise über das TLR- oder Nod-Signaling kommt es zur Aktivierung des Schlüssel-Transkriptionsfaktors. *E. coli* Nissle 1917 induziert in humanen intestinalen Epithelzellen (Caco-2) über NF- $\kappa$ B z. B. die Expression des antimikrobiellen Peptids  $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) [366]. An diese starke initiale Aktivierung von NF- $\kappa$ B schließt sich eine zeitabhängige Abnahme an, welche auf eine negative Rückkopplung zurückgehen könnte. Insgesamt konnte für keinen untersuchten Bakterienstamm (*Staphylococcus aureus* Isolate, *E. coli* Nissle 1917, *E. coli* K-12 MG1655) eine signifikante Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unter das basale Level der unbehandelten Zellen gefunden werden. Im Gegensatz dazu konnten Untersuchungen mit fünf weiteren Isolaten von *E. faecium* eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigen (Dr. Karsten Tedin, persönliche Mitteilung). Dementsprechend scheint die Wirkung spezifisch für zellfreie Lysate von *E. faecium* zu sein. Bei einer gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit *E. coli* K-12 MG1655 (intakt, Gentamycin-abgetötet) und zellfreiem Lysat von *E. faecium* SF68 konnte gezeigt werden, dass *E. coli* K-12 MG1655 eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht verhindern kann, obwohl der apathogene Laborstamm alleine eine immunogene Wirkung hat und eine starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors auslöst. In diesem Versuch konnte sowohl für die intestinalen Epithelzellen, als auch für die Makrophagen-ähnlichen Zellen eine irreversible Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die weder durch eine gleichzeitige Behandlung mit *E. coli* K-12 MG1655 noch durch eine zusätzliche Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344 aufgehoben werden konnte, beobachtet werden. Ferner konnte in weiteren Untersuchungen eine andauernde Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Lysat-Behandlung und LPS-Stimulierung (LPS-EK, LPS-SM) in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) beobachtet werden. Auch bei einer der Lysat-Behandlung nachfolgenden Stimulierung der Zellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  konnte, zumindest bei einer Verwendung der höheren MOI, eine anhaltende Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert werden.

Zusammenfassend scheinen die zellfreien *E. faecium* SF68-Lysate einen starken inhibitorischen Effekt auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in porzinen Zellen zu haben. Diese Suppression lässt sich in den IPEC-J2 durch keinen eingesetzten Stimulus (*S. Typhimurium* SL1344, LPS-SM, LPS-EK, TNF- $\alpha$ , *E. coli* K-12 MG1655) wieder aufheben, was auf eine zunächst irreversible Inhibierung schließen lässt. Aktivierende Signale scheinen in dem beobachteten Zeitraum nicht durchdringen zu können. Ob es sich allerdings insgesamt um eine reversible oder irreversible Inhibierung handelt, kann nicht näher gesagt werden. In den 3D4/31 Makrophagen konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden. Allerdings führte eine Stimulierung der Zellen mit intakten, lebenden *S. Typhimurium* SL1344 nach Lysat-Vorbehandlung und trotz der damit einhergehender Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu

einer erhöhten Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors. In diesem speziellen Fall scheint die Inhibierung reversibel bzw. zu umgehen gewesen zu sein. Somit scheint die zeit- und konzentrationsabhängige zunächst irreversible Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit einer Ausnahme ein genereller Mechanismus des zellfreien *E. faecium*-Lysates zu sein.

Einen ähnlichen inhibitorischen Effekt konnten Ma *et al.* (2004) für *Lactobacillus rhamnosus* beschreiben [432]. Sie konnten zeigen, dass *L. rhamnosus* die durch TNF- $\alpha$ -induzierte Hochregulierung der mRNA-Synthese, die Produktion und Akkumulation des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 in zwei humanen Epithelzellen (T84, HT29) inhibiert. Die Expression von IL-8 ist von NF- $\kappa$ B abhängig [802]. Ferner konnte ebenfalls eine signifikante Inhibierung der normalerweise durch *S. Typhimurium*-induzierten IL-8-Sekretion beobachtet werden. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Bakterien/ml (entspricht etwa 10 Bakterien/Zelle) konnte eine signifikant reduzierte IL-8-Sekretion, weit unter dem basalen Level in unbehandelten Zellen, beobachtet werden [432]. *L. rhamnosus* verhindert in HeLa-Zellen die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus sowie die Degradierung von I $\kappa$ B und damit die Freisetzung von NF- $\kappa$ B. Allerdings tritt dieser anti-inflammatorische Effekt nur bei lebenden Bakterien auf, die in direktem Kontakt zu den Zellen stehen (Adhärenz) und konnte bei Verwendung von Bakterienlysaten oder hitzeinaktivierten Organismen nicht beobachtet werden. Dies stellt einen Gegensatz zwischen den Wirkungen von *L. rhamnosus* und *E. faecium* dar. Der inhibitorische Effekt von *E. faecium* konnte hauptsächlich nach langfristiger Behandlung mit hohen Konzentrationen des zellfreien *E. faecium* SF68-Lysates beobachtet werden. In einer weiteren Studie konnten Kelly *et al.* (2003) zeigen, dass kommensale Mikroorganismen einen anti-inflammatorischen Mechanismus aktivieren, durch den eine Entzündung des Darms abgeschwächt werden kann [803]. *Bacteroides thetaiotaomicron*, ein gramnegatives, streng anaerobes Bakterium, welches die Darmflora vieler Säugetiere, auch die des Menschen, dominiert, führt zu einer geringeren Expression pro-inflammatorischer Zytokine als Antwort auf eine Infektion mit *S. Enteritidis* *in vivo* (Rattenmodell) und *in vitro* in humanen intestinalen Epithelzellen [803]. Das Zielmolekül von *B. thetaiotaomicron* ist dabei RelA (p65), dessen Export aus dem Nukleus verstärkt wird. Weiterhin konnte RelA als die Hauptdimerkomponente von NF- $\kappa$ B nach Infektion der Caco-2 Zellen mit *Salmonella* identifiziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass aufgrund des verstärkten Exports von RelA aus dem Nukleus die NF- $\kappa$ B-Zielgene (pro-inflammatorische Zytokine) nicht exprimiert werden [803]. Auch in dieser Studie waren lebende Bakterien sowie der Bakterien-Zellkontakt von essentieller Bedeutung. Da *B. thetaiotaomicron* ein Teil der normalen Mikroflora des Darms ist, scheint diese Wirkung zur intestinalen Immunbalance beizutragen [803]. Kelly *et al.* konnten ferner von einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und einer damit verbundenen verringerten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen berichten, allerdings sind hierfür wiederum Komponenten der lebenden Bakterien verantwortlich und keine zellfreien Bakterienlysate.

Um die bakterielle Komponente aus dem zellfreien *E. faecium* SF68-Lysat, welche für den anti-inflammatorischen Effekt verantwortlich ist, enger einzukreisen, wurden verschiedene Untersuchungen zur näheren Charakterisierung gemacht. Dazu konnte in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass der Verbrauch bzw. die Umwandlung von essentiellen Nährstoffen durch Lysat-Bestandteile nicht für die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist (Aminosäure-Zusatz, täglich frisches Zellkulturmedium; Abbildung 38 und Abbildung 39). Eine weitere Untersuchung klärte, dass die beobachtete Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht auf Substanzen zurückgeht, die sich eventuell im Medium angereichert haben (Abbildung 39).

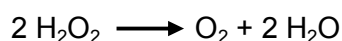
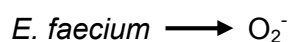
Durch die Hitzedenaturierung (99 °C, 30 Min.) des *E. faecium* SF68-Lysates konnte überprüft werden, ob ein Protein, Enzym oder eine proteinhaltige Struktur im Lysat für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist. Tatsächlich konnte die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, vor allem in den IPEC-J2, durch eine Hitzeinaktivierung des zellfreien Lysates verhindert werden (Abbildung 40). Da allerdings in den empfindlicher reagierenden 3D4/31 Zellen der Erfolg nicht vollständig war und nur eine etwas geringer ausfallende Reduzierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden konnte, scheint zwar ziemlich sicher, dass es sich um eine proteinhaltige Struktur handelt. Diese scheint jedoch relativ hitzestabil zu sein. In beiden Zelllinien wurde die durch das Lysat normalerweise verhinderte pro-inflammatorische Immunantwort auf eine *Salmonella*-Infektion durch die Hitzeinaktivierung aufgehoben, sodass es zu einer normalen NF- $\kappa$ B-Aktivierung kam. Um noch einen weiteren Beweis dafür zu bekommen, dass ein Protein, Enzym oder eine proteinhaltige Struktur für die Wirkung von *E. faecium* auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist, wurde weitergehend eine Proteinase K-Behandlung des zellfreien Bakterienlysates vorgenommen. Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass ein Protein, Enzym oder eine proteinhaltige Struktur die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auslöst, da nach Behandlung des Lysates mit Proteinase K in beiden Zellen keine signifikante Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung detektiert werden konnte (Abbildung 41). Obwohl die Ergebnisse insgesamt darauf hindeuten, dass nicht die intakten Bakterien an sich, sondern eine zelluläre proteinhaltige Struktur im zellfreien Lysat von entscheidender Bedeutung ist, wurde trotzdem eine Proteinase K-Behandlung intakter, Gentamycin-abgetöteter *E. faecium* SF68 durchgeführt (Abbildung 42). Nur in den Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) führte die Behandlung über 48 Stunden mit intakten, Gentamycin-abgetöteten *E. faecium* SF68 überhaupt zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Eine Proteinase K-Behandlung der intakten, abgetöteten Bakterien verhinderte auch in den 3D4/31 Zellen eine Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht. Dementsprechend scheint kein Oberflächenprotein für die Inhibierung der Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors verantwortlich zu sein. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich um eine proteinhaltige, von den Bakterien normalerweise sezernierte und relativ hitzestabile Struktur handelt. Eine Proteinase K-Behandlung des



Lysates zerstört alle proteinhaltigen Strukturen, sodass die Inhibierung der NF-κB-Aktivierung ausbleibt. Erfolgt die Behandlung mit Proteinase K hingegen an den intakten Bakterien, so werden nur Oberflächenproteine und im umgebenden Medium befindliche proteinhaltige Strukturen proteolytisch abgebaut. Werden im Anschluss an die Proteinase K-Behandlung noch proteinhaltige Strukturen von den Bakterien sezerniert, so bleiben diese intakt und wirksam, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Proteinase K-Behandlung sein könnte. Mit Hilfe einer Lysozym-Behandlung des Lysates konnte im Anschluss daran ausgeschlossen werden, dass Bestandteile der grampositiven Zellwand für die Suppression der Aktivierung des Transkriptionsfaktors ausschlaggebend sind.

Auch wenn im Laufe aller Versuche stets der konfluente Monolayer der Zellen mikroskopisch überprüft wurde, sind Untersuchungen zur Zytotoxizität, Zellviabilität und -vitalität von essentieller Bedeutung, um letztlich ausschließen zu können, dass die Lysat-Behandlung Zellen schädigt und so zu ihrem Absterben und der damit verbundenen reduzierten NF-κB-Aktivierung führt.

*Enterococcus faecium* ist ein kommensaler Mikroorganismus des Gastrointestinaltraktes, der durch die Autooxidation des Membran-assoziierten Dimethylmenaquinone reichliche Mengen an extrazellulärem Superoxid und Derivate reaktiver Sauerstoffspezies, beispielsweise Wasserstoffperoxid produzieren kann [750, 751, 804]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können einerseits die Zellen schädigen. Beispielsweise kann es zu einer chromosomalen Instabilität und im weiteren Verlauf zu Krebserkrankungen kommen [750]. Andererseits wurde beobachtet, dass *E. faecium* durch die Produktion von Wasserstoffperoxid in großen Mengen dazu in der Lage ist, den Nematoden *Caenorhabditis elegans* abzutöten [751]. In verschiedenen Studien konnte daneben gezeigt werden, dass das durch *E. faecium* produzierte Wasserstoffperoxid durch das Enzym Katalase abgebaut werden kann [750, 751]. Die Katalase zersetzt Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und schützt so die Zellen vor einer DNA-Schädigung.



Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob im Lysat eventuell vorhandenes reaktives Wasserstoffperoxid, welches von *E. faecium* produziert wird, eine zytotoxische Wirkung ausübt und für die Inhibierung der NF-κB-Aktivierung verantwortlich ist. Dafür wurden die Zellen parallel mit dem Lysat und Katalase behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass reaktives, zellschädigendes Wasserstoffperoxid nicht ausschlaggebend für die Suppression der Aktivierung des Transkriptionsfaktors ist und diese somit auch nicht verhindern kann (Abbildung 44). Eine weitere Untersuchung konnte verdeutlichen, dass die Lysat-Behandlung keine apoptotischen Vorgänge in den Zellen induziert. Dazu wurde der Caspase-Inhibitor Z-

VAD-FMK eingesetzt. Dieser blockiert verschiedene Proteasen, die eine wichtige Bedeutung bei apoptotischen Vorgängen spielen und verhindert so die Apoptose der Zellen [752]. Hier konnte gezeigt werden, dass apoptotische Vorgänge, die durch Z-VAD-FMK blockiert werden, keine Rolle bei der Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielen (Abbildung 44). Eine Inhibierung der Apoptose stellt die Möglichkeit zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den Zellen nicht wieder her.

Für die Überprüfung des zytotoxischen Potentials des zellfreien *E. faecium* SF68-Lysates, der Zellviabilität sowie -vitalität wurden verschiedene Tests durchgeführt. Die Zytotoxizität des Bakterienlysates wurde nach Behandlung der Zellen über 4, 24 und 48 Stunden über eine Messung der Enzymaktivität von Lactatdehydrogenase (LDH) fluorimetrisch bestimmt. Der LDH-Test ist ein sensitiver, häufig angewendeter *In-vitro*-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität [805]. Das Prinzip beruht darauf, dass LDH aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Zellkulturmedium nachweisbar ist. Die LDH-Aktivität wird mit Hilfe enzymatischer Tests bestimmt. In den 3D4/31 konnte nach Lysat-Behandlung über 4, 24 und 48 Stunden kein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 46 B). Nur in den IPEC-J2 Zellen (Abbildung 47) konnte nach 48-stündiger Behandlung eine zwar signifikant erhöhte Anzahl abgestorbener Zellen gefunden werden, deren Anteil prozentual deutlich geringer war, als der durch den Lysispuffer erhaltene Wert. In weiteren drei Wiederholungen des LDH-Tests konnte kein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 46 A). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung aufgrund der zentralen Rolle dieses Transkriptionsfaktors auch einen Einfluss auf die Zielgene hat. Dazu gehören beispielsweise anti-apoptotische (z. B. Bcl-2) aber auch pro-apoptotische Regulatoren (z. B. p53, c-myc). Dabei spielt auch eine Rolle, wie lange NF- $\kappa$ B aktiviert ist [806]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine länger andauernde Aktivierung des Transkriptionsfaktors für die Induktion der Apoptose benötigt wird [806]. Eine kurzzeitige, nur über einige Stunden andauernde Aktivierung des Transkriptionsfaktors, wie sie beispielsweise durch TNF- $\alpha$  oder PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) induziert wird, führt nicht zu einer Apoptose der Zellen [806]. Dabei kommt es zu einer Herabregulierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch inhibitorische Proteine, z. B. I $\kappa$ B- $\alpha$ , p100, p105 [807] oder durch das zelluläre Apoptose-Inhibitorprotein (c-IAP), dessen Expression von NF- $\kappa$ B abhängig ist [808, 809]. Erfolgt hier allerdings eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B, so führt TNF- $\alpha$  zur Apoptose einer Vielzahl von Zellen [808, 809]. Dementsprechend könnte eine länger andauernde Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, wie sie durch das Bakterienlysate und MG-132 ausgelöst wird, nach einer gewissen Zeit auch zu einer Apoptose führen, da wichtige regulatorische Gene nicht mehr exprimiert werden. Diese würde wahrscheinlich gegenüber dem Lysispuffer, der sofort zum Absterben einer Vielzahl von Zellen führt, deutlich langsamer beginnen. Allerdings konnte eine solche Apoptose nicht in den 3D4/31 Makrophagen gefunden werden, die insgesamt sensibler auf das zellfreie Bakterienlysate der Enterokokken

zu reagieren scheinen. In den humanen Epithelzellen führte die 24-stündige Behandlung mit zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat zu einer signifikant erhöhten Anzahl abgestorbener Zellen (Abbildung 46 C). Allerdings war der prozentuale Anteil der abgestorbenen Zellen immer noch sehr gering im Vergleich zum Anteil, der nach Behandlung mit dem Lysispuffer (Positivkontrolle) gefunden werden konnte. Zytotoxische Effekte des zellfreien Lysates scheinen dementsprechend nicht für die signifikant reduzierte Luziferase-Aktivität verantwortlich zu sein. Auch mit Hilfe des Zellviabilitätstests konnte kein negativer Effekt des Bakterienlysates auf die Zellen (IPEC-J2, 3D4/31) nachgewiesen werden. Im Gegenteil, es konnte eher eine erhöhte Aktivität der Protease, die ein zellpermeables Peptidsubstrat (GF-AFC) spaltet, welches in intakte, lebende Zellen eindringt, gemessen werden. Bei Verlust der Membranintegrität wird die Protease inaktiv, das gemessene fluoreszierende Produkt liegt in geringerer Menge vor und somit fällt auch das Signal geringer aus. Dies ist nicht der Fall, dementsprechend scheint auch die Viabilität der Zellen nicht durch das Lysat beeinträchtigt zu werden. Als letzter Test wurde die metabolische Aktivität der Zellen (Zellvitalität) untersucht. Sowohl in den porzinen intestinalen Epithelzellen, als auch in den Makrophagen-ähnlichen Zellen konnte eine reduzierte metabolische Aktivität der Zellen erst nach 48-stündiger Behandlung mit der höchsten Konzentration des Lysates detektiert werden. Dementsprechend scheint es tatsächlich, wie vermutet, zu einer Beeinflussung der Vitalität der Zellen gekommen zu sein. Der Test beruht auf der reduktiven Umwandlung einer Tetrazolium-Komponente (MTS) in ein lösliches, farbiges Formazan-Produkt, wobei die benötigten Reduktionsäquivalente NADH und NADPH durch Dehydrogenasen in vitalen, metabolisch aktiven Zellen produziert werden. Allerdings muss hierbei auch beachtet werden, dass es aufgrund der enormen Bandbreite der Zielgene, die durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert werden [244], nach lang anhaltender Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auch zu einer verringerten bzw. ganz eingestellten Expression verschiedener essentieller Moleküle kommen könnte. Dies würde auch die metabolische Aktivität der Zellen negativ beeinflussen. Zu den Zielgenen von NF- $\kappa$ B gehört beispielsweise die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), welche eine wichtige Reaktion im Pentosephosphatweg katalysiert und Reduktionsäquivalente (NADPH) bereitstellt [244, 810]. Wird die Expression der G6PD aufgrund der Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert, so werden auch weniger Reduktionsäquivalente hergestellt, die für die im vorliegenden Zellvitalitätsassay untersuchte Reaktion von essentieller Bedeutung sind. Dies könnte die verringerte metabolische Aktivität der Zellen nach 48-stündiger Lysat-Behandlung (IPEC-J2: MOI = 450; 3D4/31: MOI = 200) erklären.

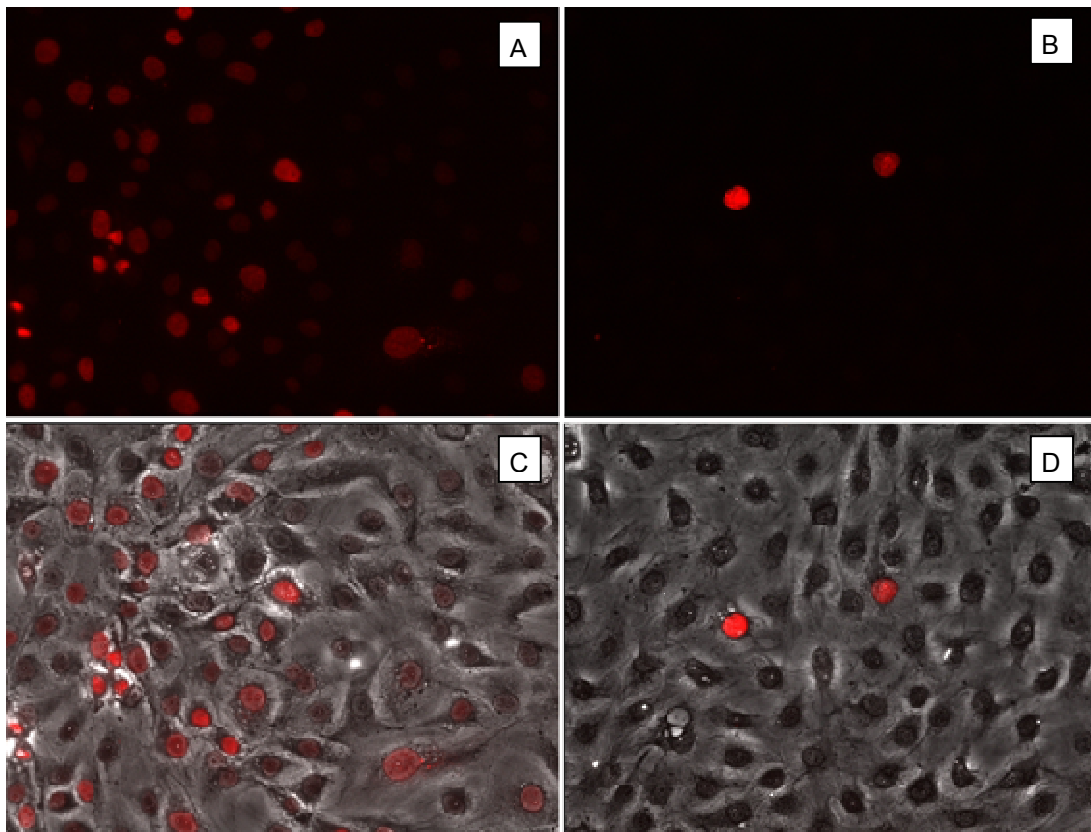
Insgesamt zeigten Versuche zur Zytotoxizität des zellfreien Bakterienlysates, zur Untersuchung der Apoptose und negativer Effekte reaktiver Sauerstoffspezies, zum Verbrauch von essentiellen Nährstoffen im Zellkulturmedium und zur Zellviabilität, dass diese Faktoren keine Rolle für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung spielen.

Festzuhalten ist, dass die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf eine proteinhaltige, relativ hitzebeständige Struktur zurückgeht, die sich in höherer Konzentration im zellfreien Lysat als in einer Bakterienkultur mit intakten, Gentamycin-abgetöteten Bakterien, befindet. Diese Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist sowohl abhängig von der eingesetzten Konzentration als auch von der Behandlungsdauer und scheint größtenteils irreversibel im untersuchten Zeitraum zu sein. Außerdem scheint die proteinhaltige Struktur im zellfreien Lysat bei den intestinalen Epithelzellen weniger effektiv und langsamer zu wirken, als in Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31). Ferner sind weder zytotoxische Effekte noch apoptotische Vorgänge für diese Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich. Aufgrund der lang anhaltenden Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt es höchstwahrscheinlich zu einer Dysregulation der Genexpression verschiedener NF- $\kappa$ B-Zielgene, was vermutlich auch der Grund für eine verminderte metabolische Aktivität der Zellen ist.

Die inhibitorische Aktivität einer Protein-Komponente im *E. faecium* SF68-Lysat verhinderte nicht nur die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Reaktion auf eine Infektion mit *Salmonella*, LPS oder TNF- $\alpha$ , sondern führte auch zu einer starken Inhibierung der Zellproliferation. Für die Untersuchungen der Zellproliferation wurde der Proliferationsmarker Ki67 verwendet. Die Versuche wurden am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, durchgeführt (Dr. Karsten Tedin, unveröffentlichte Ergebnisse). Das Ki67-Antigen zeigt nur die Zellen im Gewebe an, die sich teilen/vermehrten, die sogenannte Wachstumsfraktion [811]. Während des Zellzyklus wird das Protein in der aktiven G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen, welche sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen nicht und das restliche Ki67 wird schnell abgebaut [811]. Der Proliferationsmarker Ki67 wird häufig in der Diagnostik von Krebserkrankungen eingesetzt [812]. Mit Hilfe einer Antikörper-Färbung (monoklonaler Antikörper Ki67) wurden die proliferierenden Zellen angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Dazu wurden semi-konfluente (ca. 80 %) Monolayer von IPEC-J2 in Ab- (Abbildung 76 A und C) bzw. Anwesenheit (Abbildung 76 B und D) des zellfreien *E. faecium* SF68-Lysates ( $10^8$  lysierte Bakterien/ml) über 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, fixiert, mittels eiskalten Methanols permeabel gemacht und mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper behandelt. Die Anwesenheit des Proliferationsmarkers Ki67 im Nukleus der Zellen wird durch rote Fluoreszenz sichtbar gemacht (Abbildung 76 A und B). In Abbildung 76 C und D ist eine Überlappung der Fluoreszenzkanäle und eine Phasenkontrastabbildung des jeweiligen Zellmonolayers gezeigt. Vergleicht man die Abbildungen mit (B und D) und ohne (A und C) Lysat-Behandlung, so wird deutlich, dass die Proliferation der Zellen durch eine Behandlung mit zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat reduziert wird. Dementsprechend scheint die proteinhaltige Struktur, welche für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist

auch die Zellproliferation zu supprimieren. Da NF- $\kappa$ B neben vielen immunrelevanten Genen auch bei der Zellproliferation eine entscheidende Rolle spielt, könnte es sein, dass diese Inhibierung der Zellproliferation mit der Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zusammenhängt. Außerdem konnten die Abbildungen, die mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Abbildung 76 B und D) gemacht wurden, zeigen, dass der Monolayer der Zellen (IPEC-J2) auch nach 48-stündiger Behandlung mit *E. faecium* SF68-Lysat noch intakt ist. Es konnten keine Zellen mit beschädigter Membran gefunden werden. Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nicht auf apoptotische Vorgänge und ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist.

**Abbildung 76: Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67.** Die Behandlung mit zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat führt zu einer Suppression der Proliferation in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2). Semi-konfluente Monolayer von IPEC-J2 wurden in Ab- (Abb. A und C) bzw. Anwesenheit (Abb. B und D) von zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat kultiviert und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen den Proliferationsmarker Ki67 wurde die Proliferation der Zellen nachgewiesen. Nur proliferierende Zellen exprimieren Ki67 und zeigen eine rote Fluoreszenz (Abb. A und B). In Abbildung C und D ist eine Überlappung der Fluoreszenzkanäle und eine Phasenkontrastabbildung des jeweiligen Zellmonolayers gezeigt. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis aus drei technischen Replikaten und zwei unabhängigen Wiederholungen (mit Erlaubnis von Dr. Karsten Tedin, unveröffentlichte Ergebnisse).



Auch mittels einer Trypanblau-Färbung konnte kein signifikanter Unterschied zu unbehandelte Kontrollzellen nach einer Lysat-Behandlung beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Mit diesem Test kann ebenfalls die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Perforierte Zellen, deren Zellmembran durchlässig geworden ist, nehmen den Farbstoff auf und färben sich dunkelblau, viable Zellen mit intakter Zellmembran dagegen nicht [813, 814].

In einem letzten Versuchsansatz wurde der Effekt von zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat mit dem eines Inhibitors der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (MG-132) verglichen. MG-132 ist ein Peptidaldehyd, das als Substratanalogon selektiv die proteolytische Aktivität des 26S Proteasoms blockiert [755]. Dies führt insgesamt zu einer reduzierten Degradierung von Ubiquitin-markierten Proteinen. Beispielsweise wird auch die Degradation von I $\kappa$ B gehemmt, was letztlich verhindert, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert wird. In den porzinen intestinalen Epithelzellen konnte für die Behandlung mit MG-132 bzw. zellfreiem *E. faecium* SF68-Lysat ein ähnliches Ergebnis gefunden werden. Bei einer Behandlung über vier Stunden konnte sowohl für MG-132 als auch das zellfreie *E. faecium* SF68-Lysat eine leichte (MG-132) bzw. signifikant erhöhte (Lysat) NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden. Erfolgte die Behandlung über einen längeren Zeitraum, so kam es in beiden Fällen zu einer signifikant reduzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Dementsprechend scheinen sich die Effekte zu ähneln, allerdings kann keine Aussage über die genaue Wirkungsweise gemacht werden, die im Fall des *E. faecium* SF68-Lysates zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt. Es kann aber festgehalten werden, dass der inhibitorische Effekt von *E. faecium* SF68 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung möglicherweise auf ein Protein/Peptid zurückgeht, welches ein Proteasom-Inhibitor ist.

Eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung würde auch andere Signaltransduktionswege beeinflussen, beispielsweise das MAP-Kinase Signaling [815]. Zur MAP-Kinase Familie gehören biochemisch auch die JNKs (c-Jun-N-terminale Kinasen) [816]. Hauptsächlich werden die JNKs durch Zytokine und Umweltstress aktiviert [816]. Da das zellfreie Lysat von *E. faecium* SF68 jedoch keine Inhibierung des JNK (c-Jun-N-terminale Kinasen)-Signalweges bewirkt (unveröffentlichte Ergebnisse, AG Tedin), kann höchstwahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass eine Inhibierung von Membranrezeptoren nicht der Ansatzpunkt der proteinhaltigen Struktur im Lysat ist und so eine Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erreicht wird. Dementsprechend bleiben noch verschiedene andere Angriffspunkte, an denen die proteinhaltige Struktur ansetzen könnte.

Die proteinhaltige Struktur, welche für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie der Proliferation der Zellen verantwortlich ist, konnte durch verschiedene Analysen schon etwas näher charakterisiert werden. In der Literatur wurde nun nach Substanzen gesucht, die einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen. Viele Enterokokken-Stämme produzieren antimikrobielle Peptide (Bakteriozine/Enterozine). Zu den Enterozinen, die von *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus mundtii* produziert werden gehören z. B. Enterozin A, B, P, Q, CRL35, 1071A und B, Bakteriozin 31, RC714, RJ11 und Enterolysin A [817]. Foulquié-Moreno *et al.* (2003) konnten mittels PCR-Analysen zeigen, dass *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) die Gene für die Enterozine A, B, P, 31, AS-48, L50A und L50B nicht besitzt, dagegen konnte ein neues Enterozin mit der Molekülmasse von 4,5 kDa nachgewiesen werden [483]. Dieses neue Enterozin hat allerdings nur eine limitierte

Aktivität gegenüber anderen grampositiven Bakterien [483]. Vermutlich besitzt das Probiotikum außerdem das Gen für Enterozin Q (Sequenzierung Sanger Institut, Enterozin Q-codierendes Plasmid pClZ2 [818]). Zum Teil sind Enterozine schon sehr gut charakterisiert. Beispielsweise konnten Chen *et al.* (2013) zeigen, dass *Enterococcus* spp. 812 ein Bakteriozin (Enterozin T) produziert, welches gegenüber einer Vielzahl von grampositiven Bakterien (z. B. *L. monocytogenes*) aktiv ist [819]. Enterozin T ist relativ hitzestabil, die Aktivität nimmt nach Autoklavieren (121 °C, 15 min) nur geringfügig ab. Allerdings kann Enterozin T durch eine Proteinase K-Behandlung vollständig inaktiviert werden [819].

Zusätzlich zu ihrer antibakteriellen Aktivität konnten auch schon immunmodulierende Funktionen von antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden [820–822]. Gaczynska *et al.* (2003) konnten zeigen, dass das antimikrobielle Peptid PR39 (isoliert aus porzinem Knochenmark) die Angiogenese stimuliert und außerdem eine inflammatorische Immunantwort verhindert [823]. Diese Inhibierung der inflammatorischen Immunantwort geht auf eine Blockierung der Proteasom-anhängigen Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  zurück, was eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindert und so auch die Expression der Zielgene [823]. Ein Stamm von *E. faecalis*, SL5, produziert ein Bakteriozin (CBT-SL5, MW 4,5 kDa), welches die Produktion des pro-inflammatorischen Interleukin-8 in humanen epidermalen Keratinozyten nach Stimulierung mit *Propionibacterium acnes* inhibiert [824]. Durch eine Behandlung der Zellen mit *P. acnes* kam es zu einer erhöhten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8, vermittelt durch TLR2 (PGN grampositive Bakterien) und TLR4 (LPS). Eine Gabe des *E. faecalis*-Bakteriozins führte konzentrations- und zeitabhängig zu einer Inhibierung der durch *P. acnes* induzierten Genexpression von IL-8 [824]. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass CBT-SL5 die Translokation von NF- $\kappa$ B p65 in den Nukleus nach Stimulierung mit *P. acnes* inhibiert und so die IL-8-Expression verhindert. Folglich konnte hier eine anti-inflammatorische Wirkung von CBT-SL5 nachgewiesen werden [824]. Zusammenfassend konnte in der Literatur für unterschiedliche Bakteriozine/Enterozine eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen werden. Daneben konnte von Saito *et al.* (1979, 1981) gezeigt werden, dass ein Bakteriozin von *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 14468) die Proliferation von viral transduzierten Tierzellen (mKS-A TU7, 155-4 T2, XC-Zellen) und humanen malignen Zellen (HGC-27) inhibiert [825, 826]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass diese Inhibierung konzentrationsabhängig ist [825, 826]. Diese Ergebnisse könnten insgesamt darauf hindeuten, dass ein Enterozin von *E. faecium* SF68 für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und die verringerte Proliferation der Zellen verantwortlich ist. Auch die ermittelten Charakteristika (Protein bzw. proteinhaltige Struktur, relativ hitzestabil, Proteinase K-sensitiv) konnten für ein *Enterococcus* Enterozin schon nachgewiesen werden. Daneben weisen die Ergebnisse auf eine sezernierte Substanz hin. Um welches Enterozin es sich allerdings genau handeln könnte, kann nicht gesagt werden,

da bis jetzt keine Behandlung der Zellen mit einem aufgereinigten Enterozin von *E. faecium* SF68 stattgefunden hat. Auch der genaue Wirkmechanismus, der zur Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt, konnte bis jetzt noch nicht vollständig geklärt werden. Eine Inhibierung von Membranrezeptoren kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden. In der Literatur konnten darüber hinaus schon mehrere Wirkmechanismen von Bakteriozinen auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung gezeigt werden. In einem Fall wurde diese durch eine Blockierung der Proteasom-anhängigen Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  verhindert, eine andere Studie wies eine Inhibierung der Translokation von NF- $\kappa$ B nach. Es scheint hier also keinen einheitlichen Wirkmechanismus der Bakteriozine zu geben. Erstaunlich war, dass die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung bislang nur in porzinen Zelllinien (IPEC-J2, 3D4/31) gezeigt werden konnte, in den zwei humanen Zelllinien (LoVo, THP-1) kam es nach 48-stündiger Behandlung nicht dazu. Um genauer zu untersuchen, ob sich die Wirkung tatsächlich auf porzine Zellen beschränkt, müssten noch weitere Zelllinien getestet werden. Außerdem müsste überprüft werden, ob vielleicht noch höhere Konzentrationen oder eine längere Behandlungsdauer notwendig sind, um eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu erreichen. Auch in den porzinen Zellen konnten diesbezüglich große Unterschiede beobachtet werden. Die Makrophagen-ähnlichen Zellen scheinen sensibler und schneller auf die proteinhaltige Struktur zu reagieren als die intestinalen Epithelzellen. Zellen der angeborenen Immunantwort scheinen dementsprechend effektiver und schneller von der proteinhaltigen Struktur beeinflusst zu werden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass insbesondere diese Immunzellen bevorzugte Zielzellen sind.

#### **5.4. Zusammenfassung – Wirkungsmechanismus von *E. faecium* SF68**

Zusammengenommen liefern die *In-vitro*-Ergebnisse mit *E. faecium* SF68 (NCIMB 10415) eine mechanistische Erklärung für den im Tierversuch bei den Ferkeln im Alter von 34 Tagen *post partum* detektierten anti-inflammatorischen bzw. immunsuppressiven Effekt von *E. faecium* SF68. Außerdem kann die leicht pro-inflammatorische Immunantwort in der Periode vor dem Absetzen, bei sporadischem Kontakt mit dem Probiotikum, *in vitro* ebenfalls detektiert werden (erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach kurzzeitiger Behandlung).

Gelangt ein neues Bakterium in den Gastrointestinaltrakt, so konnte z. B. im Mäusemodell gezeigt werden, dass es zunächst zu einer pro-inflammatorischen Immunantwort kommt [783]. Daran schließt sich eine orale Toleranz an [783]. Diese Inflammation auf geringem Niveau könnte einerseits auf kommensale Mikroorganismen und/oder ihre bakteriellen Produkte (z. B. LPS) zurückzuführen sein, andererseits scheint auch das Probiotikum einen gewissen Anteil daran zu haben, da auch *in vitro* nach Inkubation mit lebenden, abgetöteten oder lysierten *E. faecium* SF68 eine erhöhte Aktivierung von NF- $\kappa$ B detektiert werden konnte, die nach längerer Behandlung allerdings in eine Inhibierung umschlägt. Während der Periode vor dem Absetzen nehmen die Ferkel nur unregelmäßig feste Nahrung und damit



auch das Probiotikum auf. Dementsprechend scheint die Aufnahme von *E. faecium* SF68 auch auf sporadischem Umweltkontakt (Fäzes) oder dem Kontakt zu den Sauen zu beruhen. Nach dem Absetzen haben die Ferkel nur noch feste Nahrung zur Auswahl. Dies führt zu einer deutlich vermehrten Aufnahme des Probiotikums über einen längeren Zeitraum. Im Alter von 34 Tagen hatten die Ferkel über einen Zeitraum von  $8 \pm 2$  Tagen eine kontinuierliche Zufuhr der probiotikahaltigen Nahrung. Zu diesem Zeitpunkt scheint die anti-inflammatorische Wirkung dominant geworden zu sein. *In vitro* konnte eine solche Wirkung (Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung) abhängig von der Zelllinie schon nach einer Behandlung über vier Stunden (3D4/31) gefunden werden. Allerdings sind die hier eingesetzten Konzentrationen nicht vergleichbar mit denen im Tierversuch.

Die anti-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems scheint zu einer Art „Immunsuppression“ zu führen. Dies bringt auch eine erhöhte Anfälligkeit der Ferkel für Infektionen mit pathogenen Keimen mit sich und könnte die erhöhten Bakterienlasten, wie sie in zwei unabhängigen *Salmonella* challenge Versuchen beobachtet wurden, erklären [22, 482].

Die pro-inflammatorische Wirkung von *E. faecium* SF68 *in vivo* geht wahrscheinlich darauf zurück, dass die Bakterien neu in den Gastrointestinaltrakt gelangen und dort zunächst eine Abwehrreaktion hervorrufen. Diese richtet sich höchstwahrscheinlich gegen bakterielle Komponenten wie z. B. LTA oder PGN-Fragmente. Nach einer gewissen Zeit wird allerdings eine Art orale Toleranz entwickelt. Erfolgt die Behandlung mit *E. faecium* SF68 (als Futterzusatz bzw. abgetötet oder lysiert auf den Zellen) über einen längeren Zeitraum oder in höheren Konzentrationen, kommt es aufgrund der Produktion und Akkumulation einer proteinhaltigen Struktur zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und in den Ferkeln zu einer anti-inflammatorischen Ausrichtung des Immunsystems. Die hierfür verantwortliche Substanz könnte ein antibakterielles Peptid/Enterozin sein. Die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung scheint über einen gewissen Zeitraum vorzuherrschen, sodass Pathogene (*S. Typhimurium* SL1344 bzw. DT104) bzw. bakterielle Antigene (LPS) keine Pro-Inflammation auslösen können. Im Tierversuch konnte dagegen nach weiteren 20 Tagen (54 Tage *p. p.*) kontinuierlicher Aufnahme des Probiotikums eine Rückkehr zum Normalzustand (leicht pro-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems) beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die anti-inflammatorische Wirkung (Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung) von *E. faecium* SF68 zurückgegangen ist. Es scheint demnach so zu sein, dass trotz einer weiter anhaltenden Zufuhr von *E. faecium* SF68 die Immunsuppression nach einer gewissen Zeit zurückgeht. Außerdem bleibt die Immunsuppression vermutlich lokal begrenzt, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass es nur im Bereich der M-Zellen der Peyer'schen Platten und naheliegenden Immunzellpopulationen zu einer Anreicherung des Probiotikums in einer ausreichenden Menge kommt, um die Suppression der Immunantwort auszulösen. Für die enteropathogenen Salmonellen ist diese Immunsuppression zunächst

ein Vorteil, allerdings wird das Pathogen in tieferen Geweben (z. B. den mLN) weiterhin bekämpft und in Schach gehalten. Die erste Barriere, die angeborene Immunantwort in der Darmwand, wird allerdings benachteiligt. Es kommt hier zu einer verzögerten Immunantwort. Im Tierversuch wurde die Genexpression immunologisch relevanter Gene in den Peyer'schen Platten untersucht, also genau dem Teil des Darms, an dem aufgrund der hohen Anzahl von M-Zellen Antigene und Bakterien durch die Darmwand geschleust oder transloziert werden. In der Periode vor dem Absetzen haben die Ferkel nur sporadisch Kontakt mit *E. faecium* SF68. Dementsprechend wird auch nur eine geringe Zahl von Immunzellen lahmgelegt. Dies hat zur Folge, dass mehr Bakterien bzw. LPS und andere Antigene durch die M-Zellen gelangen. Als Reaktion darauf erfolgt allerdings eine Immunantwort, eine leichte Inflammation. Nach dem Absetzen nehmen die Ferkel das Probiotikum kontinuierlich auf. Der immunsupprimierende Effekt von *E. faecium* SF678 zeigt sich nun in einer signifikant reduzierten Genexpression der immunologisch relevanten Gene. Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein Wirkmechanismus von *E. faecium* SF68 aufgezeigt werden, der viele der zuvor in anderen Studien gesehenen Ergebnisse erklären könnte. Des Weiteren konnte verdeutlicht werden, dass der Zeitpunkt einer Infektion eine entscheidende Rolle spielt. Üblicherweise wurde das Probiotikum bei der Behandlung von akuten Durchfallerkrankungen und vor allem Darmentzündungen eingesetzt. Diese sind durch eine intestinale Entzündung charakterisiert, was deutlich macht, dass der entscheidende Effekt von *E. faecium* SF68 hier eine anti-inflammatorische Wirkung ist [776]. Dementsprechend scheint *E. faecium* SF68 für eine präventive Gabe bei Ferkeln eher ungeeignet zu sein. Bei einer Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen scheint es dagegen aufgrund seiner anti-entzündlichen Wirkung sehr effektiv zu sein [776].

Um genauer klären zu können, welche proteinhaltige Substanz für die Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist und ob es sich dabei tatsächlich um ein Bakterozin/Enterozin handelt, könnten synthetische, aufgereinigte Enterozine von *E. faecium* SF68 *in vitro* unter Verwendung der Luziferase-Reporterzelllinien getestet werden. Außerdem könnte man versuchen, *E. faecium* SF68 von seinen endogenen Plasmiden zu befreien. Sequenzanalysen konnten zeigen, dass das Plasmid pCIZ2, welches für Enterozin Q codiert, in *E. faecium* SF68 vorhanden ist. Durch die Verwendung von Novobiocin (Inhibitor der DNA-Synthese) könnten Plasmid-freie Bakterien gewonnen werden, welche hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung getestet werden könnten.

### 5.5. Zink

Neben dem Probiotikum wurde zusätzlich die Wirkungsweise von Zink (*in vivo*: ZnO; *in vitro*: ZnSO<sub>4</sub> bzw. ZnCl<sub>2</sub>) als Futterzusatzstoff bzw. in der Zellkultur im Infektionsmodell untersucht. Zink ist aufgrund seiner biochemischen und strukturellen Funktionen ein

essentielles Spurenelement (siehe 1.3.1). Außerdem beeinflusst Zink viele Aspekte des angeborenen, aber auch des adaptiven Immunsystems [195, 539, 540]. Zink wird in der Nutztierzucht allgemein zur Verbesserung des Gesundheitsstatus und zur Vorbeugung von Durchfallerkrankungen eingesetzt [23, 24, 567, 568]. Ferner wurde für Zink eine bakterizide Wirkung beschrieben [570, 576]. Problematisch ist, dass eine solche positive Wirkung (pharmakologische Wirkung) erst bei sehr hohen Konzentrationen Zink (3000 – 6000 ppm) auftritt. Von einer Störung des Knochenwachstums, über eine Beeinflussung des Kupfer- und Eisenstoffwechsels hin zur Schädigung der Darmmukosa und zu einer umweltschädigenden Akkumulierung von Zink auf landwirtschaftlichen Nutzflächen bringt diese Fütterung aber auch viele negative Folgen mit sich [29, 30, 578–580].

Ein wichtiger Aspekt ist die zinkabhängige Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA. Zabel *et al.* konnten bei einer Verwendung eines Metall-Chelators eine Blockierung der DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B beobachten, die nur durch die Gabe von Zink aufgehoben werden konnte [545]. Andere zweiwertige Metall-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) besaßen diese Fähigkeit nicht, sodass von einer zinkabhängigen Bindung gesprochen werden kann [545]. Obwohl NF- $\kappa$ B nach heutigem Kenntnisstand in seiner Struktur kein Zink enthält, so scheint das essentielle Spurenelement trotzdem eine entscheidende Bedeutung zu haben und weiter oben in der Signaltransduktionskette zu wirken [547, 549]. Haase *et al.* (2009) konnten eine Zink-Abhängigkeit der TLR4-Signalkaskade nachweisen. Dabei hatten moderate Zink-Konzentrationserhöhungen einen stimulierenden Effekt, hohe Konzentrationen wirkten dagegen inhibitorisch [549]. Die TLR4-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B spielt auch bei der Abwehr einer Salmonelleninfektion eine wichtige Rolle, da die Erkennung von *S. Typhimurium* zum großen Teil auf die Rezeptoren TLR4 (LPS), TLR2 (PGN) und TLR5 (Flagellin) zurückgeht [138, 139, 141]. Liganden von TLR4 sind Lipopolysaccharide, wie sie auch in der äußeren Zellmembran der gramnegativen Salmonellen vorkommen. Die Erkennung von gramnegativen Bakterien durch TLR4 führt zu einer frühen Stimulierung einer Zytokin-Expression durch Monozyten, zu einer Rekrutierung und Aktivierung von phagozytischen Zellen und eventuell zu einer zellvermittelten adaptiven Immunität [138, 827, 828]. Es kommt zu einer Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 p40) [828]. Aber Zink hat nicht nur einen Effekt auf die TLR4-induzierte Aktivierung des zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktors, sondern ist auch für das Pathogen selbst von essentieller Bedeutung, z. B. als Cofaktor von Enzymen [669].

Im Hinblick auf den Zinkoxid-Fütterungsversuch und den *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch wurden zunächst mit Hilfe der Wanner Mutagenese neun Deletionsmutanten von *S. Typhimurium* SL1344 erstellt. Dabei wurden Gene deletiert, die eine wichtige Bedeutung für den Zinktransport oder die Regulation/Toleranz übernehmen. Außerdem wurde ein alternatives Sekretionssystem (ZirTS) von *Salmonella* untersucht, welches zinkabhängig ist und vermutlich als Antivirulenz-Mechanismus für eine erhöhte Wirtstransmission von

*Salmonella* von Bedeutung ist. Diese Mutanten wurden *in vitro* hinsichtlich ihrer Wirtszell-Invasion sowie der intrazellulären Persistenz in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, PLN/C2) untersucht. Die Versuche sollten zeigen, ob die Virulenz bzw. die Pathogenese von *Salmonella* durch exogenes Zink als Futterzusatzstoff beeinflusst werden kann. Es wurden Deletionsmutanten von *znuA*-, *B*- und *BC*, *zur*, *zraP*, *mntH*, *zirS*, *zirT* und *zirTS* hergestellt. Neben den *In-vitro*-Untersuchungen wurden *in vivo* zwei Tierversuche durchgeführt (ZnO-Fütterungsversuch, *Salmonella* challenge ZnO-Versuch). Im ZnO-Fütterungsversuch wurde in drei verschiedenen Versuchsgruppen (50, 150 oder 2500 mg ZnO/kg Futter) das Genexpressionsmuster unterschiedlicher immunologisch bedeutsamer Gene (IL-8, IL-10, CD86 [B7.2]) überprüft. Daneben wurden Gene untersucht, die für Peptidoglykan-Sensoren codieren (intrazellulär/zytosolisch: Nod1 und Nod2, löslich: PGLYRP-1, -2A und -2B).

Der Ligand von Nod1 ist meso-DAP, somit fungiert Nod1 hauptsächlich als Sensor für gramnegative Bakterien. Nod2 erkennt DAP und stellt damit einen generellen Sensor für grampositive und gramnegative Bakterien dar [144, 153]. Die Ligandenerkennung durch die Nod-Proteine führt letztendlich zur Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [144, 153]. Neben den Nod-Proteinen sind die PGRPs eine weitere Familie von PRRs, die auch über antibakterielle Wirkung sowie teilweise über Amidase-Aktivität verfügen. Das Nod-Signaling ist über Peptidoglykan, NF- $\kappa$ B und inflammatorische Zytokine eng mit den PGLYRPs verbunden. Die PGLYRPs mit Amidase-Aktivität (PGLYRP-2) produzieren PGN-Fragmente (MDP), welche die Liganden von Nod1 sind. Auf der anderen Seite kommt es aufgrund der Ligandenerkennung durch Nod1 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und den Zielgenen (pro-inflammatorische Zytokine). Die Zytokine wie auch der Transkriptionsfaktor selbst lösen eine verstärkte Expression der Nod-Proteine und von PGLYRP-2 aus. Außerdem ist die Expression von PGLYRP-1 ebenfalls von NF- $\kappa$ B abhängig [786]. Die Expression von PGLYRP-2 kann in Epithelzellen durch bakterielle Antigene (PGN, LPS) stimuliert werden [187–189]. Aufgrund der bestehenden Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genen (Zytokine, ko-stimulatorisches Molekül, Inhibitor der T-Zell-Aktivierung, Nod-Proteine, PGRPs) sowie des Einflusses von Zink ( $Zn^{2+}$ ) auf einzelne Komponenten wurden Genexpressionsanalysen während eines ZnO-Fütterungsversuches durchgeführt sowie nachfolgend der Einfluss einer zusätzlichen Infektion mit dem gastrointestinalen Pathogen *S. Typhimurium* DT104 untersucht.

## **5.6. Bestimmung der Invasionseffizienzen und intrazellulären Persistenzen der *Salmonella*-Deletionsmutanten**

Um zunächst einmal zu überprüfen, welchen Effekt die Deletion verschiedener Gene bzw. die Gabe von exogenem Zink auf die Virulenz und Pathogenese von *S. Typhimurium* hat, wurden Deletionsmutanten hergestellt und hinsichtlich ihrer Invasionseffizienzen und

intrazellulären Persistenz in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, PLN/C2) überprüft. Dazu wurden  $\Delta znuA$ ,  $-B$  und  $-BC$ ,  $\Delta zur$ ,  $\Delta zraP$ ,  $\Delta mntH$ ,  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  Mutanten untersucht (Abbildung 50 – Abbildung 56). Diese Gene codieren für ein Zink-Aufnahmesystem (ZnuABC) und den dazugehörigen Repressor (Zur), ein zinkabhängiges NRAMP-Homolog (MntH), welches ein Metallionen-Transporter ist, ein Protein (ZraP), welches in die Zink-Toleranz involviert ist sowie ein alternatives, von der Zink-Konzentration im umgebenden Medium abhängiges, Sekretionssystem (ZirTS).

Zu den Strategien eines Wirtes zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen gehört auch die Inhibierung des bakteriellen Wachstums durch die Limitierung der Verfügbarkeit von essentiellen Spurenelementen [829]. Der ZnuABC-Transporter und sein Repressor Zur wurden ursprünglich in *Escherichia coli* als ein System zur Beschaffung von Zink unter Zinkmangelbedingungen beschrieben. Nachfolgend wurde das System in verschiedenen Spezies gramnegativer Bakterien identifiziert [708]. In der Literatur konnten verschiedene Studien zeigen, dass das Zink-Aufnahmesystem ZnuABC einen wichtigen Beitrag zur Fähigkeit vieler Pathogene, sich im infizierten Wirt zu vermehren, leistet [830]. Wenn Bakterien in einer Umgebung wachsen, in der die Verfügbarkeit von Zink sehr gering ist, wird der Zinkimport durch den hochaffinen ZnuABC-Transporter sichergestellt, dessen Synthese streng kontrolliert wird durch die Bindung des Metallions (Corepressor von ZnuABC) an Zur (Repressor von ZnuABC) und wiederum dessen Bindung an den Promotor der *znu*-Gene [674]. Die Expression von *znuABC* in *S. Typhimurium* wird bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Zink im Kulturmedium unterdrückt, dagegen konnte in *S. Typhimurium*, die aus der Milz von infizierten Mäusen oder aus kultivierten Zellen (Epithel- und Makrophagen-ähnliche Zellen) isoliert wurden, eine verstärkte Expression gefunden werden [671]. Da die Konzentration von Zink in eukaryotischen Zellen bei etwa 0,2 mM liegt, weist dies darauf hin, dass die für die Mikroorganismen bei einer Infektion tatsächlich frei zur Verfügung stehende Menge an Zink stark limitiert ist und der ZnuABC-Transporter eine essentielle Rolle bei der Bereitstellung des Spurenelements spielt [675]. Liu *et al.* (2012) konnten zeigen, dass eine Calprotektin-vermittelte Bindung von essentiellen Spurenelementen, wie z. B. Zink, die Persistenz von *S. Typhimurium* nicht inhibieren kann [831]. Calprotektin ist ein antimikrobielles Peptid, welches eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen besitzt und so die Anzahl der frei verfügbaren Ionen verringert [832, 833]. Die Studie konnte eine erhöhte Expression des antimikrobiellen Peptids als Antwort auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* nachweisen [831]. Allerdings konnte nicht, wie erwartet, eine Inhibierung des Wachstums beobachtet werden, sondern im Gegenteil eine verstärkte Persistenz gegenüber den anderen konkurrierenden Bakterien [831, 833]. Ferner konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der hochaffine ZnuABC-Transporter unter diesen Bedingungen einen enormen Vorteil für *S. Typhimurium* bietet und die Ursache für das vermehrte Wachstum bzw. die „Immunität“ gegenüber Calprotektin ist [831].

Bei der Untersuchung der  $\Delta znuABC$ -Mutanten konnte festgestellt werden, dass diese Mutationen sowohl in intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2), als auch in Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) teilweise zu einer geringfügig reduzierten intrazellulären Invasionsrate führen (Abbildung 50, Abbildung 51). Signifikanzen konnten jedoch nicht ermittelt werden. Der ZnuABC-Transporter ist vor allem unter Zinkmangel-Bedingungen von entscheidender Bedeutung. Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  scheinen schon ausreichend zu sein [671]. Im Zellkulturmedium der IPEC-J2 (DMEM/HAM's F12) sind 0,432 mg/l  $\text{ZnSO}_4$  enthalten. Dies entspricht 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  und stellt an sich keinen Zinkmangel dar. Daneben wurde dem Medium 10 % FKS zugesetzt. Im FKS liegt die Konzentration von Zink bei etwa 1 mg/l (entspricht ca. 3,5 – 7,3  $\mu\text{M}$ ). Allerdings konnte schon gezeigt werden, dass in der Zellkultur verschiedene Faktoren die freie Verfügbarkeit von Metallionen limitieren. Geht man von einer Konzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  aus, so würde es nach Ammendola *et al.* (2007) zu einer Inhibierung der Expression der *znuABC* Gene in *S. Typhimurium* kommen [671]. Dementsprechend dürfte eine Mutation dieser Gene aufgrund der nicht vorhandenen Notwendigkeit keine großen Auswirkungen auf die Virulenz des Pathogens haben. Da allerdings nicht bekannt ist, ob und in welchem Ausmaß es *in vitro* tatsächlich zu einer Limitierung von Zink gekommen ist, könnten die leicht erniedrigten Invasioneffizienzen von  $\Delta znuA$ ,  $-B$  und  $-BC$  möglicherweise dadurch erklärt werden, dass *S. Typhimurium* mit einem mutierten Gen und dadurch nicht funktionsfähigem Zink-Aufnahmesystem einen Nachteil gegenüber dem Wildtyp-Stamm haben. Die Mutationen des *znuABC* Gens wirken sich jedoch nur auf die Wirtszellinvasion und nicht auf die intrazelluläre Persistenz aus. Allerdings wirkt sich die reduzierte Invasionsrate auch auf die intrazelluläre Keimzahl nach 24 Stunden aus. Diese bleibt für die drei Mutanten-Stämme hinter denen des Wildtyps zurück.

Die Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) werden in Basal Iscove's Medium kultiviert. Dieses Medium enthält laut Hersteller keinen Zinkzusatz. Aber auch hier wurde FKS als Zusatz eingesetzt. Aufgrund der insgesamt niedrigeren Konzentration von Zink im Zellkulturmedium würde man aus diesem Grund davon ausgehen, dass die Mutationen im Vergleich zu IPEC-J2 Zellen einen größeren Einfluss haben. Dies konnte für die  $\Delta znuA$  und  $-BC$  Mutanten auch beobachtet werden. Die reduzierte Invasioneffizienz war allerdings nicht signifikant. Es scheint also so, als ob die Mutationen die Invasionsraten von *S. Typhimurium* beeinflussen. Die intrazellulären Wachstumsraten von  $\Delta znuA$ ,  $-B$  und  $-BC$  über 20 Stunden waren gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abbildung 50, Abbildung 51). Dies könnte vielleicht eine Art Kompensation der niedrigen Invasionsrate sein. Trotzdem sind die intrazellulären CFU nach 24 Stunden teilweise signifikant geringer als die des Wildtyp-Stammes.

Insgesamt konnte für die  $\Delta znuABC$ -Mutanten eine verringerte Invasionsrate gefunden werden, was ein Hinweis auf die essentielle Bedeutung des Zink-Importsystems ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass dieser Transporter *in vitro* auch unter „Normalbedingungen“ benötigt wird, um eine erfolgreiche Wirtszellinvasion zu ermöglichen. Eine weniger große

Rolle scheint der ZnuABC-Transporter allerdings unter den beobachteten Bedingungen für das intrazelluläre Wachstum über 20 Stunden zu spielen.

Das Zur-Protein wirkt zusammen mit  $Zn^{2+}$ -Ionen (Corepressor) als Repressor der *znuABC*-Gene. Zur ist ein metallregulatorisches Protein, welches in Anwesenheit von Zink-Ionen an eine fast perfekte Palindrom-Sequenz im *znuABC*-Operon bindet und so die Transkription der Gene blockiert [834]. Die Anwesenheit von Metall-Chelatoren inhibiert die Bindung von Zur an die DNA und lässt so die Gene von *znuABC* zur Transkription frei [708]. Mindestens 2 – 3  $Zn^{2+}$ -Ionen binden pro Dimer an Zur [834]. Vermutlich werden die Zinkionen hauptsächlich von den neun Cystein-Resten gebunden, die in Zur gefunden worden sind [834]. Zur ist weitverbreitet unter den Bakterien und *zur*-Gene konnten in einer Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie in Cyanobakterien nachgewiesen werden [708]. Bei Zinkkonzentrationen unter 1  $\mu$ M findet keine Blockierung der Transkription der *znuABC* Gene durch Zur mehr statt [671].

Sowohl in den porzinen intestinalen Epithelzellen als auch in den Makrophagen-ähnlichen Zellen konnte eine signifikant reduzierte Wirtszellinvasion des  $\Delta$ *zur*-Mutanten im Vergleich zum *S. Typhimurium* Wildtyp-Stamm detektiert werden (Abbildung 52 – Abbildung 54). Im Kontrast zu diesen Ergebnissen stehen die Beobachtungen von Campoy *et al.* (2002), die ebenfalls die Invasionsrate und das intrazelluläre Wachstum eines  $\Delta$ *zur*-Mutanten von *S. Typhimurium* in Epithelzellen (porzine PK15) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (murine RAW264.7) untersucht haben [672]. Campoy *et al.* (2002) konnten keine Unterschiede zwischen dem  $\Delta$ *zur*-Mutanten und dem Wildtyp-Stamm hinsichtlich der Invasionseffizienz und dem intrazellulären Überleben finden [672]. Bezüglich der intrazellulären Persistenz konnten in den IPEC-J2 und 3D4/31 ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede verglichen mit dem Wildtyp-Stamm beobachtet werden. Campoy *et al.* (2002) haben allerdings auch eine vergleichsweise kurze Infektionszeit (20 Min.) für ihre Versuche gewählt [672]. In der vorliegenden Arbeit wurden die extrazellulären Bakterien erst nach 30 (3D4/31) bzw. 60 Min. (IPEC-J2) mit Gentamycin abgetötet. Vielleicht können diese etwas verlängerten Zeiträume die Unterschiede bei der Invasionseffizienz besser darstellen. Die reduzierte Invasionseffizienz der  $\Delta$ *zur*-Mutanten könnte darauf zurückzuführen sein, dass keine Regulation der Transkription der Gene des ZnuABC-Zinkimportsystems mehr stattfindet. Dies führt zu einer kontinuierlichen Expression von ZnuABC und damit auch zu einer steten Aufnahme von Zinkionen in die Bakterienzelle. Dort könnte es im Folgenden zu einer Anreicherung von Zink und damit zu einer toxischen Wirkung kommen. Andererseits könnte damit nicht erklärt werden, warum die intrazelluläre Persistenz durch eine Mutation von *zur* nicht beeinflusst wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Zur zusätzliche, bislang unbekannte Funktionen bei der Regulation weiterer Gene übernimmt, die für die Wirtszellinvasion von Bedeutung sind. In der Literatur wird diesbezüglich allerdings davon ausgegangen, dass Zur nur die Funktion als Regulator des Zink-Imports übernimmt und die

Expression von wenigen Genen kontrolliert, die für die Antwort auf einen Zinkmangel von Bedeutung sind [675]. Bislang konnten in *E. coli* neben der Bindung an *znuABC* nur zwei weitere Bindungsstellen von Zur auf der DNA gefunden werden [708].

Diese Ergebnisse könnten auch darauf hindeuten, dass das Zur-Protein möglicherweise eine essentielle Rolle beim frühen Überleben in Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, PLN/C2) spielt. Eine wichtige Frage ist, ob es sich um eine geringere Invasionsrate handelt oder um frühes Abtöten durch Makrophagen. Eventuell beeinflusst das Zur-Protein die frühe Abwehr des Abtötens durch Makrophagen. Der Verlust des *zur*-Gens erhöht vielleicht die Sensitivität von *Salmonella* gegenüber NRAMP-1-abhängigen Metallionen-Pool-Veränderungen. Nach der Invasion in Makrophagen ist *Salmonella* einer großen Menge Superoxid in der direkten Umgebung ausgesetzt, die durch die antimikrobiellen Abwehrmechanismen in der eukaryotischen Zelle produziert werden [835]. Beispielsweise könnte die Anfälligkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies in der frühen Phase nach der Aufnahme in die phagozytierenden Zellen beeinflusst werden. Die Expression von NRAMP-1 ist hauptsächlich auf Makrophagen und polymorphonukleäre Zellen beschränkt und z. B. die bakterielle Superoxid-Dismutase (SOD) benötigt Zink für ihre Funktion [835, 836]. In den intestinalen Epithelzellen konnte allerdings auch eine verringerte Invasionsrate detektiert werden, welche dadurch nicht erklärt werden könnte. Diese ist aber im Gegensatz zu den Makrophagen-ähnlichen Zellen auch nicht signifikant.

Weder für das NRAMP-Homolog von *Salmonella* (MntH), einen Protonen-abhängigen Metallionen-Transporter, als auch für ZraP, ein zinkbindendes Protein welches von entscheidender Bedeutung für eine Zink-Toleranz ist, konnte in den porzinen intestinalen Epithelzellen und den Makrophagen-ähnlichen Zellen unter den untersuchten Bedingungen ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Invasionseffizienz und dem intrazellulären Wachstum beobachtet werden (Abbildung 52 – Abbildung 54). Die  $\Delta zraP$ - und  $\Delta mntH$ -Mutanten weisen eine mit dem Wildtyp vergleichbare Invasionsrate und intrazelluläre Persistenz auf. MntH und ZraP scheinen dementsprechend unter den gegebenen Bedingungen keine essentielle Bedeutung für die Invasion in die Wirtszelle bzw. das intrazelluläre Wachstum zu haben.

Als letztes wurden die Invasionseffizienzen und das intrazelluläre Wachstum der  $\Delta zirTS$ -Mutanten untersucht (Abbildung 55, Abbildung 56). Der ZirTS-Sekretionsweg besteht, soweit bislang aufgeklärt, aus drei Komponenten. ZirT ist die Membrankomponente, welche ZirS und ZirU in die Umgebung sezerniert [650]. Die genauen Funktionen von ZirS und ZirU sind noch nicht aufgeklärt. Ein erstes Modell dieses neuen Antivirulenz-Mechanismus stellten Prehna *et al.* (2012) auf. Danach handelt es sich um ein Multiprotein-Immunglobulin-Adhäsions-System, welches von *Salmonella* dazu verwendet wird, die Virulenz zu verringern, indem sie die bakterielle Kolonisation an den systemischen Orten verringern und so letztendlich eine höhere Wirts-Transmission erreichen [650]. Interessanterweise konnte in



der vorliegenden Arbeit eine bis zu 100-fach verringerte Invasionsrate für  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  im Vergleich zum Wildtyp-Stamm gefunden werden. Dieser Defekt bei der Wirtszellinvasion war sowohl in den intestinalen Epithelzellen, als auch in den Makrophagen-ähnlichen Zellen zu beobachten (Abbildung 55, Abbildung 56). Allerdings war diese reduzierte Invasionseffizienz nicht signifikant. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Zahl an intrazellulären Bakterien sehr niedrig war und somit schon scheinbar geringe Unterschiede zwischen den Einzelwerten große Auswirkungen auf die Signifikanzen hatten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der alternative Sekretionsweg ZirTS eine essentielle Bedeutung bei der Wirtszellinvasion, der frühen Phase der Infektion hat. In der Literatur konnten Gal-Mor *et al.* (2008) zeigen, dass ZirTS eine wichtige Rolle als Virulenz-Regulator in der frühen Phase der Infektion spielt. *S. Typhimurium* wird hauptsächlich über den fäkal-oralen Weg übertragen. Die Expression von *zirT* wird im Dünndarm induziert und ist im Fäzes konstant [648]. Dementsprechend scheint ZirTS nicht nur die Kolonisation an systemischen Orten zu verhindern und so den Wirt länger am Leben zu erhalten, sondern auch für die Invasion in die neue Wirtszelle ausschlaggebend zu sein. Gal-Mor *et al.* (2008) haben unabhängig von den hier verwendeten Mutanten ebenfalls  $\Delta zirTS$ -Mutanten hergestellt und untersucht. In Mäusen führte dieser  $\Delta zirTS$ -Mutant zu einem hypervirulenten Phänotyp [648]. In den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) konnte eine erhöhte intrazelluläre Wachstumsrate für die drei Mutanten ( $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$ ,  $\Delta zirTS$ ) gezeigt werden. Dies könnte eine Erklärung für den von Gal-Mor *et al.* gesehenen hypervirulenten Phänotyp sein. Allerdings bleiben die intrazellulären Keimzahlen von  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  nach 24 Stunden in den IPEC-J2 trotzdem signifikant hinter denen des Wildtyp-Stammes zurück. In den 3D4/31 Makrophagen konnte dagegen ein tendenziell reduziertes intrazelluläres Wachstum von  $\Delta zirS$ ,  $\Delta zirT$  und  $\Delta zirTS$  über 20 Stunden detektiert werden. ZirTS könnte folglich sowohl eine entscheidende Bedeutung für die Invasion in die Wirtszelle spielen, als auch die intrazelluläre Persistenz beeinflussen. Das in den IPEC-J2 detektierte erhöhte intrazelluläre Wachstum könnte eine Art „Kompensation“ der geringen Invasionsrate sein. Diesbezüglich konnten frühere Studien schon zeigen, dass eine Wirtszellinvasion für *Salmonella* nicht erforderlich ist, um über die intestinale Wand zu gelangen, sondern dass phagozytierende Zellen im Gastrointestinaltrakt eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme und Verbreitung von *Salmonella* an systemischen Orten spielen [625, 837].

Gal-Mor *et al.* (2008) konnten außerdem einen Einfluss von Zink auf die Expression von *zirTS* zeigen. Durch die Anwesenheit von Zink im umgebenden Medium wird die Expression dieser Gene gehemmt. Werden die Bakterien auf M9-Minimalmedium mit bzw. ohne 0,5 mM  $ZnSO_4$  angezogen, so konnte nach Zinkzusatz eine 2,0 – 2,5-fach reduzierte Expression von *zirT* und *zirS* nachgewiesen werden [648]. Um zu überprüfen, welchen Einfluss ein Zinkzusatz im Zellkulturmedium auf die Invasionsrate und die intrazelluläre Persistenz von *S. Typhimurium* Wildtyp und die des  $\Delta zirTS$ -Mutanten hat, wurden die Zellen zu

unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei Stunden vor der Infektion, direkt vor und während der Infektion, zwei Stunden nach der Infektion) mit 1 mM ZnSO<sub>4</sub> behandelt.

Erfolgte die Zinkbehandlung über zwei Stunden vor der Infektion, so konnte in den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 und PLN/C2 gegenüber der Infektion ohne Vorbehandlung der Zellen eine deutlich reduzierte Invasionsrate für den Wildtyp und  $\Delta zirTS$  detektiert werden (3D4/31, Wildtyp um ca. 76 % reduziert;  $\Delta zirTS$  um ca. 81,5 % reduziert, Abbildung 57). Dabei scheint sich die Zinkbehandlung geringfügig stärker auf den  $\Delta zirTS$ -Mutanten auszuwirken, als auf den Wildtyp-Stamm. Die zweistündige Vorinkubation der Zellen mit 1 mM ZnSO<sub>4</sub> führte in beiden untersuchten Zelllinien zunächst zu einem starken intrazellulären Wachstum (4-h-/2-h-Wert) von Wildtyp- und Mutanten-Stamm. Vier Stunden nach der Infektion kam es allerdings zu einem Einknicken des Wachstums. Ab diesem Punkt war die intrazelluläre Persistenz nur noch sehr gering, bzw. das Wachstum hörte ganz auf. Von Gal-Mor (2008) konnte bezüglich einer Zinkbehandlung gezeigt werden, dass Konzentrationen ab 0,5 mM zu einer reduzierten Expression der *zirTS*-Gene führen. Folglich könnte es sein, dass im Fall einer Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM Zinksulfat die Expression von *zirTS* im Wildtyp ebenfalls verringert wird und es aufgrund des fehlenden ZirTS-Sekretionssystems zu einem Wachstumsdefizit kommt. In den 3D4/31 Makrophagen bringt eine Mutation der Gene von *zirTS* auch ohne eine Vorbehandlung der Zellen ein verringertes intrazelluläres Wachstum mit sich. Allerdings führte die Zinkbehandlung bei beiden Stämmen zu diesem deutlich reduzierten intrazellulären Wachstum, was auch ein Hinweis auf eine antibakterielle Wirkung von Zink sein könnte, die weniger mit dem ZirTS-Sekretionssystem zu tun hat, sondern vielmehr ein genereller Mechanismus ist.

Werden die Zellen erst zwei Stunden nach der Infektion mit *Salmonella* mit Zinksulfat behandelt, erfolgte zunächst eine von Zinksulfat unabhängige Wirtszellinvasion. Ein Einknicken des Wachstums konnte in beiden Zelllinien (3D4/31, PLN/C2) nicht beobachtet werden (Abbildung 57). Stattdessen erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der CFU. Das intrazelluläre Wachstum von Wildtyp und  $\Delta zirTS$  über 20 Stunden (24-h-/4-h-Wert) war gegenüber dem über zwei Stunden (4-h-/2-h-Wert) deutlich erhöht und vergleichbar mit dem Wachstum, das in unbehandelten Zellen beobachtet werden konnte. Das Wachstum über zwei Stunden (4-h-/2-h-Wert) lag unter dem, welches in den Zellen mit Zinksulfat-Vorbehandlung beobachtet werden konnte. Hier scheint es so zu sein, als ob die Bakterien nach erfolgter Wirtszellinvasion zunächst einmal stark wachsen, dann das Wachstum einknickt und fast gänzlich eingestellt wird (Abbildung 57). Zwar wurde das zinkhaltige Medium direkt vor der Infektion mit *Salmonella* wieder entfernt und gegen frisches Medium ohne Zinkzusatz getauscht, allerdings könnte es im Verlauf der zweistündigen Behandlung zu einer Akkumulation von Zink in den Zellen gekommen sein, sodass dort ein insgesamt höheres Angebot an Zink und damit wahrscheinlich auch an frei verfügbarem Zink vorlag. Dies könnte zunächst zu einem Wachstumsschub aufgrund des erhöhten Angebots des

essentiellen Spurenelementes führen. Nach einer gewissen Zeit scheint das Zink jedoch inhibitorisch bzw. bakterizid auf *Salmonella* zu wirken und führt zu einem verminderten Wachstum und teilweise auch zu einer Limitierung der Bakterienzahl. Surjawidjaja *et al.* (2004) untersuchten in ihrer Studie die Wachstumsinhibierung von enteropathogenen Keimen durch Zinksulfat [838]. Dabei verwendeten sie Müller-Hinton-Agarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen Zinksulfat (0 – 2 mg/ml). *S. typhi* reagierte schon auf geringe Zinksulfat-Konzentrationen (0,8 mg/ml, 20 % Inhibierung) sensitiv [838]. Für *Salmonella* aus Gruppe B (O-Antigen Gruppe B, z. B. *S. Typhimurium*) erfolgte eine 10%ige Wachstumsinhibierung ab einer Konzentration von 1 mg/ml Zinksulfat [838]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit einer 1 mM  $ZnSO_4$ -Lösung behandelt, dies entspricht 0,288 mg/ml. Die 2-stündige Vorbehandlung führte vier Stunden *p. i.* zu einer Wachstumsinhibierung. In einer weiteren Studie untersuchten Xie *et al.* (2011) die antibakterielle Wirkung von ZnO-Nanopartikeln auf *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis und *Escherichia coli* O157:H7 [839]. Die Wachstumsinhibierung wurde sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur überprüft. Eine Konzentration von 0,4 mg/ml ZnO wirkte dabei in Form von Nanopartikeln inhibitorisch auf *S. Enteritidis* [839]. Dementsprechend scheint die Wachstumsinhibierung von *Salmonella* einerseits abhängig vom Serovar zu sein, andererseits auch von der Form, in der das Zink (ZnO Nanopartikel,  $ZnSO_4$ ) verwendet wird. Ferner gibt es Unterschiede dabei, ob die Bakterien auf Zink-haltigen Agarplatten oder in der Zellkultur mit hohen Zink-Konzentrationen konfrontiert werden. Zu beachten ist außerdem, dass bei der Verwendung von Agarplatten nicht davon ausgegangen werden kann, dass das zugesetzte Zink überall in gleichmäßiger Konzentration vorhanden ist. Vielmehr könnte es auch sein, dass die Aufnahme von Zink aus dem Agar schneller erfolgt, als weiteres Zink an die Oberfläche diffundiert und so um die Kolonien herum ein Mangel herrscht, obwohl die Agarplatten hohe Konzentrationen an Zink enthalten.

Als letztes wurde die Behandlung der Zellen mit 1 mM  $ZnSO_4$  direkt vor und während der Infektion (über zwei Stunden) untersucht (Abbildung 58). Auch hier konnte in beiden untersuchten Zelllinien (3D4/31, PLN/C2) eine negative Beeinflussung der Invasionsrate beobachtet werden. Für den *S. Typhimurium* SL1344-Wildtyp-Stamm konnte in den 3D4/31 Zellen eine um ca. 75 % und für den  $\Delta zirTS$ -Mutanten eine um ca. 88,4 % reduzierte Invasionsrate gegenüber den Werten in den unbehandelten Zellen beobachtet werden. Demzufolge scheint auch bei der Zinkbehandlung während der Infektion mit enteropathogenen Salmonellen der  $\Delta zirTS$ -Mutant stärker beeinflusst zu werden, als der Wildtyp-Stamm. Im Gegensatz zur 2-stündigen Zinkvorbehandlung der Zellen, kommt es bei der Behandlung während der Infektion nicht zu einem Knick im bakteriellen Wachstum vier Stunden *p. i.* Über die beobachteten 24 Stunden kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der CFU. Das Wachstum über 20 Stunden (24-h-/4-h-Wert) ist dabei in den 3D4/31

Makrophagen verglichen mit dem bakteriellen Wachstum in den Zellen ohne Zink-Behandlung deutlich verstärkt (Abbildung 58). Für den Wildtyp-Stamm konnte eine um ca. 98 % erhöhte Wachstumsrate gefunden werden, für  $\Delta zirTS$  war sie sogar um ca. 824 % erhöht. Nach der anfänglich deutlich verringerten Invasionseffizienz konnte eine verstärkte intestinale Persistenz von *S. Typhimurium* SL1344-Wildtyp-Stamm und  $\Delta zirTS$  beobachtet werden. Die bakterizide Wirkung des Zinksulfats scheint sich bei einer Behandlung direkt vor und während der Infektion auf den Prozess der Wirtszellinvasion bzw. auf die zur Infektion auf die Zellen applizierten Bakterien zu beschränken. Nach der Invasion erfolgte ein verstärktes intrazelluläres Wachstum, sodass nach 24 Stunden eine ähnliche intrazelluläre Keimzahl für beide untersuchten Stämme beobachtet werden konnte, wie sie in den Zellen ohne Zink-Behandlung gefunden wurde. Es scheint also eine Art „Kompensation“ der niedrigen Wirtszellinvasion stattgefunden zu haben. Verwunderlich ist, dass nicht wie bei der 2-stündigen Behandlung vor der Infektion eine Inhibierung des Wachstums stattgefunden hat (Abbildung 58). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für die Behandlung der Zellen mit Zinksulfat nach der Infektion detektiert werden. Hier erfolgte ein „normales“, von der Zink-Behandlung nicht beeinflusstes Wachstum (Abbildung 57). Insgesamt scheint es so, als ob die Zinksulfat-Behandlung am effektivsten bei einer Vorbehandlung der Zellen ist. Die verringerte Invasionseffizienz bei gleichzeitiger Behandlung mit Zinksulfat wird später durch ein verstärktes Wachstum kompensiert. Eine Nachbehandlung hat keinerlei Einfluss auf die intrazelluläre Persistenz. Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Wachstumsinhibierung eher auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort zurückgeht, als auf eine direkte toxische Wirkung von Zink. Für einige antimikrobielle Peptide konnte eine Zink-Abhängigkeit bereits beobachtet werden. Beispielsweise benötigen PGLYRPs Zink für ihre biologische Aktivität (antibakterielle Aktivität, Muramidase-Aktivität) [190, 191]. Verschiedene weitere antimikrobielle Peptide sowie einige Peptidoglykan-lyosierende Enzyme benötigen ebenfalls  $Zn^{2+}$  für ihre antimikrobielle Funktion [196–199]. Es könnte also sein, dass aufgrund der Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat diese vermehrt Zink aufgenommen haben und so die Immunabwehr insgesamt besser aufgestellt ist sowie verschiedene zinkabhängige Abwehrproteine schneller funktionsfähig sind. Erfolgt die Zinkbehandlung erst während oder nach der Infektion mit *S. Typhimurium* gibt es diesen Vorteil für die Immunabwehr nicht. Die reduzierte Invasionseffizienz, die sowohl bei einer Behandlung vor als auch während der Infektion beobachtet werden konnte geht vermutlich auf die bakterizide Wirkung von Zink selbst zurück.

Neben der Behandlung mit Zinksulfat wurden die Zellen auch mit 1 mM Zinkchlorid ( $ZnCl_2$ ) behandelt. Dabei konnte sowohl in den intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 als auch in den Makrophagen-ähnlichen Zellen 3D4/31 hinsichtlich der Invasionsrate von *S. Typhimurium* SL1344-Wildtyp-Stamm und  $\Delta zirTS$  keine negative Beeinflussung durch eine Vorinkubation der Zellen beobachtet werden. Auch auf die intrazelluläre Persistenz scheint die Zinkchlorid-

Vorbehandlung keinen Einfluss zu haben. Folglich scheint die Zink-Form ebenfalls eine entscheidende Rolle hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung zu spielen. Wie bereits erwähnt führen Zinkoxid-Nanopartikel schon ab einer Konzentration von 0,4 mg/ml zu einer Wachstumsinhibierung von *Salmonella*, wohingegen dazu mindestens 0,8 mg/ml Zinksulfat notwendig sind. Auch wenn *in vitro* in den porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen eine Zinksulfat-Konzentration von 0,288 mg/ml (1 mM) zur Wachstumsinhibierung von *S. Typhimurium* ausgereicht hat, so könnte die Zinkchlorid-Konzentration von 0,137 mg/ml (1 mM) trotzdem nicht ausreichend für eine Inhibierung gewesen sein. Weitere Versuche mit einer höheren Zinkchlorid-Konzentration könnten dies klären.

Für den Doppelmutanten  $\Delta zirTS$  konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine erhöhte Wachstumsrate über 20 Stunden detektiert werden, unabhängig davon, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit Zinkchlorid stattgefunden hat oder nicht. Diese Beobachtung könnte die schon aufgestellte Hypothese bestärken, dass die deutlich niedrigere Wirtszellinvasion durch ein verstärktes Wachstum kompensiert wird und die Invasion alleine nicht ausschlaggebend ist, sondern auch phagozytierende Zellen im Gastrointestinaltrakt eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme und Verbreitung der Salmonellen an systemischen Orten spielen.

Neben der Untersuchung der intrazellulären CFU wurde auch die Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B als Reaktion auf eine Infektion mit *S. Typhimurium* SL1344-Wildtyp-Stamm und  $\Delta zirTS$  mit und ohne Zinkchlorid-Vorbehandlung der Zellen überprüft. Ein Einfluss der Zinkchlorid-Behandlung konnte, wie schon für die Invasionsraten und die intrazelluläre Persistenz, nicht beobachtet werden. Interessanterweise wurde zwei Stunden *p. i.* durch  $\Delta zirTS$  trotz der signifikant verringerten Invasionsrate eine vergleichbare (IPEC-J2) bzw. sogar leicht gegenüber dem Wildtyp erhöhte (3D4/31) NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet (vergleiche Abbildung 59 und Abbildung 60 mit Abbildung 61 und Abbildung 62). Am Höhepunkt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in den intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, 4 h *p. i.*) konnte eine signifikant verringerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors nach Stimulierung mit  $\Delta zirTS$  im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. In den 3D4/31 Makrophagen wurde ein ähnliches Ergebnis 24 Stunden *p. i.* beobachtet. 24 h *p. i.* in den IPEC-J2 und vier Stunden *p. i.* in den 3D4/31 konnte dagegen wieder eine leicht erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach Behandlung mit  $\Delta zirTS$  im Vergleich zum Wildtyp gesehen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf insgesamt hin, dass für eine Stimulierung von NF- $\kappa$ B die Anzahl der Bakterien nicht ausschlaggebend ist. Eine Auswirkung konnte nur auf die maximale NF- $\kappa$ B-Aktivierung beobachtet werden. Dort zeigte sich eine signifikant niedrigere Aktivierung des Transkriptionsfaktors nach Stimulierung mit dem  $\Delta zirTS$ -Mutanten. Die großen Unterschiede bei der intrazellulären Keimzahl spiegeln sich nicht in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B wider. Dementsprechend scheint die Aktivierung des Transkriptionsfaktors auf einem Schwellenwert zu beruhen, der durch die Bakterienzahl (bakterielle Antigene) von  $\Delta zirTS$

ebenfalls überschritten wurde. Die immunogene Wirkung von  $\Delta zirTS$  scheint etwas stärker zu sein, als die des Wildtyp-Stammes, obwohl keine Signifikanzen erkennbar waren. Dies hängt vielleicht damit zusammen, dass das Antivirulenz-System ZirTS in diesem Klon nicht mehr aktiv ist.

Zusammengenommen konnten die durchgeführten Untersuchungen der verschiedenen Deletionsmutanten zeigen, dass es viele zinkabhängige Systeme von essentieller Bedeutung in *S. Typhimurium* gibt. Insbesondere die Invasionsrate scheint durch die hier untersuchten Mutationen stark beeinflusst zu werden. Die *znuABC*-Mutanten zeigten eine verglichen mit dem Wildtyp-Stamm reduzierte Invasionseffizienz, beim *zur*-Mutanten sowie den drei *zirTS*-Mutanten konnte eine deutlich bzw. zum Teil auch signifikant verringerte Wirtszellinvasion beobachtet werden. Eine Behandlung der Zellen mit Zinksulfat führte je nach Behandlungszeitpunkt (vor, während und nach der Infektion mit *Salmonella*) zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die größten Effekte konnten bei einer Behandlung vor der Infektion beobachtet werden. Dort war einerseits die Wirtszellinvasion deutlich reduziert, andererseits wurde auch nachfolgend die intrazelluläre Persistenz beeinflusst. Es kam zu einer Wachstumsinhibierung vier Stunden *p. i.* Dabei scheint sich die antibakterielle Wirkung von Zink hinsichtlich der Wirtszellinvasion stärker auf den  $\Delta zirTS$  Mutanten auszuwirken, als auf den Wildtyp-Stamm.

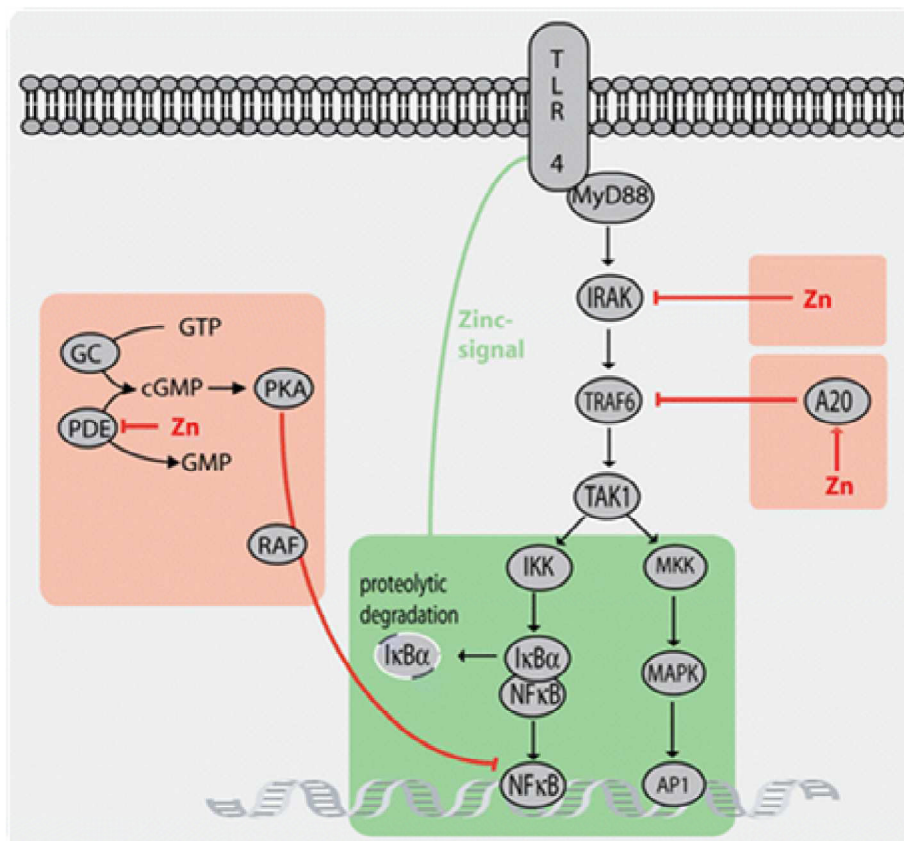
### 5.7. Zinkoxid-Tierversuche

Nachdem untersucht wurde, ob die Virulenz und/oder die Pathogenese von *S. Typhimurium* durch die Deletion unterschiedlicher Gene bzw. durch exogenes Zink beeinflusst werden kann und dabei einige Beobachtungen hinsichtlich verschiedener zinkabhängiger Systeme gemacht werden konnten, wurde innerhalb eines Zinkoxid-Fütterungsversuches die Expression verschiedener immunrelevanter Gene (IL-8, IL-10, CD86, PGLYRP-1, -2A und 2B, Nod1 und Nod2) überprüft.

Zum Zeitpunkt nach dem Absetzen (32 Tage *post partum*) konnte eine anti-inflammatorisch ausgerichtete Immunantwort, charakterisiert durch eine zum Teil signifikant verringerte Genexpressionsrate von IL-8 sowie eine reduzierte Expression des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 (Gruppe B) in den Geweben der intestinalen Wand, beobachtet werden (Abbildung 64 und Abbildung 66). Die Genexpression von IL-10 war dazu in den ilealen und jejunalen Peyer'schen Platten im Vergleich zur Expression von IL-8 höher (Abbildung 65). Die Periode des Absetzens bedeutet Stress für das Ferkel. Dabei kommt es zu Veränderungen in der sozialen Umgebung, der Haltungsumwelt und der Fütterung [343]. Kurz nach dem Absetzen kann insgesamt eine verminderte Immunfunktion festgestellt werden [7]. Die Ferkel haben nach dem Absetzen nicht mehr die Wahl zwischen festem Futter und der Milch der Muttersau. Es kommt zu einer kontinuierlichen Aufnahme des festen Futters und damit auch der unterschiedlich hohen Zinkoxid-Konzentrationen. Die Zufuhr der

hohen Zinkoxid-Mengen führt zunächst zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort. Diese könnte damit zusammenhängen, dass das Ferkeln in den Tagen nach dem Absetzen nicht nur mit der Futterumstellung und den anderen Stressfaktoren umgehen muss, sondern zusätzlich auch noch mit einer erhöhten bis sehr stark erhöhten Zink-Konzentration im Futter. In der Literatur konnten Bao *et al.* (2003) *in vitro* zeigen, dass Zink einen Einfluss auf die Genexpression und Produktion von Zytokinen hat. Dieser Effekt ist abhängig von der Zelllinie, die untersucht wird [554]. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass ein Zink-Defizit zu einem verminderten Expressionslevel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  in HUT-78 (humane T-Lymphom-Zelllinie, Th0) Zellen nach Stimulierung mit PMA/PHA führt [554]. Daneben löste ein Zink-Mangel eine erhöhte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-8 in HL-60 (humane Makrophagen-ähnliche Zelllinie) Zellen nach Stimulierung mit PMA/PHA aus [554]. In dieser Studie konnte weiterführend durch Versuche mit Actinomycen D (Zytostatikum, welches die RNA-Synthese hemmt) gezeigt werden, dass nicht die Stabilität der mRNA durch Zink beeinflusst wird, sondern die Expression der Gene für die verschiedenen Zytokine [554]. Hohe Zink-Konzentrationen führten in den D1.1 Zellen (humane T-Lymphom-Zelllinie, Th1) zu einer verstärkten Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$ . Dagegen wird die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-8 in den Makrophagen-ähnlichen Zellen (HL-60) supprimiert [554]. In einer früheren Studie von Connell *et al.* (1997) konnte beobachtet werden, dass eine Behandlung von Zink-defizienten Endothelzellen mit Zink zu einer verringerten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und einer verzögerten Expression von IL-8 als Reaktion auf eine Stimulierung mit TNF- $\alpha$  führt [840]. Eine mögliche Erklärung für die anti-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems könnte deshalb der direkte Einfluss von Zink auf die Aktivierung des zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sein, was auch die Expression der Zielgene (z. B. IL-8) beeinflussen würde und so bei einer Inhibierung der Aktivierung zu einer verzögerten bzw. verringerten Genexpression des pro-inflammatorischen Chemokins IL-8 führen würde. Bao *et al.* (2003) stellten bezüglich der Rolle von Zink bei der Regulation der Genexpression dieser pro-inflammatorischen Zytokine eine Hypothese auf [554]. Danach konnte in verschiedenen Studien schon gezeigt werden, dass ein Zinkfingerprotein, A20, die Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen *in vitro* über einen TNF Rezeptor-assoziierten Faktor inhibiert [841, 842]. In Endothelzellen konnten Jäättelä *et al.* (1996) zeigen, dass das A20-Protein die Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibiert und so auch die Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  reduziert [843]. Dementsprechend scheint A20 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen zu spielen und könnte auch an der Regulation der Genexpression im Fall der Zink-Behandlung beteiligt sein [554]. Bao *et al.* konnten in ihrer Studie nach Zink-Behandlung der PMA-stimulierten Zellen (HL-60) ein erhöhtes A20-Level beobachten [554]. Haase *et al.* (2009) untersuchten den Zusammenhang zwischen dem TLR4-Signaling und Zink. Dabei

konnten sie beobachten, dass höhere Zink-Konzentrationen zu einer Inhibierung des Signalweges führen. Zu den Mechanismen, die zu dieser Inhibierung führen, könnte einerseits, wie schon von Bao *et al.* beschrieben, die Hochregulierung von A20 gehören, was die aktivierende Ubiquitinierung von TRAF6 verhindert, andererseits könnte aber auch die direkte Inhibierung von IRAK dafür verantwortlich sein (Abbildung 77) [549]. Eine dritte Möglichkeit wäre die Inhibierung der zyklischen Phosphodiesterase (PDE). Dies würde zu einer ansteigenden Konzentration von cGMP und zur Aktivierung der Proteinkinase A führen sowie nachfolgend zur Inhibierung von Raf und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abbildung 77) [549]. Eine Hypothese zur Erklärung der anti-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems 32 Tage *p. p.*,  $6 \pm 2$  Tage nach dem Absetzen, könnte somit sein, dass es aufgrund der hohen Zink-Konzentration im Futter zur Akkumulation von Zink in den Zellen kommt. Dies führt zu einem erhöhten Level des Zinkfingerproteins A20, zu einer Inhibierung von IRAK oder der PDE, was wiederum die Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibiert und damit die Expression der pro-inflammatorischen Zielgene verzögert bzw. reduziert.



**Abbildung 77: Zusammenhang zwischen dem TLR4-Signaling und Zink.** Das TLR4-Signaling wird durch Ligandenbindung (LPS, z. B. *Salmonella*) eingeleitet und benötigt Zink-Signale zur Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und des MAPK-Signaling. Hohe Zink-Konzentrationen wirken dagegen inhibitorisch. Naheliegende Mechanismen könnten eine direkte Inhibierung von IRAK oder eine Hochregulierung des Zinkfingerproteins A20 sein. Daneben könnte auch die Inhibierung der zyklische Phosphodiesterase eine Rolle spielen. Alle Mechanismen führen zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. GC: Guanylatcyclase; IKK: I kappa B Kinase; MKK: MAPK-Kinase; PDE: Phosphodiesterase; PKA: Proteinkinase A; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; GTP: Guanosintriphosphat. Aus [549]. Mit Genehmigung von Annual Reviews.



Bedingt durch die anti-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems könnten kommensale Mikroorganismen über die intestinale Wand gelangen und so eine Aktivierung von Immunzellen in der Milz auslösen. Hinweise auf eine Aktivierung von Immunzellen könnten die erhöhten Expressionsraten von IL-8 sowie die des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 (B7.2) in diesem Gewebe sein.

Die engen Zusammenhänge zwischen den hier untersuchten Genen werden bei der Betrachtung der Genexpressionsraten der PGLYRPs deutlich. Die Genexpressionsraten der PGLYRPs sind 32 Tage *p. p.* in Versuchsgruppe B und C im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe A) in den Geweben der intestinalen Wand zum Teil signifikant verringert (Abbildung 67 – Abbildung 69). Eine anti-inflammatorische Ausrichtung, gekennzeichnet durch eine reduzierte Expression pro-inflammatorischer Zytokine/Chemokine, wirkt sich auch auf die Expression der *peptidoglycan recognition proteins* aus. Die Expression dieser Proteine ist abhängig vom zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und von pro-inflammatorischen Zytokinen [181, 187–190, 786]. Wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibiert, so werden damit auch die Zielgene beeinflusst, sodass es zu einer reduzierten Expression pro-inflammatorischer Zytokine kommt und weiterführend auch zu einer verringerten Expression der PGLYRPs. Da die Expression der beiden Nod-Proteine ebenfalls sowohl von NF- $\kappa$ B direkt, als auch durch pro-inflammatorische Zytokine reguliert wird, konnte auch für Nod1 und Nod2 eine tendenziell erniedrigte Expressionsrate zumindest in den jejunalen Peyer'schen Platten beobachtet werden. Auch 53 Tage *p. p.* konnte weiterhin ein eher anti-inflammatorisch ausgerichtetes Immunsystem gefunden werden. Hinweise darauf sind die zum Teil signifikant reduzierten Genexpressionsraten von IL-8 und CD86 in den JePP. Ferner lag die Expressionsrate des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in den JePP über der des pro-inflammatorischen Chemokins IL-8. Für die PGLYRPs konnte in den JePP ein zum Genexpressionsmuster von IL-8 paralleles Bild gefunden werden. Dementsprechend scheint das Immunsystem auch nach längerer Zink-Fütterung weiterhin eher anti-inflammatorisch ausgerichtet zu sein.

Im *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch wurde nun der Effekt einer Zink-Fütterung auf die Genexpression immunologisch relevanter Gene in einem Infektionsmodell untersucht. Verschiedene zinkabhängige Systeme, die für die Virulenz und Pathogenese von *Salmonella* von Bedeutung sind, sowie Immunproteine des Wirtes, deren Aktivität von Zink abhängig ist (PGLYRPs, antimikrobielle Peptide), wurden schon identifiziert. Sowohl *In-vitro*-, als auch *In-vivo*-Infektionsmodelle konnten beweisen, dass die NLRs bei der Abwehr von enteropathogenen Keimen eine wichtige Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptidoglykan-Sensoren in intestinalen Epithelzellen und Makrophagen verschiedene enteropathogene Bakterien, wie z. B. *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria* und *E. coli* erkennen [844–846]. Nach der Ligandenerkennung kommt es zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ )

[847]. Die Stimulierung von Nod1 und Nod2 resultiert daneben auch in einer Aktivierung des MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase Weges inklusive p38, von ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) und des JNK(c-Jun N-terminal kinase)-Signalweges [848]. Eine Folge der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAPK durch Nod1 und Nod2 ist die Hochregulierung der Transkription und Produktion von inflammatorischen Mediatoren wie z. B. den pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, aber auch von Chemoattraktanzien, Adhäsionsmolekülen und induzierbaren Molekülen (z. B. Stickstoffmonoxid-Synthasen – iNOS, Cyclooxygenase-2 – COX-2) [847]. Außerdem ist die verstärkte Produktion von antimikrobiellen Peptiden vor allem in den Epithelzellen, welche wahrscheinlich durch NF- $\kappa$ B gesteuert wird, zur Abwehr von pathogenen Keimen von entscheidender Bedeutung. Versuche mit synthetischen Substraten (PGN-Fragmente) konnten *in vivo* die Bedeutung von Nod1/2 bei der Rekrutierung von Neutrophilen und bei der Verschiebung der Th1/Th2-Immunbalance verdeutlichen [152, 849, 850]. Eine weitere wichtige Rolle ist die synergistische Wirkung von Nod1/2 mit verschiedenen TLRs, um so eine verstärkte Immunantwort in Antigen-präsentierenden Zellen zu erreichen [851]. Fritz *et al.* (2005) konnten z. B. zeigen, dass in humanen Monozyten und dendritischen Zellen Nod1 und Nod2 Liganden synergistisch mit LPS (TLR4) wirken und so die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF- $\alpha$ ) stimulieren [154]. Der genaue molekulare Mechanismus, der hinter dieser Synergie steckt ist noch nicht aufgeklärt, allerdings haben Lee *et al.* (2007) einen möglichen Zusammenhang aufgestellt. Inohara *et al.* zeigten, dass eine Stimulierung von TLR4 die Expression von Nod2 und RICK (NF- $\kappa$ B-Zielgene) hochreguliert [144, 851]. Die verstärkte Expression von Nod2 stimuliert die Expression von MyD88, die von Nod1 führt zu einer erhöhten Expression von TAK1 (*MAP3K7*) und I $\kappa$ B $\zeta$  (positiver NF- $\kappa$ B-Regulator) [144, 852]. Die durch MDP stimulierten mononuklearen Phagozyten (M $\theta$ s) induzieren die Transkription der Gene von TNF- $\alpha$ , allerdings kommt es nicht zu einer effektiven Translation. Eine Ko-Stimulierung mit LPS löst diese Blockade und es kommt zu einer verstärkten Expression und Produktion von TNF- $\alpha$  [851, 853].

Die vier Säugetier-PGLYRPs sind lösliche intrazelluläre oder sezernierte Proteine, die Bakterien ohne enzymatische Aktivität abtöten. PGLYRP-1 wirken beim Abtöten von phagozytierten Bakterien mit, PGLYRP-2 ist eine N-Actetylmuramyl-L-Alanin-Amidase, welche bakterielles Peptidoglykan hydrolysiert, PGLYRP-3 und -4 besitzen eine antibakterielle Aktivität und werden in den gleichen Zellen ko-exprimiert und nur als Homo- bzw. Heterodimere sezerniert [173, 181, 182, 186, 190]. Dabei spielt das Spurenelement Zink sowohl bei der antibakteriellen Aktivität von PGLYRP-1, -3 und -4 eine essentielle Rolle, als auch für die Amidase-Funktion von PGLYRP-2 [189–191]. Ma *et al.* (2010) untersuchten in ihrer Studie die TLR-vermittelte Regulation der PGLYRPs in humanen Hornhautzellen [854]. Dazu wurden die Zellen mit den Liganden von TLR1 – 9 stimuliert und die Expression der PGLYRPs überprüft. PGLYRP-3 und -4 scheinen nur geringfügig induzierbar zu sein, nur

polyI:C, eine synthetische virale dsRNA und Ligand von TLR3, konnte eine deutlich erhöhte Genexpression herbeiführen [854]. Dahingegen ist die Expression von PGLYRP-2 durch eine Vielzahl von bakteriellen Komponenten (z. B. PGN, Flagellin, FSL-3) stark induzierbar, wobei wiederum polyI:C der größte Stimulus war [854]. Daher scheinen die PGLYRPs neben der bereits bekannten antibakteriellen Wirkung auch eine antivirale Wirkung zu besitzen. In Schweinen konnten bislang drei PGLYRPs nachgewiesen werden (PGLYRP-1 und zwei Isoformen von PGLYRP-2: PGLYRP-2A und -2B) [184]. Sang *et al.* (2005) untersuchten in ihrer Studie die Expression von pPGRPs und antimikrobiellen Peptiden in porzinen intestinalen Zellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Infektion mit grampositiven und gramnegativen Bakterien [184]. Eine Infektion mit gramnegativen *S. Typhimurium* bzw. *E. coli* führte zu einer vermehrten Expression von PGLYRP-2A zwei und sechs Stunden *p. i.*, die grampositiven *L. monocytogenes* lösten eine über min. 24 Stunden anhaltende verstärkte Expression von PGLYRP-2A und -2B aus [184]. Die Expression von PGLYRP-2B wird durch *S. Typhimurium* zwei und vier Stunden *p. i.* bzw. durch *E. coli* 24 Stunden *p. i.* stimuliert [184]. Weiterhin konnten Experimente mit siRNA zeigen, dass nur das Stilllegen des Gens für PGLYRP-2B zu einer drastisch reduzierten Expression des antimikrobiellen Peptids  $\beta$ -Defensin-1 in den IPEC-J2 führt, PGLYRP-2A ist dagegen nicht an der  $\beta$ -Defensin-1-Expression beteiligt [184]. Insgesamt scheinen die PGRPs neben den schon bekannten Funktionen (antibakterielle Aktivität, Amidase-Aktivität) noch weitere Aktivitäten, wie z. B. eine antivirale Wirkung oder aber auch im Bereich der angeborenen Immunantwort die Regulation der Expression von antimikrobiellen Peptiden (gezeigt im Schweinemodell) zu besitzen.

Zum frühen Zeitpunkt nach der Infektion (2 Tage *p. i.*) wurden kaum Effekte einer Zinkoxid-Fütterung auf die Expression der untersuchten Gene in den Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) beobachtet (Abbildung 70 – Abbildung 74). Die Genexpression von IL-8 war nur in den IlePP in Gruppe C signifikant erhöht. In den mLN konnte für Gruppe C (2500 mg ZnO/kg Futter) dagegen eine signifikant reduzierte Expression von IL-8 gefunden werden. Die Expression von PGLYRP-2B war in Gruppe B in der Milz ebenfalls signifikant verringert. Daneben konnten Janczyk *et al.* (2013) in der ersten Woche nach der Infektion in demselben Tierversuch eine höhere Gewichtszunahmen in der Fütterungsgruppe mit 2500 mg ZnO/kg Futter feststellen [855].

Ein größerer Einfluss der Zinkoxid-Fütterung auf die Genexpression der untersuchten Gene konnte 42 Tage *p. i.* beobachtet werden (Abbildung 70 – Abbildung 74). Die Gabe von Zinkoxid scheint hier in den Geweben der intestinalen Wand zu einer verstärkten Expression der PGLYRPs und Nod-Proteine zu führen. Auslöser für diese erhöhten Expressionsraten könnte eine ebenfalls verstärkte Expression von IL-8 sein, was auf eine pro-inflammatorisch ausgerichtete Immunantwort 42 Tage *p. i.* hindeutet. Daneben konnten vor allem in Gruppe B auch in den jejunalen mLN eine signifikant erhöhte Genexpressionsraten von IL-8, der

PGLYRPs sowie der Nod-Proteine detektiert werden. Dies deutet auf eine erhöhte Translokation von *Salmonella* hin und auf die als Reaktion darauf eingeleiteten Abwehrmechanismen. Tatsächlich konnte 42 Tage *p. i.* von anderen Mitgliedern des SFB 852 in Gruppe C eine erhöhte Bakterienlast in den Tonsillen und Kolon-Lymphknoten gefunden werden [855]. Daneben konnte ebenfalls eine höhere Ausscheidung von *Salmonella* sowie eine geringere T-Zell-Dichte und eine schlechtere Gesamtverfassung der Ferkel festgestellt werden [855]. Es scheint so, als ob in Gruppe B und C 42 Tage *p. i.* eine starke Immunantwort ausgelöst wurde. Nicht nur die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 ist erhöht, sondern auch die Expression der verschiedenen Peptidoglykan-Sensoren, die einerseits wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen und damit zur Expression der Zielgene, andererseits, wie im Fall von PGLYRP-1, auch direkt bakterizid gegenüber den gramnegativen Salmonellen wirken. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Bakterienlast nach Fütterung der Ferkel mit hohen Zink-Konzentrationen könnte die Betrachtung des zinkabhängigen Antivirulenz-Systems ZirTS von *Salmonella* liefern. Gal-Mor *et al.* (2008) zeigten, dass die Expression der Gene von *zirTS* von der Zink-Konzentration abhängig ist und bereits eine Zinksulfat-Konzentration von 0,5 mM zu einer reduzierten Expression führt [648]. Dies lässt vermuten, dass hohe Zink-Konzentrationen, wie sie in Gruppe B (150 mg ZnO/kg Futter) und vor allem Gruppe C (2500 mg ZnO/kg Futter) eingesetzt wurden zu einer Reduktion der Expression der *zirTS*-Gene führen könnte. *In vitro* konnte beobachtet werden, dass eine Mutation der *zirTS*-Gene eine deutlich verringerte Invasionseffizienz mit sich bringt. Allerdings konnte eine erhöhte intrazelluläre Wachstumsrate der  $\Delta$ *zirTS*-Mutanten beobachtet werden, was einerseits vielleicht die Erklärung für den hypervirulenten Phänotyp sein könnte, den Gal-Mor *et al.* bei Verwendung eines  $\Delta$ *zirTS* Mutanten im Mäusemodell beobachten konnten [648], andererseits aber ebenfalls zeigen könnte, dass neben der Wirtszellinvasion auch die phagozytierenden Zellen bei der Verbreitung der Salmonellen an systemischen Orten eine wichtige Rolle spielen [625]. Demzufolge könnte es sein, dass der Verlust von ZirTS bzw. die reduzierte Expression der Gene von *zirTS* zu einem hypervirulenten Phänotyp und damit verbunden zu einer erhöhten Kolonisation an systemischen Orten führt. Dies könnte auch eine Erklärung für die von anderen Mitgliedern des SFB 852 im *Salmonella* challenge Zinkoxid-Versuch in der Versuchsgruppe mit der hohen Zink-Konzentration (2500 mg ZnO/kg Futter) gefundenen erhöhten Bakterienlasten in den Tonsillen und Kolon-Lymphknoten sowie die insgesamt erhöhte Ausscheidung von *Salmonella* sein [855].

Daneben konnte im Fütterungsversuch 32 Tage *p. p.*, genau zum Zeitpunkt der Infektion, in den Ferkeln eine anti-inflammatorische Ausrichtung des Immunsystems nach Zink-Fütterung beobachtet werden. Diese Ausrichtung könnte für *Salmonella* einen Vorteil mit sich bringen, da das Immunsystem zunächst die anti-inflammatorische Ausrichtung überwinden muss, um anschließend auf die enteropathogenen Bakterien reagieren zu können. Daneben konnte in

der Literatur gezeigt werden, dass zytotoxische Zytokine wie z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-8 zu einer vermehrten Produktion von freien Sauerstoffradikalen in Neutrophilen führen [856, 857]. Wird durch die Zinkoxid-Fütterung die Expression dieser Gene herabgesetzt, so könnte es auch zu einer negativen Beeinflussung dieses Abwehrmechanismus kommen. Außerdem könnte eine erhöhte Zink-Konzentration dazu führen, dass zinkabhängige Abwehrmechanismen der Salmonellen gegenüber freien Sauerstoffradikalen, wie z. B. die Superoxid-Dismutase (SOD) in den phagozytierenden Zellen vermehrt gebildet werden könnten. Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff [858].

Zusammenfassend scheint eine Zinkoxid-Fütterung hinsichtlich der Genexpression der immunrelevanten Gene nach dem Absetzen zu einer eher anti-inflammatorisch ausgerichteten Immunantwort zu führen. Diese Ausrichtung bleibt zumindest in den jejunalen Peyer'schen Platten auch 53 Tage *p. p.* erhalten. *In-vitro*-Tests unter Verwendung der porzinen Luziferase-Reporterzelllinien könnten hier klären, ob hohe Zink-Konzentrationen tatsächlich eine Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung hervorrufen. Erfolgt 32 Tage *p. p.* eine Infektion mit enteropathogenen Salmonellen, so konnten zwei Tage *p. i.* in den Geweben der intestinalen Wand, mit Ausnahme der ilealen PP in Gruppe C, wo die Expression von IL-8 signifikant erhöht war, keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich einer Zinkoxid-Fütterung beobachtet werden. Zum späten Zeitpunkt, 42 Tage *p. i.* konnte dagegen eine, zum Teil auch signifikant, erhöhte Expression von IL-8, der PGLYRPs und der Nod-Proteine in den Geweben der intestinalen Wand (IlePP, JePP) und den mesenterialen Lymphknoten beobachtet werden. Dies deutet auf eine starke inflammatorische Immunantwort sowie eine erhöhte Translokation des gastrointestinalen Pathogens hin.

### **5.8. Zusammenfassung – Wirkungsmechanismus von Zink**

Zunächst wurde *in vitro* unter Verwendung verschiedener Deletionsmutanten untersucht, inwiefern sich eine Deletion der Gene, welche für ein Zink-Aufnahmesystem (ZnuABC) und seinen Repressor (Zur), ein zinkabhängiges NRAMP-Homolog (MntH), ein Protein (ZraP), welches in die Zink-Toleranz involviert ist sowie ein alternatives, von der Zink-Konzentration im Medium anhängiges Sekretionssystem (ZirTS) codieren, auf die Invasionseffizienz und die intrazelluläre Persistenz auswirkt. Dabei konnten mehrere Gene identifiziert werden, deren Deletion einen Einfluss auf die Invasionsrate sowie das intrazelluläre Wachstum hatte. Die Deletion der *znuABC*-Gene führte ebenso wie die von *zur* zu einer, zum Teil, signifikant reduzierten Wirtszellinvasion. Ferner führte eine Deletion der Gene für das Antivirulenz-System ZirTS zu einer deutlich verringerten Invasionseffizienz und einem nachfolgenden, zum Teil signifikant, erhöhten intrazellulären Wachstum. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass das ZirTS-Sekretionssystem eine wesentliche Rolle in der frühen Phase der Infektion, bei der Invasion der Wirtszellen spielt. Allerdings scheinen die

Deletionsmutanten diesen Nachteil durch ein verstärktes intrazelluläres Wachstum zum Teil wieder zu kompensieren, wobei allerdings die intrazelluläre Keimzahl noch deutlich hinter der vom Wildtyp zurückbleibt. Dementsprechend scheint ZirTS auch bei der Kontrolle und Regulation des intrazellulären Wachstums von Bedeutung zu sein. Dies konnte in der Literatur bereits gezeigt werden und erklärt auch den hypervirulenten Phänotyp, der in einem Mäusemodell bei Infektion mit einem Deletionsmutanten von ZirTS beobachtet wurde [648]. Die Expression von ZirTS ist von der Zink-Konzentration im umgebenden Medium abhängig. Schon bei Konzentrationen von 0,5 mM erfolgt eine Inhibierung der Expression der *zirTS* Gene [648]. Aufgrund dieser interessanten Beobachtungen bedarf insbesondere das ZirTS-Sekretionssystem noch weiterer Forschung, um den Wirkmechanismus vollständig verstehen zu können. Eine Behandlung der Zellen mit 1 mM Zinksulfat zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor, während, nach der Infektion) machte deutlich, dass vor allem die Invasion der enteropathogenen Bakterien durch Zink beeinflusst werden kann bzw. eine Zink-Behandlung eine bakterizide Wirkung auf die Bakterien hat und so deren Zahl deutlich vermindert. Eine Vorbehandlung der Zellen hatte dabei die größte Wirkung. Eine zweistündige Vorbehandlung der Zellen mit Zinksulfat führte in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 zu einer um ca. 76 % (*S. Typhimurium* SL1344, Wildtyp) bzw. um ca. 81,5 % ( $\Delta$ *zirTS*) reduzierten Invasionseffizienz. Ferner konnte eine Inhibierung des Wachstums von beiden untersuchten Stämmen vier Stunden *p. i.* beobachtet werden.

In einem Zinkoxid-Fütterungsversuch mit Ferkeln konnte nach Zusatz von höheren ZnO-Mengen im Futter eine eher anti-inflammatorisch ausgerichtete Immunantwort gefunden werden. Was darauf hindeuten könnte, dass hohe Zink-Konzentration, wie schon in der Literatur beschrieben, zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit auch zu einer verminderten Expression der Zielgene (pro-inflammatorischen Zytokine) führt. Eine Infektion der Ferkel mit enteropathogenen Salmonellen führte vor allem 42 Tage *p. i.* zu interessanten Ergebnissen. Eine, zum Teil auch signifikant, erhöhte Expression von IL-8 konnte in den Geweben der intestinalen Wand gefunden werden. Auch die Expression der PGLYRPs und Nod-Proteine war signifikant erhöht. Es scheint demzufolge 42 Tage *p. i.* eine starke inflammatorische Immunantwort vorzuliegen. Auch in den mLN konnten verstärkte Expressionen von IL-8, der PGLYRPs und der Nod-Proteine beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf eine erhöhte Translokation von *Salmonella*. Tatsächlich konnten Janczyk *et al.* (2013) eine erhöhte Bakterienlast in den Tonsillen und den Kolon-Lymphknoten sowie eine verstärkte Bakterienlast im Fäzes der Ferkel aus der Gruppe mit der höchsten Zink-Konzentration (2500 mg ZnO/kg Futter) detektieren [855].

Um genauer zu untersuchen, ob es nach Inkubation der Zellen mit hohen Zink-Konzentrationen tatsächlich zu einer Inhibierung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung kommt, könnten *in vitro* die in dieser Arbeit vorgestellten Luziferase-Reporterzelllinien verwendet werden. Daneben könnte nach Zink-Behandlung der Zellen und Stimulierung durch *Salmonella* die

RNA aus den Zellen extrahiert werden und mittels quantitativer PCR die Genexpression von IL-8 untersucht werden.

Für die Überprüfung, ob es aufgrund der hohen Zink-Konzentrationen im Futter der Ferkel wirklich zu einer Inhibierung der Genexpression von *zirTS* in den Salmonellen gekommen ist, was die erhöhte Translokation an systemischen Orten erklären könnte, könnte RNA aus den Bakterien gewonnen werden und mittels Real-time PCR die Expression von *zirTS* überprüft werden. Dazu würde allerdings auch ein weiterer Tierversuch benötigt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 **Dibner JJ, Richards JD:** Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 2005; **84**(4): 634–643.
- 2 **Corpet D.:** Microbiological hazards for humans of antimicrobial growth promoter use in animal production. *Rev Med Vet* 1996; **12**: 851–862.
- 3 **Mathur S, Singh R:** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int J Food Microbiol* 2005; **105**(3): 281–295.
- 4 **Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Philipps I:** The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**(2): 159–161.
- 5 **Focke H:** Die Natur schlägt zurück. Antibiotikamissbrauch in der intensiven Nutztierhaltung und Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt. 1. Aufl. Berlin: Pro Business; 2010.
- 6 **Spreeuwenberg MA, Verdonk JM, Gaskins HR, Verstegen MW:** Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 2001; **131**(5): 1520–1527.
- 7 **Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM:** Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2013; **97**(2): 207–237.
- 8 **Hoefling D:** Recognizing diarrhea caused by *Clostridium perfringens* type C. *Veterinary medicine* 1989; **84**(4): 437–448.
- 9 **Scharek L, Tedin K, Guth J, Schmidt MF.:** Das intestinale Immunsystem des Schweines - mögliche Einflüssebenen von Probiotika. *Lohmann Information* 2004.
- 10 **Verstegen MWA, Williams BA:** Alternatives to the use of antibiotics as growth promoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.* 2002; **13**(1): 113–127.
- 11 **Tuohy KM, Rouzaud GCM, Brück WM, Gibson GR:** Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics--assessment of efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 2005; **11**(1): 75–90.
- 12 **Choct M.:** Managing gut health through nutrition. *Br. Poult. Sci.* 2009; **50**(1): 9–15.
- 13 **Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJ:** The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization: development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigens. *J Biotechnol* 1996; **44**(1–3): 183–192.
- 14 **Salminen S, Isolauri E, Salminen E:** Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; **70**(2–4): 347–358.
- 15 **Dong H, Rowland I, Yaqoob P:** Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br J Nutr* 2012; **108**(3): 459–470.
- 16 **Gill HS:** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; **17**(5): 755–773.
- 17 **Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B:** Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 2010; **141 Suppl 1**: S15–28.
- 18 **Underdahl NR, Torres-Medina A, Dosten AR:** Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in control of *Escherichia coli*-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 1982; **43**(12): 2227–2232.
- 19 **Taras D, Vahjen W, Macha M, Simon O:** Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci* 2006; **84**(3): 608–617.
- 20 **Scharek L, Guth J, Reiter K, Weyrauch KD, Taras D, Schwerk P, Schierack P, Schmidt MF, Wieler LH, Tedin K:** Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; **105**(1–2): 151–161.
- 21 **Pollmann M, Nordhoff M, Pospischil A, Tedin K, Wieler LH:** Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. *Infect Immun* 2005; **73**(7): 4346–4353.
- 22 **Szabó I, Wieler LH, Tedin K, Scharek-Tedin L, Taras D, Hensel A, Appel B, Nöckler K:** Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar



- Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**(9): 2621–2628.
- 23 **Broom L**: Removal of both zinc oxide and avilamycin from the post-weaning piglet diet: consequences for performance through to slaughter. *Anim Sci* **77**(1):79–84.
- 24 **Pettigrew JE**: Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. *Anim Biotechnol* 2006; **17**(2): 207–215.
- 25 **Nutrient requirements of swine**. 10. Aufl. Washington, D.C: National Academy Press; 1998.
- 26 **Huang SX, McFall M, Cegielski AC, Kirkwood RN**: Effect of dietary zinc supplementation on *Escherichia coli* septicemia in weaned pigs. *Swine Health and Production* 1999; **7**(3): 109–111.
- 27 **Katouli M, Melin L, Jensen-Waern M, Wallgren P, Möllby R**: The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *J Appl Microbiol* 1999; **87**(4): 564–573.
- 28 **Wang YZ, Xu ZR, Lin WX, Huang HQ, Wang ZQ**: Developmental gene expression of antimicrobial peptide PR-39 and effect of zinc oxide on gene regulation of PR-39 in piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2004; **17**(12): 1635–1640.
- 29 **Pritchard GC, Lewis G, Wells GA, Stopforth A**: Zinc toxicity, copper deficiency and anaemia in swill-fed pigs. *Vet Rec* 1985; **117**(21): 545–548.
- 30 **Shi J, Yu X, Zhang M, Lu S, Wu W, Wu J, Xu J**: Potential risks of copper, zinc, and cadmium pollution due to pig manure application in a soil–rice system under intensive farming: a case study of Nanhu, China. *J Environ Qual* 2011; **40**(6): 1695–1704.
- 31 **Hooper LV, Macpherson AJ**: Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(3): 159–169.
- 32 **Acheson DWK, Luccioli S**: Microbial-gut interactions in health and disease. *Mucosal immune responses*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; **18**(2): 387–404.
- 33 **Ley RE, Peterson DA, Gordon JI**: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; **124**(4): 837–848.
- 34 **Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI**: How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 283–307.
- 35 **Guarner F**: Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006; **73 Suppl 1**: 5–12.
- 36 **Hansson GC, Johansson ME**: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 2010; **1**(1): 51–54.
- 37 **Haller D, Rimbach G, Grune T**: Biofunktionalität der Lebensmittelinhaltsstoffe: Springer; 2011.
- 38 **Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambrud L, Maroux S**: The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur J Biochem* 1995; **228**(2): 323–331.
- 39 **Mowat AM**: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(4): 331–341.
- 40 **Brandtzaeg P, Bjerke K**: Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion* 1990; **46 Suppl 2**: 262–273.
- 41 **Brandtzaeg P**: Regionalized immune function of tonsils and adenoids. *Immunol Today* 1999; **20**(8): 383–384.
- 42 **Kraehenbuhl JP, Neutra MR**: Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 301–332.
- 43 **Owen RL, Jones AL**: Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 1974; **66**(2): 189–203.
- 44 **Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP**: Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 275–300.
- 45 **Ermak TH, Steger HJ, Pappo J**: Phenotypically distinct subpopulations of T cells in domes and M-cell pockets of rabbit gut-associated lymphoid tissues. *Immunology* 1990; **71**(4): 530–537.
- 46 **Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O et al.**: Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. *Immunology* 1994; **83**(3): 457–464.
- 47 **Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP**: Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996; **86**(3): 345–348.
- 48 **Savidge TC, Smith MW, James PS et al.**: Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol* 1991; **139**(1): 177–184.
- 49 **Newberry RD, Lorenz RG**: Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.* 2005; **206**(1): 6–21.
- 50 **Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, Malterer G, Donaldson DS, Wang D, Tan A, Gillespie TL, O'Shea M, Roe AJ, Shaw DJ, Gally DL, Lengeling A, Mabbott NA, Haas J, Mahajan A**:

- Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe* 2012; **12**(2): 645–656.
- 51 **Sansonetti P**: Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* 2002; **50 Suppl 3**: III2–8.
- 52 **Macpherson AJ, Smith K**: Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med* 2006; **203**(3): 497–500.
- 53 **Macpherson AJ, Uhr T**: Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1029**: 36–43.
- 54 **Turnbull EL, Yrlid U, Jenkins CD, Macpherson GG**: Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo. *J Immunol* 2005; **174**(3): 1374–1384.
- 55 **Sandborn WJ, Fazio VW, Feagan BG, Hanauer SB; American Gastroenterological Association Clinical Practice Committee**: AGA technical review on perianal Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; **125**(5): 1508–1530.
- 56 **Turner JR**: Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**(11): 799–809.
- 57 **Le Shen, Turner JR**: Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**(4): G577–582.
- 58 **Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC**: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(39): 15064–15069.
- 59 **Frey A, Giannasca KT, Weltzin R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, Neutra MR**: Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 1996; **184**(3): 1045–1059.
- 60 **McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, Florin TH, Hill GR, Korolik V, McGuckin MA**: MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest* 2007; **117**(8): 2313–2324.
- 61 **McGuckin MA, Every AL, Skene CD, Linden SK, Chionh YT, Swierczak A, McAuley J, Harbour S, Kaparakis M, Ferrero R, Sutton P**: Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology* 2007; **133**(4): 1210–1218.
- 62 **Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, Ewoldt RH, McKinley GH, So P, Erramilli S, Bansil R**: *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(34): 14321–14326.
- 63 **Guerry P**: *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 2007; **15**(10): 456–461.
- 64 **Eckmann L, Kagnoff MF**: Intestinal mucosal responses to microbial infection. *Springer Semin Immunopathol* 2005; **27**(2): 181–196.
- 65 **Eckmann L, Kagnoff MF**: Cytokines in host defense against *Salmonella*. *Microbes Infect* 2001; **3**(14–15): 1191–1200.
- 66 **Dwinell MB, Lügering N, Eckmann L, Kagnoff MF**: Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2001; **120**(1): 49–59.
- 67 **Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL**: Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; **422**: 522–526.
- 68 **Ganz T**: Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(9): 710–720.
- 69 **Agerberth B, Gudmundsson GH**: Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; **306**: 67–90.
- 70 **Putsep K, Axelsson LG, Boman A, Midtvedt T, Normark S, Boman HG, Andersson M**: Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. *J Biol Chem* 2000; **275**(51): 40478–40482.
- 71 **Meyer-Hoffert U, Hornef MW, Henriques-Normark B, Axelsson LG, Midtvedt T, Pütsep K, Andersson M**: Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut* 2008; **57**(6): 764–771.
- 72 **Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI**: Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 1998; **95**(2): 189–198.

- 73 **Kelsall B**: Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages. *Mucosal Immunol* 2008; **1**(6): 460–469.
- 74 **Rugtveit J, Haraldsen G, Høgåsen AK, Bakka A, Brandtzaeg P, Scott H**: Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut* 1995; **37**(3): 367–373.
- 75 **Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H**: Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997; **112**(5): 1493–1505.
- 76 **Smith PD, Janoff EN, Mosteller-Barnum M, Merger M, Orenstein JM, Kearney JF, Graham MF**: Isolation and purification of CD14-negative mucosal macrophages from normal human small intestine. *J Immunol Methods* 1997; **202**(1): 1–11.
- 77 **Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Andus T, Falk W, Andreesen R, Schölmerich J, Gross V**: Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998; **112**(2): 205–215.
- 78 **Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P**: Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1997; **110**(1): 104–113.
- 79 **Hausmann M, Spottl T, Andus T, Rothe G, Falk W, Schölmerich J, Herfarth H, Rogler G**: Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol* 2001; **125**(1): 48–55.
- 80 **Cruickshank SM, McVay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ, Carding SR**: Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4 T cell activation. *Gut* 2004; **53**(5): 678–684.
- 81 **Macpherson AJ, Uhr T**: Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; **303**(5664): 1662–1665.
- 82 **Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD**: Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; **115**(1): 66–75.
- 83 **Burks AW, Laubach S, Jones SM**: Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**(6): 1344–1350.
- 84 **Michael JG**: The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Immunol Invest* 1989; **18**(9–10): 1049–1054.
- 85 **Weiner HL**: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001; **3**(11): 947–954.
- 86 **Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA**: Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 809–837.
- 87 **Sansonetti PJ**: War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**(12): 953–964.
- 88 **Baggiolini M, Dewald B, Moser B**: Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; **55**: 97–179.
- 89 **Eck M, Schmausser B, Scheller K, Toksoy A, Kraus M, Menzel T, Müller-Hermelink HK, Gillitzer R**: CXC chemokines G-roalpha/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**(2): 192–199.
- 90 **Tato CM, Hunter CA**: Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect Immun* 2002; **70**(7): 3311–3317.
- 91 **Suzuki K, Meek B, Doi Y, Muramatsu M, Chiba T, Honjo T, Fagarasan S**: Aberrant expansion of segmented filamentous bacteria in IgA-deficient gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(7): 1981–1986.
- 92 **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P**: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; **2**(4): 361–367.
- 93 **Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P**: Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 2001; **204**(5): 572–581.
- 94 **Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC**: CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; **307**(5707): 254–258.
- 95 **Snoeck V, Peters IR, Cox E**: The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 2006; **37**(3): 455–467.

- 96 **Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM:** A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; **288**(5474): 2222–2226.
- 97 **Janeway CA:** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*1989; **54 Pt 1:** 1–13.
- 98 **Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA:** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; **284**(5418): 1313–1318.
- 99 **Janeway CA, Medzhitov R:** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; **20:** 197–216.
- 100 **Aderem A, Ulevitch RJ:** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; **406**(6797): 782–787.
- 101 **Medzhitov R, Janeway C:** Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; **343**(5): 338–344.
- 102 **Medzhitov R, Janeway C:** Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; **173:** 89–97.
- 103 **Sorbara MT, Philpott DJ:** Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011; **243**(1): 40–60.
- 104 **Royet J, Dziarski R:** Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**(4): 264–277.
- 105 **Rietschel ET, Schletter J, Weidemann B, El-Samalouti V, Mattern T, Zähringer U, Seydel U, Brade H, Flad HD, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R, Ulmer AJ:** Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb Drug Resist* 1998; **4**(1): 37–44.
- 106 **Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS:** Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem* 1998; **273**(15): 8680–8690.
- 107 **Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ:** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.*1999; **274**(25): 17406–17409.
- 108 **Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D:** Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; **163**(1): 1–5.
- 109 **Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D:** Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* 2003; **278**(43): 41702–41708.
- 110 **Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ:** Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003; **300**(5625): 1584–1587.
- 111 **Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamailard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ:** Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; **278**(11): 8869–8872.
- 112 **Dziarski R, Viriyakosol S, Kirkland TN, Gupta D:** Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2000; **68**(9): 5254–5260.
- 113 **Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KB, Palaniyar N:** Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 2005; **175**(3): 1785–1794.
- 114 **Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C:** Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; **42**(3): 779–789.
- 115 **Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA:** *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**(26): 14614–14619.
- 116 **Medzhitov R:** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; **449**(7164): 819–826.
- 117 **Beutler BA:** TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; **113**(7): 1399–1407.
- 118 **Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT:** Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; **26**(10): 509–511.

- 119 **Hopkins PA, Sriskandan S:** Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol* 2005; **140**(3): 395–407.
- 120 **Brinkmann MM, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh HL, Kim YM:** The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *J Cell Biol* 2007; **177**(2): 265–275.
- 121 **Kim Y, Brinkmann MM, Paquet M, Ploegh HL:** UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 2008; **452**(7184): 234–238.
- 122 **Abreu MT:** Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**(2): 131–144.
- 123 **Cario E, Podolsky DK:** Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; **68**(12): 7010–7017.
- 124 **Otte J, Cario E, Podolsky DK:** Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; **126**(4): 1054–1070.
- 125 **Lundin A, Bok CM, Aronsson L, Björkholm B, Gustafsson JA, Pott S, Arulampalam V, Hibberd M, Rafter J, Pettersson S:** Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol* 2008; **10**(5): 1093–1103.
- 126 **Akira S, Hemmi H:** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; **85**(2): 85–95.
- 127 **Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ:** How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003; **74**(4): 479–485.
- 128 **Kumar H, Kawai T, Akira S:** Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **388**(4): 621–625.
- 129 **Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ:** TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003; **3**(8): 466–477.
- 130 **Carpenter S, O'Neill LAJ:** How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol* 2007; **9**(8): 1891–1901.
- 131 **Akira S, Takeda K:** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**(7): 499–511.
- 132 **Kawai T, Akira S:** TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; **13**(5): 816–825.
- 133 **Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J:** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004; **5**(5): 503–507.
- 134 **Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT:** LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; **198**(7): 1043–1055.
- 135 **Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Dracheva T, Peterson SN, Monack DM, Barton GM:** TLR signaling is required for Salmonella typhimurium virulence. *Cell* 2011; **144**(5): 675–688.
- 136 **Iwasaki A, Medzhitov R:** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; **5**(10): 987–995.
- 137 **Royle MC, Töttemeyer S, Aldridge LC, Maskell DJ, Bryant CE:** Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live Salmonella typhimurium is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *J Immunol* 2003; **170**(11): 5445–5454.
- 138 **Vazquez-Torres A, Vallance BA, Bergman MA, Finlay BB, Cookson BT, Jones-Carson J, Fang FC:** Toll-like receptor 4 dependence of innate and adaptive immunity to Salmonella: importance of the Kupffer cell network. *J Immunol* 2004; **172**(10): 6202–6208.
- 139 **Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Müller AJ, Heikenwalder M, Stallmach T, Hensel M, Pfeffer K, Akira S, Hardt WD:** The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005; **174**(3): 1675–1685.
- 140 **Uematsu S, Jang MH, Chevrier N, Guo Z, Kumagai Y, Yamamoto M, Kato H, Sogawa N, Matsui H, Kuwata H, Hemmi H, Coban C, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Miyasaka M, Takeda K, Akira S:** Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol* 2006; **7**(8): 868–874.
- 141 **Feuillet V, Medjane S, Mondor I, Demaria O, Pagni PP, Galán JE, Flavell RA, Alexopoulou L:** Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(33): 12487–12492.

- 142 **Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI:** Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 2005; **122**(3): 461–472.
- 143 **Franchi L, Park J, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG, Núñez G:** Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* 2008; **10**(1): 1–8.
- 144 **Inohara, Chamillard, McDonald C, Nuñez G:** NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; **74**: 355–383.
- 145 **Creagh EM, O'Neill LAJ:** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; **27**(8): 352–357.
- 146 **Inohara N, Nuñez G:** NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(5): 371–382.
- 147 **Meylan E, Tschopp J, Karin M:** Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; **442**(7098): 39–44.
- 148 **Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Núñez G:** Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; **274**(21): 14560–14567.
- 149 **Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Núñez G:** Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; **276**(7): 4812–4818.
- 150 **Chamillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nuñez G, Inohara N:** An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 2003; **4**(7): 702–707.
- 151 **Fujimoto Y, Fukase K:** Structures, synthesis, and human Nod1 stimulation of immunostimulatory bacterial peptidoglycan fragments in the environment. *J Nat Prod* 2011; **74**(3): 518–525.
- 152 **Magalhaes JG, Philpott DJ, Nahori M, Jéhanno M, Fritz J, Le Bourhis L, Viala J, Hugot JP, Giovannini M, Bertin J, Lepoivre M, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Girardin SE:** Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep* 2005; **6**(12): 1201–1207.
- 153 **Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T:** Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**(1): 9–20.
- 154 **Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, Cavillon JM, Philpott DJ, Adib-Conquy M:** Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 2005; **35**(8): 2459–2470.
- 155 **Cloud-Hansen KA, Peterson SB, Stabb EV, Goldman WE, McFall-Ngai MJ, Handelsman J:** Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**(9): 710–716.
- 156 **Le Bourhis L, Magalhaes JG, Selvanantham T, Travassos LH, Geddes K, Fritz JH, Viala J, Tedin K, Girardin SE, Philpott DJ:** Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during *Salmonella* pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2009; **77**(10): 4480–4486.
- 157 **Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker H, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK:** CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; **124**(4): 993–1000.
- 158 **Hugot JP, Chamillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G:** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**(6837): 599–603.
- 159 **Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH:** A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; **411**(6837): 603–606.
- 160 **Tohno M, Ueda W, Azuma Y, Shimazu T, Katoh S, Wang JM, Aso H, Takada H, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H:** Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2). *Mol Immunol* 2008; **45**(1): 194–203.

- 161 **Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M:** Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 1996; **271**(23): 13854–13860.
- 162 **Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H:** A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(17): 10078–10082.
- 163 **Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R:** Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 2001; **276**(37): 34686–34694.
- 164 **Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC:** Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002; **298**(5591): 159–165.
- 165 **Dziarski R:** Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol* 2004; **40**(12): 877–886.
- 166 **Werner T, Liu G, Kang D et al.:** A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(25): 13772–13777.
- 167 **Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J:** The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2002; **416**(6881): 640–644.
- 168 **Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaître B:** The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 2003; **4**(5): 478–484.
- 169 **Dziarski R, Gupta D:** Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cell Microbiol* 2006; **8**(7): 1059–1069.
- 170 **Mellroth P, Karlsson J, Steiner H:** A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem* 2003; **278**(9): 7059–7064.
- 171 **Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pili-Floury S, Kim MS, Blanot D, Oh BH, Ueda R, Mengin-Lecreulx D, Lemaître B:** The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* 2006; **24**(4): 463–473.
- 172 **Mellroth P, Steiner H:** PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **350**(4): 994–999.
- 173 **Lu X, Wang M, Qi J, Wang H, Li X, Gupta D, Dziarski R:** Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem* 2006; **281**(9): 5895–5907.
- 174 **Dziarski R, Gupta D:** The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol* 2006; **7**(8): 232.
- 175 **Guan R, Roychowdhury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ, Mariuzza RA:** Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(49): 17168–17173.
- 176 **Kim M, Byun M, Oh B:** Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol* 2003; **4**(8): 787–793.
- 177 **Chang C, Pili-Floury S, Hervé M, Parquet C, Chelliah Y, Lemaître B, Mengin-Lecreulx D, Deisenhofer J:** A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS Biol* 2004; **2**(9): E277.
- 178 **Guan R, Wang Q, Sundberg EJ, Mariuzza RA:** Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. *J Mol Biol* 2005; **347**(4): 683–691.
- 179 **Chang C, Ihara K, Chelliah Y, Mengin-Lecreulx D, Wakatsuki S, Deisenhofer J:** Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(29): 10279–10284.
- 180 **Kumar S, Roychowdhury A, Ember B, Wang Q, Guan R, Mariuzza RA, Boons GJ:** Selective recognition of synthetic lysine and meso-diaminopimelic acid-type peptidoglycan fragments by human peptidoglycan recognition proteins  $\{\alpha\}$  and S. *J Biol Chem* 2005; **280**(44): 37005–37012.
- 181 **Wang Z, Li X, Cocklin RR, Wang M, Wang M, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R:** Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Biol Chem* 2003; **278**(49): 49044–49052.
- 182 **Liu C, Gelius E, Liu G, Steiner H, Dziarski R:** Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *J Biol Chem* 2000; **275**(32): 24490–24499.

- 183 **Tydell CC, Yuan J, Tran P, Selsted ME:** Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *J. Immunol.* 2006; **176**(2): 1154–1162.
- 184 **Sang Y, Ramanathan B, Ross CR, Blecha F:** Gene silencing and overexpression of porcine peptidoglycan recognition protein long isoforms: involvement in beta-defensin-1 expression. *Infect Immun* 2005; **73**(11): 7133–7141.
- 185 **Cho JH, Fraser IP, Fukase K, Kusumoto S, Fujimoto Y, Stahl GL, Ezekowitz RA:** Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* 2005; **106**(7): 2551–2558.
- 186 **Dziarski R, Platt KA, Gelius E, Steiner H, Gupta D:** Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with nonpathogenic gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)-deficient mice. *Blood* 2003; **102**(2): 689–697.
- 187 **Lo D, Tynan W, Dickerson J, Mendy J, Chang HW, Scharf M, Byrne D, Brayden D, Higgins L, Evans C, O'Mahony DJ:** Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cell Immunol* 2003; **224**(1): 8–16.
- 188 **Zhang Y, van der Fits L, Voerman JS, Melief MJ, Laman JD, Wang M, Wang H, Wang M, Li X, Walls CD, Gupta D, Dziarski R:** Identification of serum N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase as liver peptidoglycan recognition protein 2. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1752**(1): 34–46.
- 189 **Wang H, Gupta D, Li X, Dziarski R:** Peptidoglycan recognition protein 2 (N-acetylmuramoyl-L-Ala amidase) is induced in keratinocytes by bacteria through the p38 kinase pathway. *Infect Immun* 2005; **73**(11): 7216–7225.
- 190 **Gelius E, Persson C, Karlsson, Steiner H:** A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**(4): 988–994.
- 191 **Wang M, Liu L, Wang S, Li X, Lu X, Gupta D, Dziarski R:** Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *J Immunol* 2007; **178**(5): 3116–3125.
- 192 **Mathur P, Murray B, Crowell T, Gardner H, Allaire N, Hsu YM, Thill G, Carulli JP:** Murine peptidoglycan recognition proteins Pglyrplalpha and Pglyrplbeta are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues. *Genomics* 2004; **83**(6): 1151–1163.
- 193 **Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Satta Y, Sasano T, Sugawara S, Takada H:** Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005; **7**(5): 675–686.
- 194 **Prasad AS:** Zinc: an overview. *Nutrition* 1995; **11**(1 Suppl): 93–99.
- 195 **Shankar AH, Prasad AS:** Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998; **68**(2 Suppl): 447S–463S.
- 196 **Trayer HR, Buckley CE:** Molecular properties of lysostaphin, a bacteriolytic agent specific for *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 1970; **245**(18): 4842–4846.
- 197 **LaForce FM, Boose DS:** Effect of zinc and phosphate on an antibacterial peptide isolated from lung lavage. *Infect Immun* 1984; **45**(3): 692–696.
- 198 **Blair DE, Schüttelkopf AW, MacRae JI, van Aalten DM:** Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(43): 15429–15434.
- 199 **Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Cross KJ, Paolini RA, Hoffmann B, Catmull DV, Malkoski M, Reynolds EC:** Divalent metal cations increase the activity of the antimicrobial Peptide kappacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(6): 2322–2328.
- 200 **Zasloff M:** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; **415**(6870): 389–395.
- 201 **Dziarski R, Gupta D:** *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* 2005; **73**(8): 5212–5216.
- 202 **Ghosh S, May MJ, Kopp EB:** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 225–260.
- 203 **Li Q, Verma IM:** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**(10): 725–734.
- 204 **Bonizzi G, Karin M:** The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; **25**(6): 280–288.



- 205 **Wullaert A**: Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. *Int J Med Microbiol* 2010; **300**(1): 49–56.
- 206 **Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S**: Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; **9**(22): 2723–2735.
- 207 **Hayden MS, Ghosh S**: Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; **18**(18): 2195–2224.
- 208 **Gilmore TD**: NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* 1990; **62**(5): 841–843.
- 209 **Baeuerle PA**: The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1072**(1): 63–80.
- 210 **Gilmore TD**: Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; **25**(51): 6680–6684.
- 211 **Hannink M, Temin HM**: Transactivation of gene expression by nuclear and cytoplasmic rel proteins. *Mol Cell Biol* 1989; **9**(10): 4323–4336.
- 212 **Bull P, Morley KL, Hoekstra MF, Hunter T, Verma IM**: The mouse c-rel protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain. *Mol Cell Biol* 1990; **10**(10): 5473–5485.
- 213 **Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Altmann H, Czisch M, Holak TA, Baeuerle PA**: Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation. *J Biol Chem* 1994; **269**(41): 25613–25620.
- 214 **Baldwin AS**: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649–683.
- 215 **May MJ, Ghosh S**: Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998; **19**(2): 80–88.
- 216 **Pahl HL**: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**(49): 6853–6866.
- 217 **Coburn B, Grassl GA, Finlay BB**: Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 2007; **85**(2): 112–118.
- 218 **Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galán JE**: Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997; **159**(11): 5550–5559.
- 219 **Baeuerle PA**: Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr Biol* 1998; **8**(1): R19–22.
- 220 **Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ**: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(7): 2336–2340.
- 221 **Ning R, Zhang X, Guo X, Li Q.**: Attachment of Staphylococcus aureus is required for activation of nuclear factor kappa B in human osteoblasts. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010; **42**(12): 883–892.
- 222 **Busam K, Gieringer C, Freudenberg M, Hohmann HP**: Staphylococcus aureus and derived exotoxins induce nuclear factor kappa B-like activity in murine bone marrow macrophages. *Infect Immun* 1992; **60**(5): 2008–2015.
- 223 **Hazan U, Thomas D, Alcami J, Bachelier F, Israel N, Yssel H, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F**: Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**(20): 7861–7865.
- 224 **Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, Kurimoto M**: Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **234**(2): 454–457.
- 225 **Fournier B, Williams IR, Gewirtz AT, Neish AS**: Toll-like receptor 5-dependent regulation of inflammation in systemic Salmonella enterica Serovar typhimurium infection. *Infect Immun* 2009; **77**(9): 4121–4129.
- 226 **Simon R, Samuel CE**: Activation of NF-kB-dependent gene expression by Salmonella flagellins FljC and FljB. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **355**(1): 280–285.
- 227 **Tallant T, Deb A, Kar N, Lupica J, de Veer MJ, DiDonato JA**: Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kB and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* 2004; **4**: 33.

- 228 **Claes IJJ, Segers ME, La Verhoeven T, Dusselier M, Sels BF, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J, Lebeer S:** Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb Cell Fact* 2012; **11**: 161.
- 229 **Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, Lee K, Han SH:** Lipoteichoic Acid Partially Contributes to the Inflammatory Responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008; **34**(8): 975–982.
- 230 **Hauf N, Goebel W, Fiedler F, Sokolovic Z, Kuhn M:** *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**(17): 9394–9399.
- 231 **Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R:** Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002; **12**(6): 467–471.
- 232 **Sen R, Baltimore D:** Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; **47**(6): 921–928.
- 233 **Stein B, Krämer M, Rahmsdorf HJ, Ponta H, Herrlich P:** UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J Virol* 1989; **63**(11): 4540–4544.
- 234 **Huang F:** Regulation of Salmonella flagellin-induced interleukin-8 in intestinal epithelial cells by muramyl dipeptide. *Cellular Immunol* 2012; **278**(1–2): 1–9.
- 235 **Schreck R, Bevec D, Dukor P, Baeuerle PA, Chedid L, Bahr GM:** Selection of a muramyl peptide based on its lack of activation of nuclear factor-kappa B as a potential adjuvant for AIDS vaccines. *Clin Exp Immunol* 1992; **90**(2): 188–193.
- 236 **Trede NS, Castigli E, Geha RS, Chatila T:** Microbial superantigens induce NF-kappa B in the human monocytic cell line THP-1. *J Immunol* 1993; **150**(12): 5604–5613.
- 237 **Haddad EB, Salmon M, Koto H, Barnes PJ, Adcock I, Chung KF:** Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids. *FEBS Lett* 1996; **379**(3): 265–268.
- 238 **Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA:** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; **10**(8): 2247–2258.
- 239 **Hammarskjöld ML, Simurda MC:** Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. *J Virol* 1992; **66**(11): 6496–6501.
- 240 **Ronni T, Matikainen S, Sareneva T, Melén K, Pirhonen J, Keskinen P, Julkunen I:** Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. *J Immunol* 1997; **158**(5): 2363–2374.
- 241 **Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U:** Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; **11**(24): 3482–3496.
- 242 **Hettmann T, DiDonato J, Karin M, Leiden JM:** An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 1999; **189**(1): 145–158.
- 243 **Senfleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M:** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001; **293**(5534): 1495–1499.
- 244 **NF-kB Target Genes** »NF-kB Transcription Factors | Boston University«. Im Internet: <http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>
- 245 **Scheidereit C:** IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006; **25**(51): 6685–6705.
- 246 **Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G:** Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 2006; **25**(51): 6706–6716.
- 247 **Dinarello CA:** Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; **118**(2): 503–508.
- 248 **Joseph L, Fink LM, Hauer-Jensen M:** Cytokines in coagulation and thrombosis: a preclinical and clinical review. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; **13**(2): 105–116.
- 249 **Murphy KM, Travers P, Walport M:** *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
- 250 **Commins SP, Borish L, Steinke JW:** Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**(2 Suppl 2): S53-72.

- 251 **Loppnow H**: Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. Internist (Berl) 2001; **42**(1): 13–27.
- 252 **Fitzgerald KA**: The cytokine factsbook. 2. Aufl. San Diego: Academic Press; 2001.
- 253 **Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF**: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest 1995; **95**(1): 55–65.
- 254 **Nadeem I, Khalid H., Samina T**: Cytokines. International Journal of Pathology 2004; **2**(1): 47–58.
- 255 **Murphy KM, Reiner SL**: The lineage decisions of helper T cells. Nat Rev Immunol 2002; **2**(12): 933–944.
- 256 **Zetterstrom M, Sundgren-Andersson AK, Ostlund P, Bartfai T**: Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. Ann N Y Acad Sci 1998; **856**: 48–52.
- 257 **Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J**: Biology of interleukin-10. Cytokine Growth Factor Rev 2010; **21**(5): 331–344.
- 258 **Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr**: Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. J Biol Chem 1999; **274**(45): 31868–31874.
- 259 **Kuwata H, Watanabe Y, Miyoshi H, Yamamoto M, Kaisho T, Takeda K, Akira S**: IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. Blood 2003; **102**(12): 4123–4129.
- 260 **Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U**: The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. Cell 1993; **72**(5): 729–739.
- 261 **Zamora R, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Segura B, Maldonado V, Melendez-Zajgla J**: Depletion of the oncoprotein Bcl-3 induces centrosome amplification and aneuploidy in cancer cells. Mol Cancer 2010; **9**: 223.
- 262 **Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM**: IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. J Immunol 1993; **151**(3): 1224–1234.
- 263 **Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkoç T, Wenig R, Colonna M, Daigle I, Flory E, Blaser K, Akdis CA**: IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. J Allergy Clin Immunol 2007; **120**(1): 76–83.
- 264 **McCoy KD, Le Gros G**: The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. Immunol Cell Biol 1999; **77**(1): 1–10.
- 265 **Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB**: T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. Nat Rev Immunol 2001; **1**(3): 220–228.
- 266 **Saito T, Yamasaki S**: Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. Immunol Rev 2003; **192**(1): 143–160.
- 267 **Zheng Z, Narita M, Takahashi M, Liu A, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y**: Induction of T cell anergy by the treatment with IL-10-treated dendritic cells. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; **27**(2): 93–103.
- 268 **Steinbrink K, Wöflf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH**: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J Immunol 1997; **159**(10): 4772–4780.
- 269 **Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J, Enk AH**: Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. Blood 1999; **93**(5): 1634–1642.
- 270 **Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH**: CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood 2002; **99**(7): 2468–2476.
- 271 **Zlotnik A, Yoshie O**: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 2000; **12**(2): 121–127.
- 272 **Moser B, Loetscher P**: Lymphocyte traffic control by chemokines. Nat Immunol 2001; **2**(2): 123–128.
- 273 **Borish LC, Steinke JW**: 2. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 2003; **111**(2 Suppl): S460–475.
- 274 **Allen SJ, Crown SE, Handel TM**: Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. Annu Rev Immunol 2007; **25**: 787–820.

- 275 **Stievano L, Piovani E, Amadori A:** C and CX3C chemokines: cell sources and physiopathological implications. *Crit Rev Immunol* 2004; **24**(3): 205–228.
- 276 **Rajaratnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, Clark-Lewis I:** Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 1994; **264**(5155): 90–92.
- 277 **Wolf M, Delgado MB, Jones SA, Dewald B, Clark-Lewis I, Baggiolini M:** Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol* 1998; **28**(1): 164–170.
- 278 **Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA:** Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*. 1990; **171**(4): 1155–1162.
- 279 **Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M:** A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1988; **167**(5): 1547–1559.
- 280 **Schröder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E:** Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 1987; **139**(10): 3474–3483.
- 281 **Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tschanner V, Walz A, Baggiolini M:** Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 1988; **2**(11): 2702–2706.
- 282 **Paccaud JP, Schifferli JA, Baggiolini M:** NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **166**(1): 187–192.
- 283 **Mukaida N, Harada A, Matsushima K:** Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; **9**(1): 9–23.
- 284 **Yu CL, Sun KH, Shei SC, Tsai CY, Tsai ST, Wang JC, Liao TS, Lin WM, Chen HL, Yu HS:** Interleukin 8 modulates interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release from normal human mononuclear cells. *Immunopharmacology* 1994; **27**(3): 207–214.
- 285 **Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M:** Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002; **72**(5): 847–855.
- 286 **Schröder JM, Christophers E:** Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* 1989; **142**(1): 244–251.
- 287 **Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL:** Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol* 1990; **144**(7): 2609–2613.
- 288 **Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K:** IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* 1991; **74**(1): 60–67.
- 289 **Shapiro L, Dinarello CA:** Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(26): 12230–12234.
- 290 **Sonoda Y, Kasahara T, Yamaguchi Y, Kuno K, Matsushima K, Mukaida N:** Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 1997; **272**(24): 15366–15372.
- 291 **Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K:** Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997; **65**(8): 3218–3224.
- 292 **Mastronarde JG, Monick MM, Mukaida N, Matsushima K, Hunninghake GW:** Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J Infect Dis* 1998; **177**(5): 1275–1281.
- 293 **McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL:** Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 1993; **123**(4): 895–907.
- 294 **Scharek L, Tedin K:** The porcine immune system—differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by *Salmonella* serovars. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; **120**(7–8): 347–354.
- 295 **Pabst R, Rothkotter HJ:** Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; **72**(1–2): 167–173.

- 296 **Sellwood R:** Escherichia coli-associated porcine neonatal diarrhea: antibacterial activities of colostrum from genetically susceptible and resistant sows. *Infect Immun* 1982; **35**(2): 396–401.
- 297 **Hurley WL, Theil PK:** Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* 2011; **3**(4): 442–474.
- 298 **Allen WD, Porter P:** Localization by immunofluorescence of secretory component and IgA in the intestinal mucosa of the young pig. *Immunology* 1973; **24**(2): 365–374.
- 299 **Rothkötter HJ, Pabst R:** Lymphocyte subsets in jejunal and ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 1989; **67**(1): 103–108.
- 300 **Makala LHC, Suzuki N, Nagasawa H:** Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine. *Pathobiology* 2002; **70**(2): 55–68.
- 301 **Binns RM, Licence ST:** Patterns of migration of labelled blood lymphocyte subpopulations: evidence for two types of Peyer's patch in the young pig. *Adv Exp Med Biol* 1985; **186**: 661–668.
- 302 **Rothkötter HJ, Hriesik C, Barman NN, Pabst R:** B and also T lymphocytes migrate via gut lymph to all lymphoid organs and the gut wall, but only IgA+ cells accumulate in the lamina propria of the intestinal mucosa. *Eur J Immunol* 1999; **29**(1): 327–333.
- 303 **Rothkötter H:** Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view. *Dev Comp Immunol* 2008; **33**(3): 267–272.
- 304 **Snoeck V, Peters IR, Cox E:** The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res* 2006; **37**(3): 455–467.
- 305 **Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG:** Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 1998; **66**(10): 4579–4587.
- 306 **Tsolis RM, Adams LG, Ficht TA, Bäumler AJ:** Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 1999; **67**(9): 4879–4885.
- 307 **Zhang G, Wu H, Shi J, Ganz T, Ross CR, Blecha F:** Molecular cloning and tissue expression of porcine beta-defensin-1. *FEBS Lett* 1998; **424**(1–2): 37–40.
- 308 **Oswald IP:** Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine. *Vet Res* 2006; **37**(3): 359–368.
- 309 **Stadnyk AW:** Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol* 2002; **16**(4): 241–246.
- 310 **McCracken BA, Gaskins HR, Ruwe-Kaiser PJ, Klasing KC, Jewell DE:** Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *J Nutr* 1995; **125**(11): 2838–2845.
- 311 **McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuckermann FA, Gaskins HR:** Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr* 1999; **129**(3): 613–619.
- 312 **Pié S, Lallès JP, Blazy F et al.:** Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 2004; **134**(3): 641–647.
- 313 **Splichal I, Trebichavský I, Muneta Y, Mori Y:** Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Vet Res* 2002; **33**(3): 291–297.
- 314 **Milo LA, Correa-Matos NJ, Donovan SM, Tappenden KA:** Neutrophil and small intestinal lymphocyte migration after *Salmonella typhimurium* infection: impact of fermentable fiber. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; **39**(1): 73–79.
- 315 **Lin G, Pearson AE, Scamurra RW, Zhou Y, Baarsch MJ, Weiss DJ, Murtaugh MP:** Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1994; **269**(1): 77–85.
- 316 **Bozic CR, Gerard NP, Uexkull-Guldenband C, Kolakowski LF Jr, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C:** The murine interleukin 8 type B receptor homologue and its ligands. Expression and biological characterization. *J Biol Chem* 1994; **269**(47): 29355–29358.
- 317 **Saalmüller A, Reddehase MJ, Bühring HJ, Jonjić S, Koszinowski UH:** Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; **17**(9): 1297–1301.
- 318 **Zuckermann FA, Husmann RJ:** Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996; **87**(3): 500–512.
- 319 **Denyer MS, Wileman TE, Stirling CM, Zuber B, Takamatsu HH:** Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; **110**(3–4): 279–292.

- 320 **FAO/WHO Working Group:** Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on drafting. 2002: 1–11.
- 321 **European Food Safety Authority:** QPS. Qualified presumption of safety of micro-organisms in food and feed. Parma: EFSA; op. 2005.
- 322 **European Food Safety Authority:** Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. EFSA Journal 2005; **226**: 1–12.
- 323 **Vanderpool C, Yan F, Polk BD:** Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis 2008; **14**(11): 1585–1596.
- 324 **Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL:** A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature 2008; **453**(7195): 620–625.
- 325 **Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME:** Enterococci at the crossroads of food safety? Int J Food Microbiol 1999; **47**(1–2): 1–24.
- 326 **Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V:** Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin Infect Dis 2003; **36**(6): 775–780.
- 327 **Mäkeläinen H, Tahvonen R, Salminen S, Ouwehand AC:** In vivo safety assessment of two Bifidobacterium longum strains. Microbiol Immunol 2003; **47**(12): 911–914.
- 328 **Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH:** Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. Am J Clin Nutr 2004; **79**(2): 261–267.
- 329 **European Food Safety Authority:** Guidance on the safety assessment of Enterococcus faecium in animal nutrition. EFSA Journal 2012; **10**: 2682.
- 330 **Tannock GW:** Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. Trends Biotechnol 1997; **15**(7): 270–274.
- 331 **Collins JK, Thornton G, Sullivan GO:** Selection of Probiotic Strains for Human Applications. Int Dairy J 1998; **8**(5–6): 487–490.
- 332 **Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK:** In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr 2001; **73**(2 Suppl): 386S–392S.
- 333 **Nissle A:** Über die Grundlagen einer neuen ursächlichen Bekämpfung der pathologischen Darmflora. Dt Med Wschr 1916; **42**: 1181–1184.
- 334 **Nissle A:** Old and new experiences on therapeutic successes by restoration of the colonic flora with mutaflor in gastrointestinal diseases. Med Welt 1961; **29–30**: 1519–1523.
- 335 **Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV):** Abschlussbericht der Arbeitsgruppe "Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln" am BgVV. Im Internet: <http://www.bfr.bund.de/cm/343/probiot.pdf>
- 336 **EHPM:** List of references–part 1; A codified version of the references, part 1 (vitamins, minerals, macro-nutrients, dietary fibers, probiotics, foods and beverages and diets); 2007. Im Internet: <http://www.ehpm.org/>
- 337 **Nurmi E, Rantala M:** New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature 1973; **241**(5386): 210–211.
- 338 **Collins FM, Carter PB:** Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. Infect Immun 1978; **21**(1): 41–47.
- 339 **Fuller R:** Probiotics for farm animals. In Tannock GW (ed.): Probiotics: a critical review. Horizon Scientific Press, Norfolk/England 1999: 15–22.
- 340 **Tannock GW, Hrsg:** Probiotics: a critical review. Wymondham, Eng: Horizon Scientific Press, Norfolk/England 1999.
- 341 **Tannock GW:** Probiotics: time for a dose of realism. Curr Issues Intest Microbiol 2003; **4**(2): 33–42.
- 342 **Reuter G:** Probiotika--Möglichkeiten und Grenzen ihres Einsatzes in Lebensmitteln, im Tierfutter und in pharmazeutischen Präparaten für Mensch und Tier. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2001; **114**(11–12): 410–419.
- 343 **Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH:** Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livestock Production Science 1997; **51**(1–3): 215–236.

- 344 **Bark LJ, Crenshaw TD, Leibbrandt VD:** The effect of meal intervals and weaning on feed intake of early weaned pigs. *J Anim Sci* 1986; **62**(5): 1233–1239.
- 345 **Lallès J, Bosi P, Smidt H, Stokes CR:** Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livestock Science* 2007; **108**(1–3): 82–93.
- 346 **Kanitz E, Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A, Stabenow B:** Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. *Brain Behav Immun* 2004; **18**(1): 35–45.
- 347 **Tuchscherer M, Kanitz E, Puppe B, Tuchscherer A:** Early social isolation alters behavioral and physiological responses to an endotoxin challenge in piglets. *Horm Behav* 2006; **50**(5): 753–761.
- 348 **Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, Kritas SK, Siochu A, Kyriakis SC:** Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2004; **88**(11–12): 381–392.
- 349 **Böhmer BM, Kramer W, Roth-Maier DA:** Dietary probiotic supplementation and resulting effects on performance, health status, and microbial characteristics of primiparous sows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2006; **90**(7–8): 309–315.
- 350 **Shu Q, Qu F, Gill HS:** Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weaning diarrhoea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; **33**(2): 171–177.
- 351 **Roesler U, Vonaltrock A, Heller P, Bremerich S, Arnold T, Lehmann J, Waldmann KH, Truyen U, Hensel A:** Effects of fluorequinolone treatment acidified feed, and improved hygiene measures on the occurrence of *Salmonella* Typhimurium DT104 in an integrated pig breeding herd. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; **52**(2): 69–74.
- 352 **Wales AD, Cook AJC, Davies RH:** Producing *Salmonella*-free pigs: a review focusing on interventions at weaning. *Vet Rec* 2011; **168**(10): 267–276.
- 353 **Jensen ML, Cilieborg MS, Østergaard MV, Bering SB, Jørgensen CB, Sangild PT:** *Escherichia coli* challenge in newborn pigs. *J Anim Sci* 2012; **90**(Suppl 4): 43–45.
- 354 **Alexopoulos C, Georgoulakis IE, Tzivara A, Kyriakis CS, Govaris A, Kyriakis SC:** Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004; **51**(6): 306–312.
- 355 **Casey PG, Gardiner GE, Casey G, Bradshaw B, Lawlor PG, Lynch PB, Leonard FC, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Hill C:** A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**(6): 1858–1863.
- 356 **Nemcová R, Bomba A, Gancarcíková S, Reiffová K, Guba P, Koscová J, Jonecová Z, Sciranková L, Bugarský A:** Effects of the administration of lactobacilli, maltodextrins and fructooligosaccharides upon the adhesion of *E. coli* O8:K88 to the intestinal mucosa and organic acid levels in the gut contents of piglets. *Vet Res Commun* 2007; **31**(7): 791–800.
- 357 **Konstantinov SR, Smidt H, Akkermans AD, Casini L, Trevisi P, Mazzoni M, De Filippi S, Bosi P, de Vos WM:** Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; **66**(3): 599–607.
- 358 **Zhang L, Xu Y, Liu H, Lai T, Ma JL, Wang JF, Zhu YH:** Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet Microbiol* 2010; **141**(1–2): 142–148.
- 359 **Zeyner A, Boldt E:** Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2006; **90**(1–2): 25–31.
- 360 **Bontempo V, Di Giancamillo A, Savoini G, Dell'Orto V, Domeneghini C:** Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weaning piglets. *Animal Feed Science and Technology* 2006; **129**(3–4): 224–236.
- 361 **Lessard M, Dupuis M, Gagnon N, Nadeau E, Matte JJ, Goulet J, Fairbrother JM:** Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae* boulardii modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J Anim Sci* 2009; **87**(3): 922–934.
- 362 **Moran CA, Scholten RHJ, Tricarico JM, Brooks PH, Verstegen MW:** Fermentation of wheat: effects of backslipping different proportions of pre-fermented wheat on the microbial and chemical composition. *Arch Anim Nutr* 2006; **60**(2): 158–169.

- 363 **Chaucheyras-Durand F, Durand H:** Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 2010; **1**(1): 3–9.
- 364 **Schulze J, Ölschläger T, Sonnenborn U, Kruis W:** Probiotika: Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Stuttgart: Hippokrates; 2008.
- 365 **DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.):** Ernährungsbericht 2004. Teil 3: Kapitel 6. Im Internet: <http://www.dge.de/>
- 366 **Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF:** NF- $\kappa$ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* 2004; **72**(10): 5750–5758.
- 367 **Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO:** Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; **290**(4): C1018–1030.
- 368 **Schlee M, Harder J, Köten B, Stange EF, Wehkamp J, Fellermann K:** Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte  $\beta$ -defensin 2. *Clin Exp Immunol* 2008; **151**(3): 528–535.
- 369 **Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA:** Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 2007; **9**(3): 804–816.
- 370 **Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA:** Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; **276**(4 Pt 1): G941–950.
- 371 **Azevedo MS, Zhang W, Wen K, Gonzalez AM, Saif LJ, Yousef AE, Yuan L:** *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* modulate cytokine responses in gnotobiotic pigs infected with human rotavirus. *Benef Microbes* 2012; **3**(1): 33–42.
- 372 **Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J:** Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus GG* decrease tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005; **135**(7): 1752–1756.
- 373 **Fitzpatrick LR, Small J, Hoerr RA, Bostwick EF, Maines L, Koltun WA:** In vitro and in vivo effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. *Br J Nutr* 2008; **100**(3): 530–541.
- 374 **Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y:** Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE* 2008; **3**(7): e2753.
- 375 **Thomas CM, Versalovic J:** Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010; **1**(3): 148–163.
- 376 **Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K:** DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; **126**(5): 1358–1373.
- 377 **Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Gil A:** Cell-Free culture supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. *PLoS One* 2013; **8**(3): e59370.
- 378 **Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y:** Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**(3): 696–702.
- 379 **Ljungh A, Wadström T:** Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2006; **7**(2): 73–89.
- 380 **Vuyst L de, Leroy F:** Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; **13**(4): 194–199.
- 381 **Buts J:** The probiotic *Saccharomyces boulardii* upgrades intestinal digestive functions by several mechanisms. *Acta Gastroenterol Belg* 2009; **72**(2): 274–276.
- 382 **Kelesidis T, Pothoulakis C:** Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therap Adv Gastroenterol* 2012; **5**(2): 111–125.



- 383 **Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y:** Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 2004; **72**(4): 2240–2247.
- 384 **Samot J, Badet C:** Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* 2013; **19**: 34–38.
- 385 **Turroni S, Vitali B, Bendazzoli C, Candela M, Gotti R, Federici F, Pirovano F, Brigidi P:** Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 2007; **103**(5): 1600–1609.
- 386 **Waśko A, Kieliszek M, Targoński Z:** Purification and characterization of a proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* OXY. *Prep Biochem Biotechnol* 2012; **42**(5): 476–488.
- 387 **Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C:** *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 1999; **67**(1): 302–307.
- 388 **Resta-Lenert S, Barrett KE:** Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 2003; **52**(7): 988–997.
- 389 **Beachey EH:** Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981; **143**(3): 325–345.
- 390 **Baccigalupi L, Di Donato A, Parlato M, Luongo D, Carbone V, Rossi M, Ricca E, De Felice M:** Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Res Microbiol* 2005; **156**(7): 830–836.
- 391 **Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E:** Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotech* 2008; **2008**: 1–6.
- 392 **Spencer RJ, Chesson A:** The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J Appl Bacteriol* 1994; **77**(2): 215–220.
- 393 **Chauvière G, Coconnier MH, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL:** Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (EPEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **70**(3): 213–217.
- 394 **Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S:** Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992; **37**(1): 121–128.
- 395 **Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA:** Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 2003; **52**(6): 827–833.
- 396 **Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ:** The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; **26**(2): 137–142.
- 397 **Jin LZ, Marquardt RR, Zhao X:** A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**(10): 4200–4204.
- 398 **Galdeano CM, Perdígón G:** Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol* 2004; **97**(4): 673–681.
- 399 **Kullen MJ, Amann MM, O'Shaughnessy MJ, O'Sullivan DJ, Busta FF, Brady LJ:** Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J Nutr* 1997; **127**(1): 89–94.
- 400 **Bezkorovainy A:** Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**(2 Suppl): 399S–405S.
- 401 **Abe F, Ishibashi N, Shimamura S:** Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J Dairy Sci* 1995; **78**(12): 2838–2846.
- 402 **Galán JE, Cossart P:** Host-pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines. *Curr Opin Microbiol* 2005; **8**(1): 1–3.
- 403 **Deplancke B, Gaskins HR:** Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**(6): 1131S–1141S.
- 404 **Lu L, Walker WA:** Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**(6): 1124S–1130S.
- 405 **Otte J, Podolsky DK:** Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **286**(4): G613–G626.

- 406 **Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P:** Lactobacillus casei DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic Escherichia coli-infected T84 cells. Res Microbiol 2005; **156**(2): 256–262.
- 407 **Phillips-Quagliata JM, Roux ME, Arny M, Kelly-Hatfield P, McWilliams M, Lamm ME:** Migration and regulation of B-cells in the mucosal immune system. Ann N Y Acad Sci 1983; **409**: 194–203.
- 408 **Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H:** Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. Pediatr Res 1992; **32**(2): 141–144.
- 409 **Schultz M, Strauch UG, Linde H, Watzl S, Obermeier F, Göttl C, Dunger N, Grunwald N, Schölmerich J, Rath HC:** Preventive effects of Escherichia coli strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. Clin Diagn Lab Immunol 2004; **11**(2): 372–378.
- 410 **Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A:** Escherichia coli strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. Infect Immun 2006; **74**(7): 4075–4082.
- 411 **Rasche C, Wolfram C, Wahls M, Worm M:** Differential immunomodulating effects of inactivated probiotic bacteria on the allergic immune response. Acta Derm Venereol 2007; **87**(4): 305–311.
- 412 **Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E:** Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. Vaccine 2000; **18**(23): 2613–2623.
- 413 **Kitazawa H, Ino T, Kawai Y, Itoh T, Saito T:** A novel immunostimulating aspect of Lactobacillus gasseri: induction of "Gasserokine" as chemoattractants for macrophages. Int J Food Microbiol 2002; **77**(1–2): 29–38.
- 414 **Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ:** Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J Immunol 2002; **168**(1): 171–178.
- 415 **Takahashi T, Nakagawa E, Nara T, Yajima T, Kuwata T:** Effects of orally ingested Bifidobacterium longum on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. Biosci Biotechnol Biochem 1998; **62**(1): 10–15.
- 416 **Vitiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M, de Budeguer MV, Perdígón G:** Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. Biocell 2000; **24**(3): 223–232.
- 417 **Herías MV, Hessle C, Telemo E, Midtvedt T, Hanson LA, Wold AE:** Immunomodulatory effects of Lactobacillus plantarum colonizing the intestine of gnotobiotic rats. Clin Exp Immunol 1999; **116**(2): 283–290.
- 418 **Perdígón G, Alvarez S, Pesce de Ruiz Holgado A:** Immunoadjuvant activity of oral Lactobacillus casei: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. J Dairy Res 1991; **58**(4): 485–496.
- 419 **Perdígón G, Medina M, Vintiñi E, Valdez JC:** Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. Int J Immunopathol Pharmacol 2000; **13**(3): 141–150.
- 420 **Wolf HM, Fischer MB, Pühringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM:** Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes. Blood 1994; **83**(5): 1278–1288.
- 421 **Perdígón G, Macías ME de, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP:** Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus. Immunology 1988; **63**(1): 17–23.
- 422 **Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A:** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. J Dairy Sci 1995; **78**(3): 491–497.
- 423 **Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A:** Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. Am J Clin Nutr 1997; **66**(2): 515S–520S.
- 424 **Lee J, Shin J, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG, Woo HJ:** Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. J Vet Sci 2004; **5**(1): 41–48.

- 425 **Takeda K, Okumura K**: Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J Nutr* 2007; **137(3Suppl 2)**: 791S–793S.
- 426 **Gill HS, Cross ML, Rutherford KJ, Gopal PK**: Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. *Br J Biomed Sci* 2001; **58(2)**: 94–96.
- 427 **Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML**: Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001; **21(4)**: 264–271.
- 428 **Takeda K, Suzuki T, Shimada S, Shida K, Nanno M, Okumura K**: Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol* 2006; **146(1)**: 109–115.
- 429 **Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodríguez JM, Xaus J**: Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007; **23(3)**: 254–260.
- 430 **Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M**: Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 2002; **97(5)**: 1182–1186.
- 431 **McCracken VJ, Chun T, Baldeón ME, Ahrné S, Molin G, Mackie RI, Gaskins HR**: TNF-alpha sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; **227(8)**: 665–670.
- 432 **Ma D, Forsythe P, Bienenstock J**: Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004; **72(9)**: 5308–5314.
- 433 **Vinderola G, Matar C, Perdigon G**: Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; **12(9)**: 1075–1084.
- 434 **Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K**: Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* 2006; **143(1)**: 103–109.
- 435 **Tien M, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti PJ, Pédrón T**: Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006; **176(2)**: 1228–1237.
- 436 **Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T**: Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995; **13(3)**: 310–312.
- 437 **Park JH, Um JI, Lee BJ, Goh JS, Park SY, Kim WS, Kim PH**: Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol* 2002; **219(1)**: 22–27.
- 438 **Shu Q, Lin H, Rutherford KJ, Fenwick SG, Prasad J, Gopal PK, Gill HS**: Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol Immunol* 2000; **44(4)**: 213–222.
- 439 **Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T**: Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 1998; **42(1–2)**: 39–44.
- 440 **Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin EJ, von der Weid T**: Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infect Immun* 2003; **71(1)**: 428–436.
- 441 **Livingston M, Loach D, Wilson M, Tannock GW, Baird M**: Gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 stimulates an immunoregulatory response. *Immunol Cell Biol* 2010; **88(1)**: 99–102.
- 442 **Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M**: Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 2005; **174(6)**: 3237–3246.
- 443 **Grewal IS, Flavell RA**: CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 111–135.
- 444 **Tsai Y, Cheng P, Liao J, Pan TM**: Effect of the administration of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity. *Int Immunopharmacol* 2010; **10(7)**: 791–798.
- 445 **Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR**: Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102(8)**: 2880–2885.

- 446 **Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Watanabe K, Nanno M:** Induction of interleukin-12 by Lactobacillus strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. *J Dairy Sci* 2006; **89**(9): 3306–3317.
- 447 **Moore KW, Waal Malefyt R de, Coffman RL, O'Garra A:** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683–765.
- 448 **Pena JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG, Versalovic J:** Probiotic Lactobacillus spp. diminish Helicobacter hepaticus-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 2005; **73**(2): 912–920.
- 449 **Chiang S, Liu C, Tseng K, Mau J, Pan T:** Immunomodulatory effects of dead Lactobacillus on murine splenocytes and macrophages. *Food and Agricultural Immunology* 2012; **23**(2): 183–202.
- 450 **Kato I, Endo-Tanaka K, Yokokura T:** Suppressive effects of the oral administration of Lactobacillus casei on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Life Sci* 1998; **63**(8): 635–644.
- 451 **Resta-Lenert S, Barrett KE:** Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006; **130**(3): 731–746.
- 452 **Watanabe T, Nishio H, Tanigawa T, Yamagami H, Okazaki H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Asahara T, Nomoto K, Higuchi K, Takeuchi K, Arakawa T:** Probiotic Lactobacillus casei strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **297**(3): G506–513.
- 453 **Lin PW, Myers LE, Ray L, Song SC, Nasr TR, Berardinelli AJ, Kundu K, Murthy N, Hansen JM, Neish AS:** Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**(8): 1205–1211.
- 454 **Petrof EO, Claud EC, Sun J, Abramova T, Guo Y, Waypa TS, He SM, Nakagawa Y, Chang EB:** Bacteria-free solution derived from lactobacillus plantarum inhibits multiple NF-kappaB pathways and inhibits proteasome function. *Inflamm Bowel Dis* 2009; **15**(10): 1537–1547.
- 455 **Wu GD, Huang N, Wen X, Keilbaugh SA, Yang H:** High-level expression of I kappa B-beta in the surface epithelium of the colon: in vitro evidence for an immunomodulatory role. *J Leukoc Biol* 1999; **66**(6): 1049–1056.
- 456 **Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D:** Innate mechanisms for Bifidobacterium lactis to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 2005; **115**(4): 441–450.
- 457 **Menard S:** Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 2004; **53**(6): 821–828.
- 458 **Kim HG, Kim N, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, Kim JY, Han SH, Chung DK:** Lipoteichoic acid isolated from Lactobacillus plantarum inhibits lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice. *J Immunol* 2008; **180**(4): 2553–2561.
- 459 **Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y:** Lipoteichoic acids from Lactobacillus strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; **10**(2): 259–266.
- 460 **Iyer C, Kosters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J:** Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kB and MAPK signalling. *Cell Microbiol* 2008; **10**(7): 1442–1452.
- 461 **Carr FJ, Chill D, Maida N:** The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 2002; **28**(4): 281–370.
- 462 **Sherman JM:** THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev* 1937; **1**(1): 3–97.
- 463 **Schleifer KH, Kilpper-Bälz R, Kraus J, Gehring F:** Relatedness and classification of Streptococcus mutans and "mutans-like" streptococci. *J Dent Res* 1984; **63**(8): 1047–1050.
- 464 **Devriese LA, Pot B, Collins MD:** Phenotypic identification of the genus Enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* 1993; **75**(5): 399–408.
- 465 **Canganella F, Gasbarri M, Massa S, Trovattelli L:** A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding. *Microbiol Res* 1996; **151**(2): 167–175.
- 466 **Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS:** Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; **7**(4): 462–478.

- 467 **Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, Haesebrouck F:** Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**(10): 2285–2287.
- 468 **Leclerc H, Devriese LA, Mossel DA:** Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol* 1996; **81**(5): 459–466.
- 469 **Wade JJ:** Enterococcus faecium in hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; **16**(2): 113–119.
- 470 **Morrison AJ, Wenzel RP:** Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years' experience at a university hospital. *Arch Intern Med* 1986; **146**(8): 1549–1551.
- 471 **Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities:** NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**(11): 996–1011.
- 472 **Giraffa G:** Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 2003; **88**(2–3): 215–222.
- 473 **Turtura GC, Lorenzelli P:** Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiol Res* 1994; **149**(2): 203–213.
- 474 **Domann E, Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne C, Zimmermann K, Chakraborty T:** Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic Enterococcus faecalis strain Symbioflor 1. *Int J Med Microbiol* 2007; **297**(7–8): 533–539.
- 475 **Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, D'Apuzzo V, Heim F, Karly M, Lodi R, Politta G, Vonbank F, Zeltner L:** Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med Res* 1989; **17**(4): 333–338.
- 476 **Buydens P, Debeuckelaere S:** Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 1996; **31**(9): 887–891.
- 477 **Christoffersen TE, Jensen H, Kleiveland CR, Dørum G, Jacobsen M, Lea T:** In vitro comparison of commensal, probiotic and pathogenic strains of Enterococcus faecalis. *Br J Nutr* 2012; **108**(11): 2043–2053.
- 478 **Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF:** Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004: CD003048.
- 479 **Lodemann U, Hübener K, Jansen N, Martens H:** Effects of Enterococcus faecium NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Arch Anim Nutr* 2006; **60**(1): 35–48.
- 480 **Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS, O'Donnell AG:** Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**(11): 5134–5138.
- 481 **Rinkinen M, Jalava K, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC:** Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal Enterococcus faecium colonization? *Vet Microbiol* 2003; **92**(1–2): 111–119.
- 482 **Kreuzer S, Janczyk P, Assmus J, Schmidt MF, Brockmann GA, Nöckler K:** No beneficial effects evident for Enterococcus faecium NCIMB 10415 in weaned pigs infected with Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**(14): 4816–4825.
- 483 **Foulquie Moreno MR, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L:** Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol* 2003; **94**(2): 214–229.
- 484 **Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M:** Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* 1961; **31**: 532–546.
- 485 **Prasad AS, Miale A, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR:** Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med* 1963; **61**: 537–549.
- 486 **Prasad AS, Beck FWJ, Snell DC, Kucuk O:** Zinc in cancer prevention. *Nutr Cancer* 2009; **61**(6): 879–887.

- 487 **Rink L, Gabriel P:** Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals* 2001; **14**(3–4): 367–383.
- 488 **Ibs K, Rink L:** Zinc-altered immune function. *J Nutr* 2003; **133**(5 Suppl 1): 1452S–1456S.
- 489 **O'Dell BL:** Role of zinc in plasma membrane function. *J Nutr* 2000; **130**(5S Suppl): 1432S–1436S.
- 490 **Scott BJ, Bradwell AR:** Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clin Chem* 1983; **29**(4): 629–633.
- 491 **Cousins RJ:** Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985; **65**(2): 238–309.
- 492 **Klaiman AP, Victory W, Kluger MJ, Vander AJ:** Urinary excretion of zinc and iron following acute injection of dead bacteria in dog. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981; **167**(2): 165–171.
- 493 **Weiss G, Widner B, Zoller H, Fuchs D:** The immunobiology of zinc and the kidney. *Immunol Today* 1998; **19**(4): 193–194.
- 494 **Abdel-Mageed AB, Oehme FW:** A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: I. Zinc. *Vet Hum Toxicol* 1990; **32**(1): 34–39.
- 495 **Cai L, Li X, Song Y, Cherian MG:** Essentiality, toxicology and chelation therapy of zinc and copper. *Curr Med Chem* 2005; **12**(23): 2753–2763.
- 496 **Wellinghausen N, Fischer A, Kirchner H, Rink L:** Interaction of zinc ions with human peripheral blood mononuclear cells. *Cell Immunol* 1996; **171**(2): 255–261.
- 497 **McMahon RJ, Cousins RJ:** Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**(9): 4841–4846.
- 498 **Bentley PJ:** Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. *Comp Biochem Physiol C* 1992; **101**(2): 215–217.
- 499 **Hogstrand C, Verboost PM, Bonga SE, Wood CM:** Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. *Am J Physiol* 1996; **270**(5 Pt 2): R1141–1147.
- 500 **Eide DJ:** The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflugers Arch* 2004; **447**(5): 796–800.
- 501 **Palmiter RD, Huang L:** Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch* 2004; **447**(5): 744–751.
- 502 **Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA:** Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* 2006; **281**(34): 24085–24089.
- 503 **Rink L, Haase H:** Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2007; **28**(1): 1–4.
- 504 **Aydemir TB, Blanchard RK, Cousins RJ:** Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(6): 1699–1704.
- 505 **Taylor KM, Vichova P, Jordan N, Hiscox S, Hendley R, Nicholson RI:** ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer Cells. *Endocrinology* 2008; **149**(10): 4912–4920.
- 506 **Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael DJ, Ruben B, Fazel N:** Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J Am Acad Dermatol* 2007; **56**(1): 116–124.
- 507 **Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK:** Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* 2007; **388**(12): 1301–1312.
- 508 **Küry S, Dréno B, Bézieau S, Giraudet S, Kharfi M, Kamoun R, Moisan JP:** Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet* 2002; **31**(3): 239–240.
- 509 **Cousins RJ, Lee-Ambrose LM:** Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *J Nutr* 1992; **122**(1): 56–64.
- 510 **Maret W:** The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 2000; **130**(5S Suppl): 1455S–1458S.
- 511 **Davis SR, McMahon RJ, Cousins RJ:** Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *J Nutr* 1998; **128**(5): 825–831.
- 512 **Krezel A, Maret W:** Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *J Am Chem Soc* 2007; **129**(35): 10911–10921.
- 513 **Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W:** Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J* 1993; **12**(4): 1355–1362.
- 514 **Laity JH, Andrews GK:** Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys* 2007; **463**(2): 201–210.

- 515 **Heuchel R, Radtke F, Georgiev O et al.**: The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J* 1994; **13**(12): 2870–2875.
- 516 **Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK**: The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000; **275**(44): 34803–34809.
- 517 **Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ**: Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr* 2001; **131**(1): 46–52.
- 518 **Vallee BL, Auld DS**: Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990; **29**(24): 5647–5659.
- 519 **Vallee BL, Falchuk KH**: The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993; **73**(1): 79–118.
- 520 **Prasad AS**: *Biochemistry of zinc*. Plenum Press, 1993.
- 521 **Chaloux E, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Pons G, Boxer LM, Bartrons R, Ventura F**: A zinc-finger transcription factor induced by TGF-beta promotes apoptotic cell death in epithelial Mv1Lu cells. *FEBS Lett* 1999; **457**(3): 478–482.
- 522 **Andres ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G**: CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(17): 9873–9878.
- 523 **Pavletich NP, Pabo CO**: Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 1993; **261**(5129): 1701–1707.
- 524 **Chausmer AB**: Zinc, insulin and diabetes. *J Am Coll Nutr* 1998; **17**(2): 109–115.
- 525 **Prasad AS**: Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Fed Proc* 1984; **43**(13): 2829–2834.
- 526 **Favier AE**: The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biol Trace Elem Res* 1992; **32**: 363–382.
- 527 **Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cremaschi G, Goldman CG, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J**: Zinc status and immune system relationship: a review. *Biol Trace Elem Res* 2000; **76**(3): 193–205.
- 528 **Cousins RJ, Leinart AS**: Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. *FASEB J* 1988; **2**(13): 2884–2890.
- 529 **Liuzzi JP**: Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(19): 6843–6848.
- 530 **Begum NA, Kobayashi M, Moriwaki Y, Matsumoto M, Toyoshima K, Seya T**: Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* 2002; **80**(6): 630–645.
- 531 **Fraker PJ, Gershwin ME, Good RA, Prasad A**: Interrelationships between zinc and immune function. *Fed Proc* 1986; **45**(5): 1474–1479.
- 532 **Kruse-Jarres JD**: The significance of zinc for humoral and cellular immunity. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1989; **3**(1): 1–8.
- 533 **Feiler LS, Smolin G, Okumoto M, Condon D**: Herpetic keratitis in zinc-deficient rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; **22**(6): 788–795.
- 534 **Kidd MT, Qureshi MA, Ferket PR, Thomas LN**: Dietary zinc-methionine enhances mononuclear-phagocytic function in young turkeys. Zinc-methionine, immunity, and Salmonella. *Biol Trace Elem Res* 1994; **42**(3): 217–229.
- 535 **McMurray DN, Bartow RA, Mintzer CL, Hernandez-Frontera E**: Micronutrient status and immune function in tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990; **587**: 59–69.
- 536 **Tasçi S, Sengil AZ, Altindis M, Arisoy K**: The effect of zinc supplementation in experimentally induced *Toxoplasma gondii* infection. *J Egypt Soc Parasitol* 1995; **25**(3): 745–751.
- 537 **Fenwick PK, Aggett PJ, Macdonald D, Huber C, Wakelin D**: Zinc deficiency and zinc repletion: effect on the response of rats to infection with *Trichinella spiralis*. *Am J Clin Nutr* 1990; **52**(1): 166–172.
- 538 **Fernandes G, Nair M, Onoe K, Tanaka T, Floyd R, Good RA**: Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**(1): 457–461.
- 539 **Allen JI, Perri RT, McClain CJ, Kay NE**: Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J Lab Clin Med* 1983; **102**(4): 577–589.

- 540 **Singh A, Failla ML, Deuster PA:** Exercise-induced changes in immune function: effects of zinc supplementation. *J Appl Physiol* 1994; **76**(6): 2298–2303.
- 541 **Liu MK, Herrera-Velit P, Brownsey RW, Reiner NE:** CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; **153**(6): 2642–2652.
- 542 **Beaty CD, Franklin TL, Uehara Y, Wilson CB:** Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol* 1994; **24**(6): 1278–1284.
- 543 **Herrera-Velit P, Reiner NE:** Bacterial lipopolysaccharide induces the association and coordinate activation of p53/56lyn and phosphatidylinositol 3-kinase in human monocytes. *J Immunol* 1996; **156**(3): 1157–1165.
- 544 **Martin MU, Wesche H:** Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1592**(3): 265–280.
- 545 **Zabel U, Schreck R, Baeuerle PA:** DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn<sup>2+</sup> dependence, and differential half-site recognition. *J Biol Chem* 1991; **266**(1): 252–260.
- 546 **Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC:** Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 1995; **373**(6512): 311–317.
- 547 **Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G:** Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 1998; **391**(6665): 410–413.
- 548 **Haase H, Ober-Blöbaum JL, Engelhardt G, Hebel S, Heit A, Heine H, Rink L:** Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J Immunol* 2008; **181**(9): 6491–6502.
- 549 **Haase H, Rink L:** Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr* 2009; **29**: 133–152.
- 550 **Shembade N, Ma A, Harhaj EW:** Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 2010; **327**(5969): 1135–1139.
- 551 **Campbell J, Ciesielski CJ, Hunt AE, Horwood NJ, Beech JT, Hayes LA, Denys A, Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM:** A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2004; **173**(11): 6928–6937.
- 552 **Driessen C, Hirv K, Rink L, Kirchner H:** Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 1994; **13**(1): 15–20.
- 553 **Wellinghausen N, Driessen C, Rink L:** Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations. *Cytokine* 1996; **8**(10): 767–771.
- 554 **Bao B, Prasad AS, Beck FWJ, Godmere M:** Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**(5): E1095–1102.
- 555 **Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ:** Abrogation of nuclear factor-kappaB activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and liver injury. *Am J Pathol* 2004; **164**(5): 1547–1556.
- 556 **Sherman AR:** Zinc, copper, and iron nutrition and immunity. *J Nutr* 1992; **122**(3 Suppl): 604–609.
- 557 **Ripa S, Ripa R:** Zinc and immune function. *Minerva Med* 1995; **86**: 315–318.
- 558 **Prasad AS:** Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem* 1998; **188**: 63–69.
- 559 **Prasad AS, Bao B, Beck FW, Sarkar FH:** Zinc activates NF-kappaB in HUT-78 cells. *J Lab Clin Med* 2001; **138**(4): 250–256.
- 560 **Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Sarkar FH:** Zinc enhances the expression of interleukin-2 and interleukin-2 receptors in HUT-78 cells by way of NF-kappaB activation. *J Lab Clin Med* 2002; **140**(4): 272–289.
- 561 **Prasad AS, Meftah S, Abdallah J, Kaplan J, Brewer GJ, Bach JF, Dardenne M:** Serum thymulin in human zinc deficiency. *J Clin Invest* 1988; **82**(4): 1202–1210.
- 562 **Beck FW, Prasad AS, Kaplan J, Fitzgerald JT, Brewer GJ:** Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. *Am J Physiol* 1997; **272**(6 Pt 1): E1002–1007.
- 563 **Prasad AS:** Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol* 2008; **43**(5): 370–377.



- 564 **Reich H:** Acrodermatitis enteropathica--Erbliche Parakeratose der Kälber: Beitrag zur Vergleichenden Dermatologie. *Z Hautkr* 1983; **58**: 1410–1415.
- 565 **Suliman HB, Abdelrahim AI, Zakia AM, Shommein AM:** Zinc deficiency in sheep: field cases. *Trop Anim Health Prod* 1988; **20**(1): 47–51.
- 566 **Beilage E, Kienzle E, Müller E:** Symptomatik und Verlauf eines Parakeratose-Ausbruchs in einem Eberaufzuchtbetrieb. *Tierarztl Prax* 1992; **20**: 265–269.
- 567 **Cope CM, Mackenzie AM, Wilde D, Sinclair LA:** Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J Dairy Sci* 2009; **92**(5): 2128–2135.
- 568 **Hahn JD, Baker DH:** Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J Anim Sci* 1993; **71**(11): 3020–3024.
- 569 **Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ:** Zinc: health effects and research priorities for the 1990s. *Environ Health Perspect* 1994; **102 Suppl 2**: 5–46.
- 570 **Tavassoli Hojati S, Alaghemand H, Hamze F, Ahmadian Babaki F, Rajab-Nia R, Rezvani MB, Kaviani M, Atai M:** Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dental Materials* 2013; **29**(5): 495–505.
- 571 **Crane JK, Naeher TM, Shulgina I, Zhu C, Boedeker EC:** Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 2007; **75**(12): 5974–5984.
- 572 **Crane JK, Byrd IW, Boedeker EC:** Virulence inhibition by zinc in shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2011; **79**(4): 1696–1705.
- 573 **McDowell LR:** Minerals in animal and human nutrition. 2. Aufl. Amsterdam: Elsevier; 2003.
- 574 **Suttle N:** Mineral nutrition of livestock. Wallingford: CABI; 2010.
- 575 **Carlson MS, Hill GM, Link JE:** Early- and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: effect on metallothionein and mineral concentrations. *J Anim Sci* 1999; **77**(5): 1199–1207.
- 576 **Jensen-Waern M, Melin L, Lindberg R, Johannisson A, Petersson L, Wallgren P:** Dietary zinc oxide in weaned pigs--effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Res Vet Sci* 1998; **64**(3): 225–231.
- 577 **Carlson D, Sehested J, Poulsen HD:** Zinc reduces the electrophysiological responses in vitro to basolateral receptor mediated secretagogues in piglet small intestinal epithelium. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006; **144**(4): 514–519.
- 578 **Van Campen DR:** Copper interference with the intestinal absorption of zinc-65 by rats. *J Nutr* 1969; **97**(1): 104–108.
- 579 **Sandström B, Davidsson L, Cederblad A, Lönnnerdal B:** Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *J Nutr* 1985; **115**(3): 411–414.
- 580 **Cox DH, Hale OM:** Liver iron depletion without copper loss in swine fed excess zinc. *J Nutr* 1962; **77**(3): 225–228.
- 581 **Lin D, Xing B:** Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2008; **42**(15): 5580–5585.
- 582 **Kim B, McBride MB:** Phytotoxic effects of Cu and Zn on soybeans grown in field-aged soils: their additive and interactive actions. *J Environ Qual* 2009; **38**(6): 2253–2259.
- 583 **Popoff MY, Bockemühl J, Brenner FW:** Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 2000; **151**(1): 63–65.
- 584 **LeMinor L, Popoff MY:** Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*: request for an opinion. *Int J Syst Bacteriol* 1987; **37**(4): 465–468.
- 585 **Popoff MY, Bockemühl J, McWhorter-Murlin A:** Supplement 1991 (no. 35) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* 1992; **143**(8): 807–811.
- 586 **Grimont PAD, Weill F-X:** Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 9th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.; 2007.
- 587 **Rolle M, Mayer A, Hrsg:** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus anderen Fachgebieten. 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1993.
- 588 **Schmidt U:** Kontrolle von Lebensmittelvergiftungen bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen. *Kulmbacher Reihe* 1990: 44–67.
- 589 **Lehmacher A, Bockemühl J, Aleksic S:** Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips. *Epidemiol Infect* 1995; **115**(3): 501–511.

- 590 **Robert Koch-Institut:** Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007. Berlin; 2008.
- 591 **Tschäpe H., Bockemühl J:** Lebensmittelübertragene Salmonellose in Deutschland. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz, Springer-Verlag 2002; **45:** 491–496.
- 592 **Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies:** The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. Clin Infect Dis 2010; **50(6):** 882–889.
- 593 **Harris JC, Dupont HL, Hornick RB:** Fecal leukocytes in diarrheal illness. Ann Intern Med 1972; **76(5):** 697–703.
- 594 **Fabrega A, Vila J:** Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol Rev 2013; **26(2):** 308–341.
- 595 **Ohl ME, Miller SI:** Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. Annu Rev Med 2001; **52:** 259–274.
- 596 **D'Souza MB, Nagarkatti PS, Rao KM:** Serological evidence for the presence of antibodies to Salmonella typhi among slaughtered pigs, goats and sheep. J Trop Med Hyg 1978; **81(8):** 142–145.
- 597 **Ruby T, McLaughlin L, Gopinath S, Monack D:** Salmonella's long-term relationship with its host. FEMS Microbiol Rev 2012; **36(3):** 600–615.
- 598 **Garcia-del Portillo F, Foster JW, Finlay BB:** Role of acid tolerance response genes in Salmonella typhimurium virulence. Infect Immun 1993; **61(10):** 4489–4492.
- 599 **Rychlik I, Barrow PA:** Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiol Rev 2005; **29(5):** 1021–1040.
- 600 **Allam US, Krishna MG, Sen M, Thomas R, Lahiri A, Gnanadhas DP, Chakravorty D:** Acidic pH induced STM1485 gene is essential for intracellular replication of Salmonella. Virulence 2012; **3(2):** 122–135.
- 601 **Foster JW:** Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. J Bacteriol 1991; **173(21):** 6896–6902.
- 602 **Foster JW, Hall HK:** Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. J Bacteriol 1991; **173(16):** 5129–5135.
- 603 **Foster JW:** The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. J Bacteriol 1993; **175(7):** 1981–1987.
- 604 **Carter PB, Collins FM:** The route of enteric infection in normal mice. J Exp Med 1974; **139(5):** 1189–1203.
- 605 **Que JU, Hentges DJ:** Effect of streptomycin administration on colonization resistance to Salmonella typhimurium in mice. Infect Immun 1985; **48(1):** 169–174.
- 606 **Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Bäumlner AJ:** Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. Nature 2010; **467(7314):** 426–429.
- 607 **Glynn JR, Palmer SR:** Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a Salmonella outbreak. Am J Epidemiol 1992; **136(11):** 1369–1377.
- 608 **Abe K, Saito N, Kasuga F, Yamamoto S:** Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses. J Food Prot 2004; **67(12):** 2735–2740.
- 609 **Michetti P, Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ, Neutra MR:** Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen Salmonella typhimurium. Infect Immun 1992; **60(5):** 1786–1792.
- 610 **Selsted ME, Miller SI, Henschen AH, Ouellette AJ:** Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. J Cell Biol 1992; **118(4):** 929–936.
- 611 **Haraga A, Ohlson MB, Miller SI:** Salmonellae interplay with host cells. Nat Rev Microbiol 2008; **6(1):** 53–66.
- 612 **Wagner C, Hensel M:** Adhesive mechanisms of Salmonella enterica. Adv Exp Med Biol 2011; **715:** 17–34.
- 613 **Collazo CM, Galán JE:** The invasion-associated type-III protein secretion system in Salmonella—a review. Gene 1997; **192(1):** 51–59.
- 614 **Waterman SR, Holden DW:** Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system. Cell Microbiol 2003; **5(8):** 501–511.

- 615 **Srikanth CV, Mercado-Lubo R, Hallstrom K, McCormick BA:** Salmonella effector proteins and host-cell responses. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**(22): 3687–3697.
- 616 **Agbor TA, McCormick BA:** Salmonella effectors: important players modulating host cell function during infection. *Cell Microbiol* 2011; **13**(12): 1858–1869.
- 617 **Broz P, Ohlson MB, Monack DM:** Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* 2012; **3**(2): 62–70.
- 618 **Jones BD, Ghorri N, Falkow S:** Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994; **180**(1): 15–23.
- 619 **Neutra MR, Kraehenbuhl JP:** Transepithelial transport and mucosal defence I: the role of M cells. *Trends Cell Biol* 1992; **2**(5): 134–138.
- 620 **Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI:** Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* 1998; **280**(5363): 602–605.
- 621 **Hansen-Wester I, Hensel M:** Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001; **3**(7): 549–559.
- 622 **Fu Y, Galán JE:** The Salmonella typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998; **27**(2): 359–368.
- 623 **Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Bäumlér AJ:** SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 2005; **73**(1): 146–154.
- 624 **McGhie EJ, Brawn LC, Hume PJ, Humphreys D, Koronakis V:** Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 2009; **12**(1): 117–124.
- 625 **Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC:** Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999; **401**(6755): 804–808.
- 626 **Jepson MA, Collares-Buzato CB, Clark MA, Hirst BH, Simmons NL:** Rapid disruption of epithelial barrier function by Salmonella typhimurium is associated with structural modification of intercellular junctions. *Infect Immun* 1995; **63**(1): 356–359.
- 627 **Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Méresse S, Lopez A, Finlay BB:** The invasion-associated type III secretion system of Salmonella enterica serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; **4**(1): 43–54.
- 628 **Smith AC, Cirulis JT, Casanova JE, Scidmore MA, Brumell JH:** Interaction of the Salmonella-containing vacuole with the endocytic recycling system. *J Biol Chem* 2005; **280**(26): 24634–24641.
- 629 **Steele-Mortimer O:** The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11**(1): 38–45.
- 630 **Steele-Mortimer O, Méresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB:** Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1999; **1**(1): 33–49.
- 631 **Rathman M, Sjaastad MD, Falkow S:** Acidification of phagosomes containing Salmonella typhimurium in murine macrophages. *Infect Immun* 1996; **64**(7): 2765–2773.
- 632 **Alpuche Aranda CM, Swanson JA, Loomis WP, Miller SI:** Salmonella typhimurium activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(21): 10079–10083.
- 633 **Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S:** Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell* 2006; **17**(1): 498–510.
- 634 **Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ:** A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls Salmonella typhimurium virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**(13): 5054–5058.
- 635 **Nickerson CA, Curtiss R:** Role of sigma factor RpoS in initial stages of Salmonella typhimurium infection. *Infect Immun* 1997; **65**(5): 1814–1823.
- 636 **Lee AK, Detweiler CS, Falkow S:** OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in Salmonella pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 2000; **182**(3): 771–781.
- 637 **Gunn JS, Ryan SS, van Velkinburgh JC, Ernst RK, Miller SI:** Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infect Immun* 2000; **68**(11): 6139–6146.

- 638 **Kato A, Groisman EA**: The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* 2008; **631**: 7–21.
- 639 **Véscovi EG, Ayala YM, Di Cera E, Groisman EA**: Characterization of the bacterial sensor protein PhoQ. Evidence for distinct binding sites for Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 1997; **272**(3): 1440–1443.
- 640 **Salcedo SP, Holden DW**: SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* 2003; **22**(19): 5003–5014.
- 641 **Deiwick J, Salcedo SP, Boucrot E, Gilliland SM, Henry T, Petermann N, Waterman SR, Gorvel JP, Holden DW, Méresse S**: The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* 2006; **74**(12): 6965–6972.
- 642 **Guy RL, Gonias LA, Stein MA**: Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the *fms-aroE* intragenic region. *Mol Microbiol* 2000; **37**(6): 1417–1435.
- 643 **Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, Vazquez-Torres A, Gleeson C, Fang FC, Holden DW**: Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 1998; **30**(1): 163–174.
- 644 **García-del Portillo F, Zwick MB, Leung KY, Finlay BB**: *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; **90**(22): 10544–10548.
- 645 **Drecktrah D, Levine-Wilkinson S, Dam T, Winfree S, Knodler LA, Schroer TA, Steele-Mortimer O**: Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* 2008; **9**(12): 2117–2129.
- 646 **Beuzón CR, Méresse S, Unsworth KE, Ruíz-Albert J, Garvis S, Waterman SR, Ryder TA, Boucrot E, Holden DW**: *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 2000; **19**(13): 3235–3249.
- 647 **Filloux A, Hachani A, Bleves S**: The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 2008; **154**(Pt 6): 1570–1583.
- 648 **Gal-Mor O, Gibson DL, Baluta D, Vallance BA, Finlay BB**: A novel secretion pathway of *Salmonella enterica* acts as an antivirulence modulator during salmonellosis. *PLoS Pathog* 2008; **4**(4): e1000036.
- 649 **Storz G, Imlay JA**: Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 1999; **2**(2): 188–194.
- 650 **Prehna G, Li Y, Stoynov N, Okon M, Vuckovic M, McIntosh LP, Foster LJ, Finlay BB, Strynadka NC**: The zinc regulated antivirulence pathway of *Salmonella* is a multiprotein immunoglobulin adhesion system. *J Biol Chem* 2012; **287**(39): 32324–32337.
- 651 **Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB**: Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 1997; **186**(4): 569–580.
- 652 **Chen LM, Kaniga K, Galán JE**: *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 1996; **21**(5): 1101–1115.
- 653 **Monack DM, Hersh D, Ghorri N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S**: *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J Exp Med* 2000; **192**(2): 249–258.
- 654 **Watson PR, Gautier AV, Paulin SM, Bland AP, Jones PW, Wallis TS**: *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect Immun* 2000; **68**(6): 3744–3747.
- 655 **Brennan MA, Cookson BT**: *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* 2000; **38**(1): 31–40.
- 656 **Van der Velden AW, Lindgren SW, Worley MJ, Heffron F**: *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect Immun* 2000; **68**(10): 5702–5709.
- 657 **Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI**: *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 1994; **179**(2): 601–608.
- 658 **McCormick BA, Miller SI, Carnes D, Madara JL**: Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect Immun* 1995; **63**(6): 2302–2309.

- 659 **Waldron KJ, Robinson NJ**: How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**(1): 25–35.
- 660 **Collins HL**: Withholding iron as a cellular defence mechanism--friend or foe? *Eur J Immunol* 2008; **38**(7): 1803–1806.
- 661 **Wessling-Resnick M**: Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr* 2010; **30**: 105–122.
- 662 **Nairz M, Fritsche G, Crouch MV, Barton HC, Fang FC, Weiss G**: Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cell Microbiol* 2009; **11**(9): 1365–1381.
- 663 **Cellier M, Govoni G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P**: Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* 1994; **180**(5): 1741–1752.
- 664 **Cellier M, Shustik C, Dalton W, Rich E, Hu J, Malo D, Schurr E, Gros P**: Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leukoc Biol* 1997; **61**(1): 96–105.
- 665 **Forbes JR, Gros P**: Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 2001; **9**(8): 397–403.
- 666 **Crouch MV, Castor M, Karlinsey JE, Kalhorn T, Fang FC**: Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2008; **67**(5): 971–983.
- 667 **Müller SI, Valdebenito M, Hantke K**: Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. *Biomaterials* 2009; **22**(4): 691–695.
- 668 **Osman D, Cavet JS**: Metal sensing in *Salmonella*: implications for pathogenesis. *Adv Microb Physiol* 2011; **58**: 175–232.
- 669 **Coleman JE**: Zinc enzymes. *Curr Opin Chem Biol* 1998; **2**(2): 222–234.
- 670 **Nies DH**: Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; **51**(6): 730–750.
- 671 **Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A**: High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 2007; **75**(12): 5867–5876.
- 672 **Campoy S, Jara M, Busquets N, Pérez De Rozas AM, Badiola I, Barbé J**: Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *Infect Immun* 2002; **70**(8): 4721–4725.
- 673 **Pasquali P, Ammendola S, Pistoia C, Petrucci P, Tarantino M, Valente C, Marenzoni ML, Rotilio G, Battistoni A**: Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter confers immune-based protection against challenge infections in mice. *Vaccine* 2008; **26**(27–28): 3421–3426.
- 674 **Patzer SI, Hantke K**: The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1998; **28**(6): 1199–1210.
- 675 **Petrarca P, Ammendola S, Pasquali P, Battistoni A**: The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J Bacteriol* 2010; **192**(6): 1553–1564.
- 676 **Rensing C, Ghosh M, Rosen BP**: Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 1999; **181**(19): 5891–5897.
- 677 **Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA**: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; **388**(6641): 482–488.
- 678 **Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME**: The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* 2000; **36**(5): 1085–1100.
- 679 **Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de León FA, Skamene E, Gros P, Malo D**: Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. *Mamm Genome* 1995; **6**(11): 809–815.
- 680 **Rodrigues V, Cheah PY, Ray K, Chia W**: malvolio, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO J* 1995; **14**(13): 3007–3020.
- 681 **Cellier M, Belouchi A, Gros P**: Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet* 1996; **12**(6): 201–204.

- 682 **Belouchi A, Kwan T, Gros P:** Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Mol Biol* 1997; **33**(6): 1085–1092.
- 683 **Liu XF, Culotta VC:** Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. *J Biol Chem* 1999; **274**(8): 4863–4868.
- 684 **Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF:** Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* 2000; **35**(5): 1065–1078.
- 685 **Cellier M, Privé G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P:** Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(22): 10089–10093.
- 686 **Kishi F, Yoshida T, Aiso S:** Location of NRAMP1 molecule on the plasma membrane and its association with microtubules. *Mol Immunol* 1996; **33**(16): 1241–1246.
- 687 **Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P:** Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* 1997; **185**(4): 717–730.
- 688 **Gros P, Skamene E, Forget A:** Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Immunol* 1983; **131**(4): 1966–1972.
- 689 **Hu J, Bumstead N, Barrow P, Sebastiani G, Olien L, Morgan K, Malo D:** Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. *Genome Res* 1997; **7**(7): 693–704.
- 690 **Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell JM:** Nramp1 transfection transfers lty/lsh/bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immun* 1997; **65**(2): 380–386.
- 691 **Chapes SK, Mosier DA, Wright AD, Hart ML:** MHCII, Tlr4 and Nramp1 genes control host pulmonary resistance against the opportunistic bacterium *Pasteurella pneumotropica*. *J Leukoc. Biol* 2001; **69**(3): 381–386.
- 692 **Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P:** Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* 2000; **192**(9): 1237–1248.
- 693 **Govoni G, Gros P:** Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm. Res.* 1998; **47**(7): 277–284.
- 694 **Nelson N:** Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* 1999; **18**(16): 4361–4371.
- 695 **Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P:** Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 1995; **25**(2): 514–525.
- 696 **Andrews NC:** Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 2000; **1**(3): 208–217.
- 697 **Bartsevich VV, Pakrasi HB:** Manganese transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 1996; **271**(42): 26057–26061.
- 698 **Patzer SI, Hantke K:** Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**(16): 4806–4813.
- 699 **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME:** Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mntH transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe(2+), and Mn(2+). *J Bacteriol* 2002; **184**(12): 3151–3158.
- 700 **Turner JS, Morby AP, Whitton BA, Gupta A, Robinson NJ:** Construction of Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J Biol Chem* 1993; **268**(6): 4494–4498.
- 701 **Daniels MJ, Turner-Cavet JS, Selkirk R, Sun H, Parkinson JA, Sadler PJ, Robinson NJ:** Coordination of Zn<sup>2+</sup> (and Cd<sup>2+</sup>) by prokaryotic metallothionein. Involvement of his-imidazole. *J Biol Chem* 1998; **273**(36): 22957–22961.
- 702 **Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ:** Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol Microbiol* 2002; **45**(5): 1421–1432.
- 703 **Sears ME:** Chelation: harnessing and enhancing heavy metal detoxification—a review. *The Scientific World Journal* 2013; **2013**: 1–13.
- 704 **Nies DH:** Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* 2000; **4**(2): 77–82.

- 705 **Nies DH, Silver S:** Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* 1995; **14**(2): 186–199.
- 706 **Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernández J, Hughes MN, Poole RK:** Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* 1997; **25**(5): 883–891.
- 707 **Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr:** The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; **1**(1): 107–125.
- 708 **Hantke K:** Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* 2001; **14**: 239–249.
- 709 **Grass G, Fan B, Rosen BP, Franke S, Nies DH, Rensing C:** ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; **183**(15): 4664–4667.
- 710 **Noll M, Petrukhin K, Lutsenko S:** Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1998; **273**(33): 21393–21401.
- 711 **Appia-Ayme C, Hall A, Patrick E, Rajadurai S, Clarke TA, Rowley G:** ZraP is a periplasmic molecular chaperone and a repressor of the zinc-responsive two-component regulator ZraSR. *Biochem J* 2012; **442**(1): 85–93.
- 712 **Leonhartsberger S, Huber A, Lottspeich F, Böck A:** The *hydH/G* Genes from *Escherichia coli* code for a zinc and lead responsive two-component regulatory system. *J Mol Biol* 2001; **307**(1): 93–105.
- 713 **Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ, Trujillo JM:** Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 1976; **36**(2 Pt 1): 467–475.
- 714 **Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K:** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; **26**(2): 171–176.
- 715 **Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH:** Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 2006; **125**(3): 293–305.
- 716 **Veldhuizen EJA, Koomen I, Ultee T, van Dijk A, Haagsman HP:** Salmonella serovar specific upregulation of porcine defensins 1 and 2 in a jejunal epithelial cell line. *Vet Microbiol* 2009; **136**(1–2): 69–75.
- 717 **Mariani V, Palermo S, Fiorentini S, Lanubile A, Giuffra E:** Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; **131**(3–4): 278–284.
- 718 **Arce C, Ramírez-Boo M, Lucena C, Garrido JJ:** Innate immune activation of swine intestinal epithelial cell lines (IPEC-J2 and IPI-2I) in response to LPS from *Salmonella typhimurium*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; **33**(2): 161–174.
- 719 **Brosnahan AJ, Brown DR:** Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Vet Microbiol* 2012; **156**(3–4): 229–237.
- 720 **Weingartl HM, Sabara M, Pasick J, van Moorlehem E, Babiuk L:** Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: partial characterization and virus susceptibility. *J Virol Methods* 2002; **104**(2): 203–216.
- 721 **Volf J, Boyen F, Faldyna M, Pavlova B, Navratilova J, Rychlik I:** Cytokine response of porcine cell lines to *Salmonella enterica* serovar typhimurium and its *hilA* and *ssrA* mutants. *Zoonoses Public Health* 2007; **54**(8): 286–293.
- 722 **Datsenko KA, Wanner BL:** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(12): 6640–6645.
- 723 **Cherepanov PP, Wackernagel W:** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995; **158**(1): 9–14.
- 724 **Schmieger H:** Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* 1972; **119**(1): 75–88.
- 725 **Collado-Romero M, Arce C, Ramírez-Boo M, Carvajal A, Garrido JJ:** Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella typhimurium* infection along the porcine intestinal gut. *Vet Res* 2010; **41**(2): 23.

- 726 **Kim K, Kim D, Kim S, Jung EM, Kang JH, Jeung EB, Yang MP**: Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$  production by lipopolysaccharide-stimulated porcine peripheral blood mononuclear cells through induction of interleukin-10. *Cytokine* 2011; **56**(2): 224–230.
- 727 **Koshika T, Phelps C, Fang J, Lee SE, Fujita M, Ayares D, Cooper DK, Hara H**: Relative efficiency of porcine and human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in inhibiting human CD4+ T-cell responses co-stimulated by porcine and human B7 molecules. *Immunology* 2011; **134**(4): 386–397.
- 728 **Käser T, Müllebnner A, Hartl RT, Essler SE, Saalmüller A, Duvigneau JC**: Porcine T-helper and regulatory T cells exhibit versatile mRNA expression capabilities for cytokines and co-stimulatory molecules. *Cytokine* 2012; **60**(2): 400–409.
- 729 **Männer K, Spieler A**: Probiotics in piglets - an alternative to traditional growth promoters. *Microecol Therapy* 1997; **26**: 243–256.
- 730 **Benyacoub J, Pérez PF, Rochat F, Saudan KY, Reuteler G, Antille N, Humen M, De Antoni GL, Cavadini C, Blum S, Schiffrin EJ**: Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to Giardia intestinalis in mice. *J Nutr* 2005; **135**(5): 1171–1176.
- 731 **Arduino RC, Jacques-Palaz K, Murray BE, Rakita RM**: Resistance of Enterococcus faecium to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infect Immun* 1994; **62**(12): 5587–5594.
- 732 **Arduino RC, Murray BE, Rakita RM**: Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun* 1994; **62**(3): 987–993.
- 733 **Kreuzer S, Machnowska P, ABmus J, Sieber M, Pieper R, Schmidt MF, Brockmann GA, Scharek-Tedin L, Johne R**: Feeding of the probiotic bacterium Enterococcus faecium NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Vet Res* 2012; **43**(1): 58.
- 734 **Smith CJ, Osborn AM**: Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; **67**(1): 6–20.
- 735 **Giglio S, Monis PT, Saint CP**: Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**(22): 136e.
- 736 **Livak KJ, Schmittgen TD**: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402–408.
- 737 **R Development Core Team**: R: A Language and Environment for Statistical Computing 2012.
- 738 **Mafamane H, Szabó I, Schmidt MF, Filter M, Walk N, Tedin K, Scharek-Tedin L**: Studies on the effect of an Enterococcus faecium probiotic on T cell populations in peripheral blood and intestinal epithelium and on the susceptibility to Salmonella during a challenge infection with Salmonella Typhimurium in piglets. *Arch Anim Nutr* 2011; **65**(6): 415–430.
- 739 **Thomas JJ, Petrich de Marquesini LG, Ravanan R, Smith RM, Guerder S, Flavell RA, Wraith DC, Wen L, Wong FS**: CD86 has sustained costimulatory effects on CD8 T cells. *J Immunol* 2007; **179**(9): 5936–5946.
- 740 **Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S**: Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* 2011; **32**(9): 428–433.
- 741 **Nygaard A, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M**: Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 2007; **8**: 67.
- 742 **Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M**: Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 2005; **306**(1–2): 16–27.
- 743 **McCulloch RS, Ashwell MS, O’Nan AT, Mente PL**: Identification of stable normalization genes for quantitative real-time PCR in porcine articular cartilage. *J Anim Sci Biotechnol* 2012; **3**(1): 36.
- 744 **Siepert B, Reinhardt N, Kreuzer S, Bondzio A, Twardziok S, Brockmann G, Nöckler K, Szabó I, Janczyk P, Pieper R, Tedin K**: Enterococcus faecium NCIMB 10415 supplementation affects intestinal immune-associated gene expression in post-weaning piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; **157**(1–2): 65–77.
- 745 **Jørgensen PF, Wang JE, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Solberg R, Aasen AO**: Peptidoglycan and lipoteichoic acid modify monocyte phenotype in human whole blood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; **8**(3): 515–521.
- 746 **Wang JE, Jørgensen PF, Ellingsen EA, Almiöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R**: Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 2001; **16**(3): 178–182.
- 747 **Wray GM, Foster SJ, Hinds CJ, Thiemermann C**: A cell wall component from pathogenic and non-pathogenic gram-positive bacteria (peptidoglycan) synergises with endotoxin to cause the



- release of tumour necrosis factor-alpha, nitric oxide production, shock, and multiple organ injury/dysfunction in the rat. *Shock* 2001; **15**(2): 135–142.
- 748 **Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H:** Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* 2001; **69**(4): 2045–2053.
- 749 **Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM:** Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19**(2): 259–268.
- 750 **Huycke MM, Abrams V, Moore DR:** Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002; **23**(3): 529–536.
- 751 **Moy TI, Mylonakis E, Calderwood SB, Ausubel FM:** Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by Enterococcus faecium. *Infect Immun* 2004; **72**(8): 4512–4520.
- 752 **Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM:** Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J* 1996; **315** (Pt 1): 21–24.
- 753 **Gu Y, Sarnecki C, Aldape RA, Livingston DJ, Su MS:** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J Biol Chem* 1995; **270**(32): 18715–18718.
- 754 **Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC:** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**(6495): 346–347.
- 755 **Lee DH, Goldberg AL:** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; **8**(10): 397–403.
- 756 **Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J:** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 2004; **53**(1): 28–52.
- 757 **Garcia-Alvarez L, Dawson S, Cookson B, Hawkey P:** Working across the veterinary and human health sectors. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67** Suppl 1: i37–49.
- 758 **Tokumaru M, Konuma H, Umehiko M, Konno S, Shinagawa K:** Rates of detection of Salmonella and Campylobacter in meats in response to the sample size and the infection level of each species. *Int J Food Microbiol* 1991; **13**(1): 41–46.
- 759 **European Food Safety Authority:** The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012; **10**: 2597 [442 pp.].
- 760 **Steinbach G, Hartung M:** Attempt to estimate the share of human Salmonella infections, which are attributable to Salmonella originating from swine. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1999; **112**(8): 296–300.
- 761 **Kopp-Hoolihan L:** Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 2001; **101**(2): 229–241.
- 762 **Haas W, Gilmore MS:** Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of Enterococcus faecalis. *Med Microbiol Immunol* 1999; **187**(4): 183–190.
- 763 **Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC:** An HlyB-type function is required for expression of the Enterococcus faecalis hemolysin/bacteriocin. *Infect Immun* 1990; **58**(12): 3914–3923.
- 764 **Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB:** Genetic structure of the Enterococcus faecalis plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994; **176**(23): 7335–7344.
- 765 **Cotter PD, Hill C, Ross RP:** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**(10): 777–788.
- 766 **Nes IF, Diep DB, Holo H:** Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. *J Bacteriol* 2007; **189**(4): 1189–1198.
- 767 **Park SH, Itoh K, Fujisawa T:** Characteristics and identification of enterocins produced by Enterococcus faecium JCM 5804T. *J Appl Microbiol* 2003; **95**(2): 294–300.
- 768 **Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Håvarstein LS, Holo H, Hernández PE, Nes IF:** Biochemical and genetic evidence that Enterococcus faecium L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J Bacteriol* 2000; **182**(23): 6806–6814.
- 769 **Su P, Henriksson A, Mitchell H:** Survival and retention of the probiotic Lactobacillus casei LAFTI L26 in the gastrointestinal tract of the mouse. *Lett Appl Microbiol* 2007; **44**(2): 120–125.

- 770 **Su P, Henriksson A, Mitchell H:** Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an in vivo murine model. *J Appl Microbiol* 2007; **103**(6): 2392–2400.
- 771 **Khan H, Flint S, Yu P:** Enterocins in food preservation. *Int J Food Microbiol* 2010; **141**(1–2): 1–10.
- 772 **Himeno K, Fujita K, Zendo T, Wilaipun P, Ishibashi N, Masuda Y, Yoneyama F, Leelawatcharamas V, Nakayama J, Sonomoto K:** Identification of enterocin NKR-5-3C, a novel class IIa bacteriocin produced by a multiple bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; **76**(6): 1245–1247.
- 773 **Barefoot SF, Klaenhammer TR:** Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1983; **45**(6): 1808–1815.
- 774 **Cotter PD, Ross RP, Hill C:** Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 2013; **11**(2): 95–105.
- 775 **Ramakrishnan V, Narayan B, Halami PM:** Combined effect of enterocin and lipase from *Enterococcus faecium* NCIM5363 against food borne pathogens: mode of action studies. *Curr Microbiol* 2012; **65**(2): 162–169.
- 776 **Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A:** Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 2011; **151**(2): 125–140.
- 777 **Scharek L, Guth J, Filter M, Schmidt MF:** Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. *Arch Anim Nutr* 2007; **61**(4): 223–234.
- 778 **Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, Jaung MS, Blaser BW, Sun J, Benson DM Jr, Mao H, Yokohama A, Bhatt D, Shen L, Davuluri R, Weinstein M, Marcucci G, Caligiuri MA:** Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* 2006; **24**(5): 575–590.
- 779 **Wan YY, Flavell RA:** TGF-beta and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol* 2008; **28**(6): 647–659.
- 780 **Sanjabi S, Mosaheb MM, Flavell RA:** Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity* 2009; **31**(1): 131–144.
- 781 **Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA:** Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 2009; **9**(4): 447–453.
- 782 **Rincon M:** Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol* 2012; **33**(11): 571–577.
- 783 **Sydora BC, MacFarlane SM, Lupicki M, Dmytrash AL, Dieleman LA, Fedorak RN:** An imbalance in mucosal cytokine profile causes transient intestinal inflammation following an animal's first exposure to faecal bacteria and antigens. *Clin Exp Immunol* 2010; **161**(1): 187–196.
- 784 **Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ:** Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009; **325**(5940): 612–616.
- 785 **Schwartz RH:** T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 305–334.
- 786 **Lang M, Schneider A, Krüger C, Schmid R, Dziarski R, Schwaninger M:** Peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S) is upregulated by NF-kappaB. *Neurosci Lett* 2008; **430**(2): 138–141.
- 787 **El Bekay R, Alvarez M, Monteseirín J, Alba G, Chacón P, Vega A, Martín-Nieto J, Jiménez J, Pintado E, Bedoya FJ, Sobrino F:** Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* 2003; **102**(2): 662–671.
- 788 **Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G:** Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; **278**(8): 5509–5512.
- 789 **Tanabe T, Chamailard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Nuñez G:** Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; **23**(7): 1587–1597.

- 790 **Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL:** Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; **277**(44): 41701–41705.
- 791 **Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G:** Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001; **276**(4): 2551–2554.
- 792 **Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S:** TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; **124**(4): 1001–1009.
- 793 **Takahashi Y, Isuzugawa K, Murase Y, Imai M, Yamamoto S, Iizuka M, Akira S, Bahr GM, Momotani E, Hori M, Ozaki H, Imakawa K:** Up-regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF-alpha in LPS-treated murine macrophages. *J Vet Med Sci* 2006; **68**(5): 471–478.
- 794 **Tabeta K, Yamazaki K, Akashi S, Miyake K, Kumada H, Umemoto T, Yoshie H:** Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 2000; **68**(6): 3731–3735.
- 795 **Laflamme N, Rivest S:** Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* 2001; **15**(1): 155–163.
- 796 **Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D:** The I kappa B-NF-kappa B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 2002; **298**(5596): 1241–1245.
- 797 **Nelson DE, Ihekweba AEC, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR:** Oscillations in NF-kappa B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004; **306**(5696): 704–708.
- 798 **Neurath MF, Fuss I, Schürmann G, Pettersson S, Arnold K, Müller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Büschenfelde KH:** Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **859**: 149–159.
- 799 **Van Den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP:** Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach. *J Immunol* 2000; **164**(6): 3353–3359.
- 800 **Lee W, Lim S, Son H, Bae KS:** Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 2004; **30**(4): 209–212.
- 801 **Shon W, Kim H, Son H, Lim S, Lee W:** Effects of sonicated *Enterococcus faecalis* extracts on interleukin-2 and interleukin-4 production by human T cells. *J Endod* 2004; **30**(10): 701–703.
- 802 **Kunsch C, Rosen CA:** NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* 1993; **13**(10): 6137–6146.
- 803 **Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S:** Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; **5**(1): 104–112.
- 804 **Huycke MM, Moore DR:** In vivo production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(6): 818–826.
- 805 **Korzeniewski C, Callewaert DM:** An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983; **64**(3): 313–320.
- 806 **Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K:** Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappa B induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996; **134**(1): 13–23.
- 807 **Sun SC, Ganchi PA, Béraud C, Ballard DW, Greene WC:** Autoregulation of the NF-kappa B transactivator RelA (p65) by multiple cytoplasmic inhibitors containing ankyrin motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(4): 1346–1350.
- 808 **Beg AA, Baltimore D:** An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; **274**(5288): 782–784.
- 809 **Yang P, McKay BS, Allen JB, Jaffe GJ:** Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**(7): 2438–2446.
- 810 **Garcia-Nogales P, Almeida A, Fernandez E, Medina JM, Bolaños JP:** Induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase by lipopolysaccharide contributes to preventing nitric oxide-mediated glutathione depletion in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1999; **72**(4): 1750–1758.

- 811 **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H:** Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; **133**(4): 1710–1715.
- 812 **Gerdes J:** Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; **1**(3): 199–206.
- 813 **King LS:** VITAL STAINING OF THE CONNECTIVE TISSUES. *J Exp Med* 1938; **68**(1): 63–72.
- 814 **Stoddart MJ:** Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol* 2011; **740**: 1–6.
- 815 **Niederberger E, Geisslinger G:** The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB J* 2008; **22**(10): 3432–3442.
- 816 **Weston CR, Davis RJ:** The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**(1): 14–21.
- 817 **Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A:** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; **31**(3): 293–310.
- 818 **Criado R, Diep DB, Aakra A, Gutiérrez J, Nes IF, Hernández PE, Cintas LM:** Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pClZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**(10): 6653–6666.
- 819 **Chen Y, Yu C, Ji S, Liou MS, Leong KH, Pan SF, Wu HC, Lin YH, Yu B, Yanagida F:** Enterocin T, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. 812. *Arch Microbiol* 2013; **195**(9): 655–660.
- 820 **Sang Y, Blecha F:** Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions. *Dev Comp Immunol* 2009; **33**(3): 334–343.
- 821 **Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM:** Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 2010; **135**(1): 1–11.
- 822 **Steinstraesser L, Kraneburg U, Jacobsen F, Al-Benna S:** Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology* 2011; **216**(3): 322–333.
- 823 **Gaczynska M, Osmulski PA, Gao Y, Post MJ, Simons M:** Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry* 2003; **42**(29): 8663–8670.
- 824 **Lee YJ, Choi HJ, Kang TW, Kim HO, Chung MJ, Park YM:** CBT-SL5, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, suppresses the expression of interleukin-8 induced by *Propionibacterium acnes* in cultured human keratinocytes. *J Microbiol Biotechnol* 2008; **18**(7): 1308–1316.
- 825 **Saito H, Watanabe T:** Effect of a bacteriocin produced by *Mycobacterium smegmatis* on growth of cultured tumor and normal cells. *Cancer Res* 1979; **39**(12): 5114–5117.
- 826 **Saito H, Watanabe T:** Effects of a bacteriocin from *Mycobacterium smegmatis* on BALB/3T3 and simian virus 40-transformed BALB/c mouse cells. *Microbiol Immunol* 1981; **25**(1): 13–22.
- 827 **Takeda K, Akira S:** TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; **16**(1): 3–9.
- 828 **Lu Y, Yeh W, Ohashi PS:** LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; **42**(2): 145–151.
- 829 **Kehl-Fie TE, Skaar EP:** Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 2010; **14**(2): 218–224.
- 830 **Gabbianelli R, Scotti R, Ammendola S, Petrarca P, Nicolini L, Battistoni A:** Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol* 2011; **11**: 36.
- 831 **Liu JZ, Jellbauer S, Poe AJ, Ton V, Pesciaroli M, Kehl-Fie TE, Restrepo NA, Hosking MP, Edwards RA, Battistoni A, Pasquali P, Lane TE, Chazin WJ, Vogl T, Roth J, Skaar EP, Raffatellu M:** Zinc sequestration by the neutrophil protein calprotectin enhances *Salmonella* growth in the inflamed gut. *Cell Host Microbe* 2012; **11**(3): 227–239.
- 832 **Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP:** Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 2008; **319**(5865): 962–965.
- 833 **Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro KA, Chazin WJ, Skaar EP:** Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 2011; **10**(2): 158–164.

- 834 **Patzer SI, Hantke K:** The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2000; **275**(32): 24321–24332.
- 835 **Janssen R, van der Straaten T, van Diepen A, van Dissel JT:** Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* 2003; **5**(6): 527–534.
- 836 **Ammendola S, Pasquali P, Pacello F, Rotilio G, Castor M, Libby SJ, Figueroa-Bossi N, Bossi L, Fang FC, Battistoni A:** Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of *Salmonella enterica* and their significance for virulence. *J Biol Chem* 2008; **283**(20): 13688–13699.
- 837 **Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F:** *Salmonella typhimurium* disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(47): 17915–17920.
- 838 **Surjawidjaja JE, Hidayat A, Lesmana M:** Growth inhibition of enteric pathogens by zinc sulfate: an in vitro study. *Med Princ Pract* 2004; **13**(5): 286–289.
- 839 **Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X:** Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**(7): 2325–2331.
- 840 **Connell P, Young VM, Toborek M, Cohen DA, Barve S, McClain CJ, Hennig B:** Zinc attenuates tumor necrosis factor-mediated activation of transcription factors in endothelial cells. *J Am Coll Nutr* 1997; **16**(5): 411–417.
- 841 **Heyninck K, Beyaert R:** The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF- $\kappa$ B activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* 1999; **442**(2–3): 147–150.
- 842 **Wellinghausen N, Rink L:** The significance of zinc for leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 1998; **64**(5): 571–577.
- 843 **Jäättelä M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L:** A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J Immunol* 1996; **156**(3): 1166–1173.
- 844 **Brodsky IE, Monack D:** NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens. *Semin Immunol* 2009; **21**(4): 199–207.
- 845 **Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G:** Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; **227**(1): 106–128.
- 846 **Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE:** Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**(6): 465–479.
- 847 **Chen G, Shaw MH, Kim Y, Nuñez G:** NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; **4**: 365–398.
- 848 **Park J, Kim Y, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, Inohara N, Nuñez G:** RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 2007; **178**(4): 2380–2386.
- 849 **Magalhaes JG, Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Travassos LH, Selvanantham T, Girardin SE, Gommerman JL, Philpott DJ:** Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol* 2008; **181**(11): 7925–7935.
- 850 **Magalhaes JG, Rubino SJ, Travassos LH, Le Bourhis L, Duan W, Sellge G, Geddes K, Reardon C, Lechmann M, Carneiro LA, Selvanantham T, Fritz JH, Taylor BC, Artis D, Mak TW, Comeau MR, Croft M, Girardin SE, Philpott DJ:** Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(36): 14896–14901.
- 851 **Lee MS, Kim Y:** Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 447–480.
- 852 **Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S, Fujimoto Y, Kawasaki A, Foster SJ, Horie Y, Mak TW, Nuñez G, Chinnaiyan AM, Fukase K, Inohara N:** Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med* 2006; **203**(1): 203–213.
- 853 **Wolfert MA, Murray TF, Boons G, Moore JN:** The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem* 2002; **277**(42): 39179–39186.
- 854 **Ma P, Wang Z, Pflugfelder SC, Li DQ:** Toll-like receptors mediate induction of peptidoglycan recognition proteins in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2010; **90**(1): 130–136.
- 855 **Janczyk P, Kreuzer S, Assmus J, Nöckler K, Brockmann GA:** No protective effects of high-dosage dietary zinc oxide on weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol* 2013; **79**(9): 2914–2921.

- 856 **Berkow RL, Wang D, Larrick JW, Dodson RW, Howard TH**: Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; **139**(11): 3783–3791.
- 857 **Ozaki Y, Ohashi T, Kume S**: Potentiation of neutrophil function by recombinant DNA-produced interleukin 1a. *J Leukoc Biol* 1987; **42**(6): 621–627.
- 858 **McCord JM, Fridovich I**: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; **244**(22): 6049–6055.

## 7. Weitere Verzeichnisse

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

<b>AAS</b>	Atom-Absorptions-Spektroskopie
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
AGP	antibiotic growth promotor
AK	Antikörper
APC	antigen-presenting cell
ARD	Ankyrin repeat-Domäne
AS	Aggregationssubstanz
ASP	Säure-Schock Protein (engl.: acid shock protein)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATR	acid tolerance response
A20	TNFAIP3, Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3
<b><i>B. breve</i></b>	<i>Bifidobacterium breve</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bidest	doppelt destilliert (Reinstwasser)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BMP	bone morphogenetic protein
BMDC	bone-marrow-derived dendritic cell
bp	Basenpaare
bez.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	caspase-activating and recruitment domain
CCL20	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 20
CD	cluster of differentiation
CDF	cation diffusion faciliator
cDNA	complementary DNA oder copy DNA (äquivalent cRNA)
cfu	colony-forming units
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CR	complement receptor
Ct	cycle threshold
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
CTP	Cytidintriphosphat
<b>D</b>	Deutschland
d	Tag (engl. day)
Da	Dalton
DAMP	damage-associated molecular pattern

DC	dendritische Zellen
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
Dif	Dorsal-related immunity factor
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double-stranded DNA (äquivalent dsRNA)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DT	definitive type
<b>E</b>	Extinktion
EBD	Effektor-bindende Domäne
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	ethyleneglycoltetraacetic acid
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EHPM	European Federation of Health Product Manufacturers
engl.	englisch
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
etc.	<i>et cetera</i>
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
EU	Europäische Union
<b>FAE</b>	Follikel-assoziiertes Epithel
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC	fold change
FDC	follikular dendritische Zellen
FKS	Fetales Kälberserum
flp	flippase
FRT	flp recognition sites
FU Berlin	Freie Universität Berlin
FUR	ferric uptake regulator
<b>GALT</b>	gut-associated lymphoid tissue
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GF-AFC	glycyl-phenylalanyl-aminofluorcoumarin
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere
ggfs.	gegebenenfalls



GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycophosphatidylinositol
GRO	growth-related oncogene
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
<b>His</b>	Histidin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPBLs	humane periphere Blutlymphozyten
HPLC	high-performance liquid chromatography
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<b>IBS</b>	irritable bowel syndrome
iE-DAP	$\gamma$ -D-Glu-mDAP
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IF	impact factor
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IMD	immune deficiency
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IpaF	ICE protease activating factor
IPEC-J2	intestinal porcine epithelial cell - jejunum 2
IRAK	IL-1 receptor - associated kinase
IRF	IFN regulatory factor
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminale Kinase
<b>KbE</b>	Kolonie-bildende Einheiten (engl. cfu)
KG	Körpergewicht
Km	Kanamycin
$K_m$	Michaeliskonstante
<b>LAB</b>	lactic acid bacteria
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LB	lysogeny broth, Luria-Bertani broth, luria broth
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
Igps	lysosomal glycoproteins
<i>L. lactis</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPL	lamina propria lymphocytes
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPS	Lipopolysaccharid
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG

LRR	leucine-rich repeat
LSD	least significance difference
LTA	Lipoteichonsäure
<b>M</b>	Molarität
MALT	mucosa-associated lymphoid tissues
MAPK	mitogen-activated protein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MD2	myeloid differentiation factor 2
mDAP	meso-Diaminopimelinsäure
MDP	Muramyl-dipeptide (N-Acetylmuramyl-L-Alanin-D-Isoglutamin)
MDR	multi drug resistant
MHC	major histocompatibility complex
Min.	Minuten
MIP	macrophage inflammatory protein
mLN	mesenteriale Lymphknoten
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mntH	manganese transporter H <sup>+</sup> -dependent
MOI	multiplicity of infection
MRE	metal responsive element
mRNA	messenger RNA
MT	Metallothionein
MTF-1	Metal Transcription Factor 1
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
M-Tri-DAP	MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-mDAP
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
M-Zellen	microfold cells
<b>N</b>	Anzahl (physikalische Größe)
NADH	Nicotinamidadeninucleotid
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NBD	nucleotide-binding domain
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCIMB	National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
NCSU	North Carolina State University
NEMO	NF-κB essential modulator
NES	nucleus-export signal
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NIK	NF-κB inducing kinase
NK	natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like receptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
Nr.	Nummer
Nramp-1	natural resistance-associated macrophage protein 1
NRC	National Research Council

<b>OD</b>	optische Dichte
<b>p-Wert</b>	Signifikanzwert (engl. probability value)
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterasen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGN	Peptidoglykan
PGRP	peptidoglycan recognition protein
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PHA	Phytohämagglutinin
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phosphatidylcholin-2-acylhydrase (kurz: Phospholipase A2)
PMA	Phorbol-myristat-acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
<i>p. p.</i>	<i>post partum</i>
PP	Peyer'sche Plaques, auch Polypropylen
ppm	parts per million, der millionste Teil, 10 <sup>-6</sup>
PRR	pathogen recognition receptor
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Reverse Transkription - PCR
<b>Rac1</b>	rat sarcoma (Ras)-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
RDS	Reizdarmsyndrom (engl.: IBS, inflammatory bowel syndrome)
RES	Retikuloendotheliales System
RHD	Rel-homologe Domäne
RICK	receptor-interacting serine/threonine kinase
RIP1	receptor-interacting protein 1
RKI	Robert Koch-Institut
RLU	relative light units
RNA	ribonucleic acid
RND	Resistance-nodulation-cell division
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
rpoS	RNA polymerase sigma factor
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription oder Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkription – PCR
<b>S.</b>	<i>Salmonella</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	<i>Salmonella</i> -containing vacuole
SCS	spent culture supernatant

<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serovar Enteritidis (beispielhaft für alle Serovare)
Sif	<i>Salmonella</i> -induced filament
Sip	<i>Salmonella</i> invasion protein
siRNA	small interfering (auch silencing) RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
SOD	Superoxid-Dismutase
Sop	Salmonella outer protein
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitätsinsel
<i>S. scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
Sse	secretion system effector
ssp.	Subspezies
ssRNA	single-stranded RNA (äquivalent ssDNA)
Std.	Stunden
STEC	Shiga-Toxin produzierenden <i>E. coli</i>
Str	Streptomycin
Stx	Shiga-Toxin
SWC9	Swine Workshop Cluster 9
<b>T3SS</b>	Typ-3-Sekretionssystem (äquivalent auch T4SS)
Tab.	Tabelle
TAK1	TGF- $\beta$ -aktivierte Kinase 1
TBE	Pufferlösung (Tris/Borat/EDTA)
TCR	T-cell receptor
TCT	Tracheal cytotoxin
TF	Transferrin
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
TGV	Transmissible Gastroenteritis Virus
TIEG	Transforming Growth Factor Beta Inducible Early Growth Response
TIR	Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLR	toll-like receptor
TM	Trockenmasse
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TPS	two partner secretion
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAF6	TNF-receptor associated receptor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
<b>u.a.</b>	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
<b>var.</b>	Variante
V-ATPase	Vacuolar-ATPase
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

vgl.	vergleiche
<b>WHO</b>	World Health Organization
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
<b>YopJ</b>	<i>Yersinia</i> outer protein J
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
Zip	ZRT, IRT like protein
ZirS	zinc regulated secreted
ZirT	zinc regulated transporter
ZnT	zinc transporter
Znu	Zn <sup>2+</sup> -specific uptake system
ZraP	zinc resistance-associated protein
z. T.	zum Teil
Zur	Zn <sup>2+</sup> uptake regulator

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Funktionen der Säugetier-PGLYRPs (modifiziert nach [104]).	27
<b>Abbildung 2:</b>	Zielgene von NF- $\kappa$ B (modifiziert nach [244]).	30
<b>Abbildung 3:</b>	Einfluss von CTLA4 auf die Aktivierung von T-Zellen (modifiziert nach [265]).	34
<b>Abbildung 4:</b>	Wechselwirkungen zwischen probiotischem Mikroorganismus, Darmflora und Immunsystem (modifiziert nach DGE-Ernährungsbericht 2004 [365]).	44
<b>Abbildung 5:</b>	Übersicht über den Versuchsaufbau des <i>Enterococcus faecium</i> SF68- Fütterungsversuches.	88
<b>Abbildung 6:</b>	Versuchsaufbau für einen Bakterienlysativversuch mit Behandlung der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden.	102
<b>Abbildung 7:</b>	Versuchsaufbau für einen Bakterienlysativversuch mit Behandlung der Zellen über 48, 24 und 4 Stunden und nachfolgender Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344.	103
<b>Abbildung 8:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von Interleukin-8 in unterschiedlichen Geweben.	112
<b>Abbildung 9:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von Interleukin-10 in unterschiedlichen Geweben.	113
<b>Abbildung 10:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von CTLA4 in unterschiedlichen Geweben.	114
<b>Abbildung 11:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von CD86 in unterschiedlichen Geweben.	115
<b>Abbildung 12:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-1 in unterschiedlichen Geweben.	117
<b>Abbildung 13:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-2A in unterschiedlichen Geweben.	118
<b>Abbildung 14:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-2B in unterschiedlichen Geweben.	120
<b>Abbildung 15:</b>	<i>E. faecium</i> SF68-Fütterungsversuch. Genexpression von Nod1 und Nod2 in unterschiedlichen Geweben.	122
<b>Abbildung 16:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von Interleukin-8 in unterschiedlichen Geweben.	124
<b>Abbildung 17:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von Interleukin-10 in unterschiedlichen Geweben.	125
<b>Abbildung 18:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von CTLA4 in unterschiedlichen Geweben.	126
<b>Abbildung 19:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von CD86 in unterschiedlichen Geweben.	127
<b>Abbildung 20:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von PGLYRP-1 und PGLYRP-2A in unterschiedlichen Geweben.	128
<b>Abbildung 21:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von PGLYRP-2B in unterschiedlichen Geweben.	129
<b>Abbildung 22:</b>	<i>Salmonella</i> challenge <i>E. faecium</i> SF68-Versuch. Genexpression von Nod1 und Nod2 in unterschiedlichen Geweben.	130
<b>Abbildung 23:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Infektion mit intakten, lebenden <i>E. faecium</i> SF68 bzw. <i>S. Typhimurium</i> SL1344.	132
<b>Abbildung 24:</b>	Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz von <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68 in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2.	134
<b>Abbildung 25:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit intakten, lebenden <i>E. faecium</i> SF68.	135

<b>Abbildung 26:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen (IPEC-J2, Abb. A) und humanen (LoVo, Abb. C) intestinalen Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung mit intakten, durch Gentamycin abgetöteten <i>E. faecium</i> SF68.....	136
<b>Abbildung 27:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen (IPEC-J2, Abb. A) und humanen (LoVo, Abb. C) intestinalen Epithelzellen und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit intakten, durch Gentamycin abgetöteten <i>E. faecium</i> SF68.....	138
<b>Abbildung 28:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden. .	141
<b>Abbildung 29:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.....	142
<b>Abbildung 30:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in humanen Epithelzellen (LoVo) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden. .	144
<b>Abbildung 31:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in humanen Makrophagen-ähnlichen Zellen (THP-1) als Antwort auf Behandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden. ....	145
<b>Abbildung 32:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> TX0016-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.....	147
<b>Abbildung 33:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A, C) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25904, ATCC 25923 und ATCC 29213 (Abb. C) über 4, 24 und 48 Stunden.....	149
<b>Abbildung 34:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. coli</i> Nissle 1917 und <i>E. coli</i> K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden.....	150
<b>Abbildung 35:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 und <i>E. coli</i> K-12 MG1655 über 4, 24 und 48 Stunden alleine und gemeinsam mit anschließender Infektion durch <i>S. Typhimurium</i> SL1344. ....	153
<b>Abbildung 36:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließender Behandlung mit LPS ( <i>Salmonella</i> -LPS: Abb. A; <i>E. coli</i> -LPS: Abb. B). ....	155
<b>Abbildung 37:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und anschließender Behandlung mit porzinem TNF- $\alpha$ ..	157
<b>Abbildung 38:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden und parallelem Zusatz von Aminosäuren.....	158
<b>Abbildung 39:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine	

	Infektion mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne Vorbehandlung der Zellen mit jedem Tag frischem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.....	160
<b>Abbildung 40:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit zellfreiem, hitzeinaktiviertem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden.....	162
<b>Abbildung 41:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit Proteinase K-behandeltem Lysat von <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden. ....	164
<b>Abbildung 42:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit intakten, Gentamycin-abgetöteten, Proteinase K-behandelten <i>E. faecium</i> SF68 über 4, 24 und 48 Stunden. ....	165
<b>Abbildung 43:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit Lysozym-behandeltem <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden.....	166
<b>Abbildung 44:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31) als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden und Zugabe von Katalase (Abb. A und C) bzw. dem Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (Abb. B und D). ....	168
<b>Abbildung 45:</b>	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 als Antwort auf eine Behandlung der Zellen mit <i>E. faecium</i> SF68-Lysat über 4, 24 und 48 Stunden und Zugabe von MG-132, einem Inhibitor der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. ....	169
<b>Abbildung 46:</b>	Zytotoxizitätstests zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte des zellfreien Lysates von <i>E. faecium</i> SF68 in porzinen (IPEC-J2, Abb. A) und humanen (LoVo, Abb. C) intestinalen Epithelzellen sowie Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B). ....	171
<b>Abbildung 47:</b>	Zytotoxizitätstests zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte des zellfreien Lysates von <i>E. faecium</i> SF68 und MG-132 in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2).....	172
<b>Abbildung 48:</b>	Zellviabilitätstests zur Untersuchung möglicher Effekte des zellfreien Lysates von <i>E. faecium</i> SF68 auf die Zellviabilität in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B).....	173
<b>Abbildung 49:</b>	Zellvitalitätstests zur Untersuchung möglicher Effekte des zellfreien Lysates von <i>E. faecium</i> SF68 auf die metabolische Aktivität der porzinen (IPEC-J2, Abb. A) und humanen (LoVo, Abb. C) intestinalen Epithelzellen und der Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B).....	175
<b>Abbildung 50:</b>	Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta znuA$ , $\Delta znuB$ und $\Delta znuBC$ im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2. ....	177
<b>Abbildung 51:</b>	Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta znuA$ , $\Delta znuB$ und $\Delta znuBC$ im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	178
<b>Abbildung 52:</b>	Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta mntH$ , $\Delta zraP$ und $\Delta zur$ im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2. ....	179
<b>Abbildung 53:</b>	Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta mntH$ , $\Delta zraP$ und $\Delta zur$ im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	180



<b>Abbildung 54:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>mntH</i> , $\Delta$ <i>zraP</i> und $\Delta$ <i>zur</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie PLN/C2. ....	182
<b>Abbildung 55:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirS</i> , $\Delta$ <i>zirT</i> und $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2. ....	183
<b>Abbildung 56:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirS</i> , $\Delta$ <i>zirT</i> und $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	184
<b>Abbildung 57:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz des <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 bei Zinkbehandlung in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	187
<b>Abbildung 58:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz des <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 bei Zinkbehandlung zwei Stunden vor bzw. direkt vor und während der Infektion in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	191
<b>Abbildung 59:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2. ....	194
<b>Abbildung 60:</b> Invasionseffizienz und intrazelluläre Persistenz der <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich mit <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31. ....	195
<b>Abbildung 61:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den porzinen intestinalen Epithelzellen IPEC-J2 als Reaktion auf eine Behandlung mit dem <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich zum Wildtyp-Stamm <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion. ....	196
<b>Abbildung 62:</b> Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der porzinen Makrophagen-ähnlichen Zelllinie 3D4/31 als Reaktion auf eine Behandlung mit dem <i>Salmonella</i> -Mutanten $\Delta$ <i>zirTS</i> im Vergleich zum Wildtyp-Stamm <i>S. Typhimurium</i> SL1344 mit und ohne zweistündiger Zinkbehandlung zwei Stunden vor der Infektion. ....	197
<b>Abbildung 63:</b> Zytotoxizitätstests zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte von Zinksulfat und Zinkchlorid in porzinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2, Abb. A) und Makrophagen-ähnlichen Zellen (3D4/31, Abb. B). ....	199
<b>Abbildung 64:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von Interleukin-8 in unterschiedlichen Geweben. ....	201
<b>Abbildung 65:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von IL-10 in unterschiedlichen Geweben.: ....	203
<b>Abbildung 66:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von CD86 in unterschiedlichen Geweben. ....	204
<b>Abbildung 67:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-1 und PGLYRP-2A in unterschiedlichen Geweben. ....	206
<b>Abbildung 68:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von PGLYRP-2B in unterschiedlichen Geweben. ....	208
<b>Abbildung 69:</b> Zinkoxid-Fütterungsversuch. Genexpression von Nod1 und Nod2 in unterschiedlichen Geweben. ....	209
<b>Abbildung 70:</b> <i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch. Genexpression von Interleukin-8 in unterschiedlichen Geweben. ....	212
<b>Abbildung 71:</b> <i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch. Genexpression von PGLYRP-1 und PGLYRP-2A in unterschiedlichen Geweben. ....	213
<b>Abbildung 72:</b> <i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch. Genexpression von PGLYRP-2B unterschiedlichen Geweben. ....	214

<b>Abbildung 73:</b> <i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch. Genexpression von Nod1 in unterschiedlichen Geweben. ....	216
<b>Abbildung 74:</b> <i>Salmonella</i> challenge Zinkoxid-Versuch. Genexpression von Nod2 in unterschiedlichen Geweben. ....	217
<b>Abbildung 75:</b> Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit untersuchten immunrelevanten Molekülen.....	229
<b>Abbildung 76:</b> Untersuchung der Zellproliferation mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67. ....	244
<b>Abbildung 77:</b> Zusammenhang zwischen dem TLR4-Signaling und Zink. ....	263

### 7.3. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Beschreibung der humanen TLRs, Lokalisation, wichtige Liganden sowie Transkriptionsfaktor-Aktivierung und induzierte Zytokine (modifiziert nach [128]).	18
<b>Tabelle 2:</b>	Expressionsorte und Funktionen humaner und porciner PGLYRPs	23
<b>Tabelle 3:</b>	Überblick ausgewählter NF- $\kappa$ B-Aktivatoren.	28
<b>Tabelle 4:</b>	Beispiele für probiotische Mikroorganismen und der tierspezifische Einsatz bei landwirtschaftlichen Nutztieren (+) = gelegentlich; + = mäßig häufig; ++ = häufig.	40
<b>Tabelle 5:</b>	Hauptanwendungsgebiete von probiotischen Mikroorganismen in der Schweinemast (modifiziert nach [363]).	42
<b>Tabelle 6:</b>	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten <i>Salmonella</i> -Mutantenstämme, Beschreibung des mutierten Gens und dessen Funktion.	73
<b>Tabelle 7:</b>	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.	76
<b>Tabelle 8:</b>	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten <i>Salmonella</i> -Stämme.	77
<b>Tabelle 9:</b>	Übersicht über die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.	78
<b>Tabelle 10:</b>	Plasmide, die für die Mutagenese nach Wanner und Datsenko verwendet wurden.	79
<b>Tabelle 11:</b>	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.	79
<b>Tabelle 12:</b>	Primer, die zur Herstellung und Überprüfung der <i>Salmonella</i> -Mutanten im Rahmen der Mutagenese nach Wanner & Datsenko verwendet wurden.	80
<b>Tabelle 13:</b>	Antragsnummern der in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche.	86
<b>Tabelle 14:</b>	Übersicht über die für die verschiedenen Assays verwendeten MOIs.	95
<b>Tabelle 15:</b>	Für die Bakterienlysatversuche eingesetzte MOIs.	99
<b>Tabelle 16:</b>	Pipettierschema cDNA-Synthese.	106
<b>Tabelle 17:</b>	Pipettierschema für die quantitative Real-time PCR.	107
<b>Tabelle 18:</b>	Relative intrazelluläre Wachstumsrate (Vervielfachung) von $\Delta$ <i>zirTS</i> und <i>S. Typhimurium</i> SL1344 über 20 Stunden ohne Zinkbehandlung bzw. mit Zinkbehandlung vor und nach der Infektion (1 mM ZnSO <sub>4</sub> ) in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen.	188
<b>Tabelle 19:</b>	Relative intrazelluläre Wachstumsrate (Vervielfachung) von $\Delta$ <i>zirTS</i> und <i>S. Typhimurium</i> SL1344 über 20 Stunden ohne und mit Zinkbehandlung (1 mM ZnSO <sub>4</sub> ) vor und direkt vor/während der <i>Salmonella</i> -Infektion in den Makrophagen-ähnlichen 3D4/31 Zellen.	190
<b>Tabelle 20:</b>	Lizenznummern für die in dieser Dissertation aus Veröffentlichungen verwendeten Abbildungen.	323

## 8. Lizenznummern

Für die in dieser Dissertation aus Veröffentlichungen entnommenen Abbildungen wurden Lizenzen beantragt und erteilt. Die Lizenznummern der verschiedenen Abbildungen sind in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20: Lizenznummern für die in dieser Dissertation aus Veröffentlichungen verwendeten Abbildungen.**

Abbildung	Titel des Artikels	Journal	Jahr der Veröffentlichung	Lizenznummer
Abbildung 1 S. 27	Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences	Nature Reviews Microbiology	2007	3199371312006
Abbildung 3 S. 34	T-cell regulation by CD28 and CTLA-4	Nature Reviews Immunology	2001	3199371449909
Abbildung 77 S. 263	Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells	Annual review of nutrition	2009	3221290996775

## 9. Analyse auf Plagiarismus

Ergebnisse der Plagiarismus Analyse mittels <https://www.plagscan.com/> vom 23.11.2013, 20:33 Uhr. Es wurde das gesamte Dokument überprüft.

981 Treffer von 100 Quellen, von denen 100 Onlinequellen sind. *PlagLevel: 2,9 %*

**Alle Treffer wurden wegen Ähnlichkeiten geprüft, scheinen aber ausreichend unterschiedlich zu sein.**

## 10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Lothar H. Wieler dafür bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, die Erstbetreuung meiner Dissertation zu übernehmen und es mir so ermöglichte, die Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen im Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Bereitschaft zur Übernahme der gutachterlichen Tätigkeit dieser Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Karsten Tedin für die Bereitstellung des Themas, die stete und engagierte Betreuung sowie seinen wissenschaftlichen Rat.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft in allen wissenschaftlichen und technischen Fragen möchte ich der gesamten AG IZM sowie den weiteren Arbeitsgruppen am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen danken. Im Besonderen danke ich Katharina Straßl für ihre tolle Unterstützung vor allem in der letzten Phase meiner Laborarbeiten.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium der Biochemie ermöglicht haben und mir im Verlauf meiner Dissertation immer motivierend, aufmunternd oder auch einfach nur zuhörend zur Seite standen.

Meinem Verlobten Christopher möchte ich für die tolle Unterstützung während der Bearbeitung meiner Dissertation danken.