Aus dem Forschungszentrum Borstel Leibnitz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Programmbereich Infektionen

Die Rolle der lysosomalen Phospholipase A₂ in der Wirtsantwort gegen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und *Streptococcus pneumoniae*

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von Steffi Renk aus Hamburg

Lübeck 2014

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Ulrich Schaible

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.10.2014

"In uns selbst liegen die Sterne unseres Glücks."

Heinrich Heine

Inhaltsverzeichnis

A	AbkürzungsverzeichnisVI			
1	Einl	Einleitung1		
	1.1	Pat	hogene Bakterien; Das Leben innerhalb oder außerhalb von Zellen	1
	1.1.1		Streptococcus pneumoniae	1
	1.1.1		1 Mausmodelle akuter Pneumokokken-Infektionen	4
	1.1	.2	Salmonella enterica serovar Typhimurium	5
	1	1.2.	1 Mausmodelle der Salmonellen-Infektion	6
	1.2	Imr	nunabwehr gegen extrazelluläre und intrazelluläre mikrobielle Pathogene	8
	1.2	.1	Immunantwort gegen S. pneumoniae	. 10
	1.2	.2	Immunantwort gegen S. Tm	. 12
1.3 Makrophagen und Phagozytose		krophagen und Phagozytose	. 14	
1.4 Phospholipasen		ospholipasen	. 17	
	1.4	.1	Lysosomale Phospholipase A ₂	. 18
	1.5	Zie	lsetzung	. 21
2	Ma	teria	l und Methoden	. 23
2.1 Material		terial	. 23	
	2.1	.1	Chemikalien	. 23
	2.1	.2	Medien und Platten	. 24
	2.1	.3	Lösungen und Puffer	. 25
	2.1	.4	Kits	. 25
	2.1	.5	Verbrauchsmaterial	. 25
	2.1	.6	Geräte	. 26
	2.1	.7	Software	. 27
	2.1	.8	Bakterienstämme	. 27

2.1.9	Ma	usstämme	27
2.2 N	/lethoo	den	28
2.2.1	Mik	krobiologisches Arbeiten	28
2.2.	.1.1	Kultivierung von Salmonella enterica serovar Typhimurium	28
2.2.	.1.2	Kultivierung von Streptococcus pneumoniae	28
2.2.2	Zell	lbiologische Arbeiten	28
2.2.	.2.1	Herstellung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	28
2.2.	.2.2	Gewinnung von Peritonealmakrophagen	29
2.2.	.2.3	Überleben von S. pneumoniae in Makrophagen	29
2.2.	.2.4	Vermehrung von S. Tm in Makrophagen	30
2.2.3	Tier	rexperimentelles Arbeiten	30
2.2.	.3.1	Streptococcus pneumoniae induziertes Pneumonie Modell	30
2	.2.3.1.	.1 Intranasale Infektion	30
2	.2.3.1.	.2 Visualisierung der Bakterienlast im IVIS [®] Spectrum Imaging System	31
2	.2.3.1.	.3 Organentnahme im Pneumonie-Modell	31
2.2.	.3.2	Salmonella induziertes Typhus- und Colitis-Modell	32
2	.2.3.2.	.1 Orale Infektion	32
2	.2.3.2.	.2 Organentnahme bei Salmonellen-Infektion	32
2.2.3.2		.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Gastrointestinaltrakt von Mäusen	: 33
2	.2.3.2.	.4 Analyse des Mikrobioms in Kotproben von C57B/6J und LPLA2 ^{-/-} Tierer	n 33
2.2.4	Imn	nunologische Analysen	33
2.2.	.4.1	Phänotypisierung der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie	33
2.2.	.4.2	Zytokinquantifizierung mittels BD™ cytometric bead array	35
2.2.	.4.3	Myeloperoxidase (MPO) ELISA	35
2.2.5	Hist	topathologische und immunchemische Analysen	35

2.2	.5.1	Gewebefixierung und Paraffinschnitte
2.2	.5.2	Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung
2.2	.5.3	Pathologische Bewertung des Darms
2.2	.5.4	Histologische Immunfluoreszenz-Färbung
2.2	.5.5	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen
2.2.6	Мо	lekularbiologische Analysen
2.2	.6.1	RNA-Isolierung aus Gewebe
2.2	.6.2	Reverse Transkription
2.2	.6.3	Quantitative Real-Time-PCR mittels LightCycler
2.2.7	Sta	tistische Analysen 40
3 Ergeb	onisse .	
3.1 I	Die Rol	le der LPLA ₂ in der Pneumokokken-Infektion41
3.1.1	LPL	A ₂ -defiziente Peritonealmakrophagen in der Pneumokokken-Infektion 41
3.1.2	Kei Pne	n Einfluss von LPLA ₂ -Defizienz auf die <i>S. pneumoniae</i> -induzierte
3.2 [Die Beo	deutung der LPLA ₂ in der Salmonellen-Infektion
3.2.1	Typ und	husmodell: Der Verlauf der Infektion mit <i>S.</i> Tm ist vergleichbar in LPLA2 ^{-/} I C57BL/6J Mäusen
3.2.2	Der Col	Einfluss der LPLA ₂ auf den Infektionsverlauf in der <i>S</i> . Tm-induzierten itis
3.2	.2.1	Erhöhte Keimlast in LPLA ₂ defizienten Mäusen im Colitis-Modell
3.2	.2.2	S. Tm löst eine geringere Entzündung im Caecum von LPLA ₂ - ^{/-}
3.2	.2.3	Verändertes Chemokin- und Zytokinprofil in LPLA ₂ -/- Mäusen nach <i>S.</i> Tm-induzierter Colitis
3.2	2.4	Zelluläre Zusammensetzung des infizierten und entzündeten
3	3.2.2.4	.1 Lymphoide Zellen im Caecum von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen61

3.	2.2.4.	2 Myeloide Zellen im Caecum von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen6	52
3.2.3	LPL/ Mik	A ₂ ^{-/-} Mäuse besitzen eine veränderte Zusammensetzung des6 robioms im Darm6	 66
3.2.4	Einf Infe	luss der LPLA ₂ auf die Funktion von Makrophagen in der <i>in vitro</i>	 '1
3.2.4	4.1	Verändertes Wachstum von <i>S</i> . Tm Δ <i>aroA</i> in LPLA ₂ -defizienten	 '1
3.2.4	4.2	LPLA ₂ ^{-/-} Makrophagen produzieren weniger KC nach Infektion mit <i>S.</i> Tm 	 '2
3.2.4	4.3	Die Chemo-/Zytokinproduktion in LPLA $_2^{-/-}$ PM Φ ist nicht durch rekombinante LPLA $_2$ rekonstituierbar	 '4
4 Diskuss	sion	7	'5
4.1 Di Pr	ie Abv neumo	vesenheit funktioneller LPLA ₂ beeinflusst die akute okokken-induzierte Pneumonie nicht7	 '6
4.2 Di Co	ie LPL olitis,	A ₂ nimmt Einfluss auf den Verlauf einer Salmonellen-induzierten nicht aber auf die systemische Salmonellen-Infektion	 '7
4.2.1	Ein vermehrtes Wachstum der Salmonellen in KO Mäusen korreliert mit einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen im Caecum		
4.2.2	Der in S	Einfluss des geringeren Anteils an DZs und NK-Zellen und ihrer Zytokine Galmonellen infizierten LPLA2-KO Mäusen8	 80
4.2.3	Die	Bedeutung von IL-17 in LPLA ₂ -KO Mäusen8	;1
4.2.4	Der im	mögliche Beitrag des Mikrobioms zu der erhöhten IL-17 Produktion Caecum von LPLA ₂ -KO Tieren8	 35
4.3 Au in	uswirl der S	kung der fehlenden LPLA ₂ auf die Effektorfunktionen von Makrophagen almonellen-Infektion	 6
4.4 Fa m	azit: D ukosa	er Verlust der funktionellen LPLA ₂ hat Auswirkungen auf die ale Immunantwort im Darm gegen <i>S.</i> Tm9	 10
4.5 Au	usblic	k9	1
5 Zusam	menfa	assung9	13
Literaturver	zeich	nis9)4
Abbildungsv	/erzei	chnis12	2

Tabellenverzeichnis	
Anhang	
Lebenslauf	
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

ACS	1-O-Acylceramidsynthase
A. dest	Aqua destillata
АМР	antimikrobielles Peptid
АМФ	Alveolarmakrophage
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ASM	Acid-Sphingomyelinase
ΒΜΜΦ	Bone marrow-derived macrophage (Knochenmarksmakrophage)
bzw.	beziehungsweise
CAD	cationic amphiphilic drugs (amphiphile Medikamente)
САР	community-acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
СВА	cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
cDNA	<i>cytosolic</i> (zytosolische) DNA
CFU	colony forming units (koloniebildende Einheiten)
СОХ	Cyclooxygenasen
cPLA ₂	<i>cytosolic</i> (zytosolische) PLA ₂
CRAMP	cathelicidin-related antimicrobial peptide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dendritische Zelle
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc-Teil	crystallisable fragment (kristallisierbares Fragment)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FSC	forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)

FZB	Forschungszentrum Borstel
GALT	gut associated lymphoid tissue (Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
γδT-Zellen	gamma-delta-T-Zellen
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Gr1	granulocyte differentiation antigen 1
h	Stunde (hora)
H&E	Hämatoxylin und Eosin
Hz	Herz
IFN-γ	Interferon-y
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
iPLA ₂	Kalzium unabhängige (<i>independent</i>) PLA ₂
IL-17ra ^{-/-}	IL-17-Rezeptor-defiziente Mäuse
IN	intranasal
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	intraperitoneal
IT	intratracheal
IV	intravenös
IVC	individually ventilated cages (separat belüftete Käfige)
КС	keratinocyte chemoattractant
kDa	Kilo-Dalton
L	Lumen
LD50	50% lethale Dosis
LDL	low density lipoprotein
L. monocytogenes	Listeria monocytogenes
LPLA ₂	lysosomale Phospholipase A ₂
LPLA2 ^{-/-} (KO)	LPLA ₂ -defiziente Mäuse
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6G	lymphocyte antigen 6G

Μ	Mukosa
МАМР	microbial associated molecular Patterns
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1,
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
Min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
MLK	mesenteriale Lymphknoten
MOI	multiplicity of infection
MP	Muscularis propria
МРО	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
M-Zelle	microfold-cell
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NETs	neutrophil extracellular traps
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NLR	Nod-like-Rezeptoren
NO	Stickstoffoxid
NOS2	NO-Synthase-2
NRAMP	natural resistance-associated macrophage protein 1
OD	optische Dichte
PAF-AH	platelet-activating factor acetylhydrolase
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PLA, B, C, D	Phospholipase A bis D
ΡΜΦ	Peritonealmakrophage

PRR	pattern recognition receptor
PS	Phosphatidylserin
RHS	Retikulohistiozytäre System
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffderivate)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SCV	Salmonella-containing vacuole
SM	Submukosa
SP	Surfactant Protein
SPF	spezifisch pathogenfrei
SPI	Salmonella pathogenicity island
sPLA ₂	sekretierte PLA ₂
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
<i>S.</i> Tm	Salmonella enterica serovar Typhimurium
Surfactant	surface active agent
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	tumor necrosis factor
тн	T-Helfer
ТНҮ	Todd-Hewitt Medium mit Hefe (<i>Yeast</i>)
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TSA	Trypticase-Soja-Agar
T3SS	Typ III Sekretionssystem
ÜN	über Nacht
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
7NIS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Pathogene Bakterien; Das Leben innerhalb oder außerhalb von Zellen

Die Basis aller Pathogen-Wirts-Beziehungen ist, dass ein Organismus (Parasit) die Umgebung die ein anderer Organismus (Wirt) bereitstellt, nutzen kann. Meist haben sich Parasiten an das extrazelluläre oder bevorzugt (fakultativ) bzw. ausschließlich (obligat) intrazelluläre Leben im Wirt angepasst, manchmal auch an beides. Während Viren insbesondere auf die Maschinerie der Proteinsynthese des Wirts angewiesen sind, beziehen Bakterien hauptsächlich Nährstoffe von ihrem Wirt. Intrazelluläre Bakterien greifen dabei auf die Nährstoffe ihrer Wirtszelle zurück, während extrazelluläre Bakterien diese den Körperflüssigkeiten entziehen [1]. Beide Lebensweisen pathogener Bakterien stellen sowohl für den Parasiten als auch für den Wirt ganz unterschiedliche Herausforderungen dar. Durch das Leben in der Zelle sind intrazelluläre Bakterien gegen viele Abwehrmechanismen des Wirtes, wie z.B. Antikörper, dem Komplementsystem oder phagozytische Zellen, geschützt. Neben dem Umgang mit intrazellulären Abwehrmechanismen des Wirtes, ist ein Problem dieser intrazellulären Lebensweise für das Pathogen, dass sie nicht auf Dauer funktioniert. Nach einer erfolgreichen intrazellulären Vermehrung muss eine Verbreitung zu anderen Zellen erfolgen [1]. In dieser Phase sind sie den extrazellulären Abwehrmechanismen ausgesetzt. Im Gegensatz dazu können sich extrazelluläre Bakterien frei vermehren und ausbreiten, müssen sich dabei aber dauerhaft mit den extrazellulären Abwehrmechanismen des Wirts auseinandersetzen. Eine schnelle Ausbreitung und Kolonisierung von Organen oder mukosalen Oberflächen ist dabei ein wichtiger Mechanismus, um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Die unterschiedlichen Bedingungen für extrazelluläre und intrazelluläre Bakterien führen somit zu Anpassungen, die sich stark voneinander unterscheiden und auch die nötigen Abwehrmechanismen des Wirts sind verschieden [1].

1.1.1 Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae wurde 1881 fast zeitgleich und unabhängig voneinander von G.M. Sternberg und L. Pasteur als extrazellulärer Erreger der Lungenentzündung (Pneumonie) beschrieben (Abbildung 1) [2–4]. Die auch als Pneumokokken bezeichneten ovalen bis lanzettförmigen, Gram-positiven Bakterien gehören zu der Gattung *Streptococcus* und liegen meist als Diplokokken vor. Sie besitzen auf Blutagar eine α -Hämolyseaktivität, bei der es durch Wasserstoffperoxid der Streptokokken zu einer Oxidation des Eisens im Hämoglobin der Erythrozyten kommt und dieses zu Methämoglobin reduziert wird. Dadurch ändert sich das Absorptionsspektrum des Hämoglobins, wodurch ein grau-grüner Hämolysehof um die Streptokokken-Kolonien entsteht [4, 5].

Ein wesentliches Merkmal und einer der wichtigsten Virulenzfaktoren der Pneumokokken ist die Polysaccharidkapsel. Sie schützt die Pneumokokken vor dem Komplement und der antigenspezifischen Erkennung durch Antikörper und somit vor der Aufnahme durch Phagozyten [6-8]. Kolonien stark bekapselter Stämme zeigen auf Blutagar ein schleimiges Erscheinungsbild, das als s (smooth)-Form bezeichnet wird. Kolonien unbekapselter oder schwach bekapselter Stämme sind hingegen glanzlos und weisen eine rauhe r (rough)-Form auf [4, 9]. Auf Basis verschiedener chemischer Strukturen der Kapselpolysaccharide konnten bisher 94 Serotypen von S. pneumoniae unterschieden werden, inklusive der vor kurzem beschriebenen Serotypen 6C, 6D, 11E, und 20A/20B [10-15]. Die Kapsel besteht aus Polymeren sich wiederholender Oligosaccharideinheiten, die aus 2 bis 8 Monosacchariden zusammengesetzt sind. Die Kapseln vieler Serotypen beinhalten Arabitol, Ribitol oder saure Komponenten (z.B. D-Glucuronsäure oder Phosphatgruppen) und bei einigen ist auch Phosphorylcholin ein Bestandteil [10]. Die Virulenz des Serotyps hängt zum großen Teil von der Ausprägung und Struktur der Polysaccharidkapsel ab. So beschrieben beispielsweise Watson et al. 1990, dass unbekapselte Stämme eine 5x10⁷ fach höhere 50% lethale Dosis (LD50) benötigen als der bekapselte Wildtyp (WT) Stamm [9, 16]. Stark virulent sind besonders Pneumokokken der Serotypen 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F [17–20], welche auch für die meisten Pneumokokken-Erkrankungen weltweit verantwortlich sind [10, 21-25]. Weitere Virulenzfaktoren der Pneumokokken sind Zellwandbestandteile, diverse Oberflächenproteine, Pili und Pneumolysin [6, 7]. Pneumolysin ist ein intrazelluläres lytisches Toxin, das nicht sekretiert, sondern bei einer durch Autolysin ausgelösten Selbstzerstörung der Bakterienzelle freigesetzt wird [24, 26]. Es verursacht in der Lunge ähnliche Symptome wie der Erreger selbst [27], besitzt direkte zytotoxische Effekte auf Lungenepithelzelllinien [28] und kann in geringeren Mengen in humanen Monozyten die Produktion von tumor necrosis factor (TNF) und Interleukin (IL)-1 stimulieren [29].

Pneumokokken sind häufige Kommensalen des menschlichen Nasenrachenraums und besiedeln asymptomatisch die Schleimhäute des oberen Atemtraktes von bis zu 50% der gesunden Menschen [18, 30–32]. Es kann dabei im Laufe des Lebens wiederholt zu einer Kolonisation durch mehrere Serotypen gleichzeitig kommen [30, 31]. Nach der Besiedlung der Nasennebenhöhlen kann *S. pneumoniae* über die Eustachische Röhre in das Mittelohr gelangen und lokale Infektionen wie Nasennebenhöhlenentzündungen (Sinusitis) und Mittelohrentzündungen (Otitis Media) auslösen [4, 33, 34]. Vor allem bei Kindern unter 2 Jahren ist *S. pneumoniae* einer der häufigsten Ursachen dieser Erkrankungen [33, 35].



Abbildung 1: *S. pneumoniae* induzierte Erkrankungen

Über die Ausbreitung durch Aspiration kommt es zu einer meist asymptomatischen Kolonisierung des Nasenrachenraums. Die Entwicklung einer Otitis Media ist eine häufige Komplikation bei Kindern unter 2 Jahren, während eine Pneumonie vermehrt bei Kindern und älteren Menschen über 65 Jahren auftritt. Invasive Pneumokokken-Erkrankungen der Lunge und eine Ausbreitung im Blut kommen vor allem bei immundefizienten Personen vor. Die schwerste Form der invasiven *S. pneumoniae*-Infektion stellt eine Meninigitis dar. (Die Abbildung wurde modifiziert nach Henriques-Normark und Tuomanen 2013 [25]).

S. pneumoniae kann vom oberen respiratorischen Atmungstrakt über die Bronchien in die Lunge disseminieren und eine Pneumonie auslösen [25, 36, 37]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist *S. pneumoniae* weltweit der häufigste Erreger ambulant erworbener Pneumonien, der so genannten *community-acquired pneumonia* (CAP) [38]. Bei bis zu 25 % aller Pneumokokken-Pneumonien, meist im Fall einer Immunschwäche, überwinden Pneumokokken zudem die Luft-Blut-Schranke und gelangen in das Blutsystem des Menschen, wo sie sich über den Blutkreislauf im Organismus ausbreiten und eine Sepsis auslösen können [25, 39]. Durchbrechen die Pneumokokken-Erkrankung (Meningitis) entwickeln [35, 38, 40]. Auch wenn es in jedem Alter zu einer Pneumokokken-Erkrankung kommen kann, zeigt die Häufigkeit und die Schwere der Infektion eine strikte Korrelation zum Alter der Patienten. Besonders gefährdet sind die Altersgruppen der unter 2- und der über 65-jährigen Personen, welche die höchste Inzidenz invasiver Pneumokokken-Infektionen [45]. Nach

Schätzungen der WHO starben im Jahre 2005 1,6 Millionen Menschen, davon bis zu 1 Million Kindern unter 5 Jahren, meist in Entwicklungsländern [38].

1.1.1.1 Mausmodelle akuter Pneumokokken-Infektionen

Modelle in Tieren, vor allem Mausmodelle, stellen ein wichtiges Hilfsmittel für die Erforschung von Pathogenitätsmechanismen, dem Test neuer Medikamente und Impfungen sowie der Charakterisierung bakterieller Virulenz- und Abwehrfaktoren des Wirtes dar. Die verwendeten Mausmodelle sind so zahlreich wie die *S. pneumoniae*-induzierten Krankheitsbilder selbst, von der Kolonisierung bis hin zur Sepsis und Meningitis [46]. Der Verlauf einer experimentellen Pneumokokken-Infektion hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Angefangen bei der Wahl des Mausstammes bis hin zu der Wahl der Serotypen und der Entscheidung für einen Pneumokokken-Stamm aus dem Labor oder einem klinischen Isolat [46].

Für die Untersuchung der akuten Pneumonie im Mausmodell werden verschiedene Infektionsrouten verwendet. Am weitesten verbreitet ist die Infektion durch intranasale (IN) Aspiration, die im Gegensatz zu der intratrachealen (IT) Infektion keinen operativen Eingriff wefordert und anders als die Aerosolinfektion die natürliche Route der Infektion durch Aspiration der Bakterien aus den oberen Atemwegen nachstellt [46–49]. Charakteristisch für eine humane Pneumokokken-Infektion des Atemtraktes ist eine Lobärpneumonie, in der ganze Lungenlappen von der Infektion betroffen sind. Diese Ausprägung ist im Mausmodell selten und eher durch eine IT-Infektion zu erreichen [46]. Im IN-Infektionsmodell wird vor allem eine Bronchopneumonie ausgelöst, bei der sich die Entzündungsreaktion herdförmig um die Bronchien ausbreitet [47]. In beiden Fällen kommt es im Mausmodell meistens zu einem septischen Verlauf der Erkrankung [46], der im Menschen vermehrt nur bei immungeschwächten Patienten oder bei Kindern unter 2 Jahren auftritt [35]. Um eine Sepsis zu verhindern, ist die Wahl weniger virulenter Pneumokokken-Stämme in der Maus, der Serotypen 14, 19 oder 23, nötig [50]. Alternativ kann auch mit einer geringeren Dosis virulenter Stämme, z.B. des Serotyps 3, gearbeitet werden [48].

Die bereits erwähnte Komplikation einer Sepsis oder Bakteriämie bei *S. pneumoniae*induzierter Pneumonie im Menschen, wird im Mausmodell häufig auch als sekundäre Bakteriämie nach einer IT- oder IN-Infektion untersucht. Ein großer Nachteil dieses Infektionsweges ist dabei die schlechte experimentelle Kontrollierbarkeit der Infektion [46], weshalb sowohl die intraperitoneale (IP) Infektion [51, 52] als auch die intravenöse (IV) Infektion Verwendung findet [26, 53, 54].

Während einer systemischen Pneumokokken-Infektion im Menschen kann es durch die Ausbreitung der Bakterien durch die Blut-Hirn-Schranke zu einer akuten Meningitis kommen [55, 56]. Um diesen Krankheitsverlauf zu simulieren kann eine IN- oder IV-Infektion in Hyaluronidase behandelten Mäusen durchgeführt werden. Hyaluronidase baut Hyaluronsäure, eine Komponente der extrazellulären Matrix, ab und ermöglicht so eine schnellere Ausbreitung der Bakterien. Folglich entwickeln die Tiere vermehrt die charakteristischen Symptome einer Meningitis mit Bakterien in der Rückenmarksflüssigkeit und der Infiltration von Neutrophilen um die leptomeningealen Blutgefäße des Hirns. Nachteilig ist auch hier das meist frühe Versterben der Tiere durch eine Sepsis [57]. Die direkte Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS) durch die Ausbreitung der Bakterien aus dem Nasenrachenraum oder nach einem Hirntrauma wird im Mausmodell durch eine direkte intracerebrale oder intracisternale Infektion simuliert [46].

1.1.2 Salmonella enterica serovar Typhimurium

Bei Salmonella enterica handelt es sich um ein Gram-negatives, begeißeltes und stäbchenförmiges Bakterium, das eine Vielzahl von Erkrankungen auslösen kann, von selbstlimitierendem Durchfall bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen. Salmonellen werden in die beiden Gruppen der typhoiden Salmonellen und der Enteritis-Salmonellen eingeteilt. Erstere verursachen systemische Erkrankungen wie Typhus und Paratyphus (Salmonella enterica serovar Typhi und Paratyphi), während Enteritis-Salmonellen primär für Durchfallerkrankungen verantwortlich sind [4]. Die Einteilung in die Subspezies, der so genannten Serovars, erfolgt aufgrund ihres Flagellums, sowie der Struktur ihrer Kohlenhydrate und des Lipopolysaccharids (LPS) [58]. Ausgelöst werden die Durchfallerkrankungen des Menschen hauptsächlich von Salmonella enterica serovar Typhimurium (S. Tm), das über kontaminierte Nahrungsmittel oder Trinkwasser in den Körper gelangt und eine starke Immunantwort auslöst. Im Darm kann S. Tm über verschiedene Mechanismen in die Epithelschicht eindringen. Entweder wird das Bakterium vom Wirt durch M-Zellen (engl. für microfold-cell) oder dendritische Zellen (DZ) aufgenommen oder es dringt selbst aktiv in nicht-phagozytierende Zellen ein [59-62]. M-Zellen sind spezialisierte Epithelzellen, die im Bereich der Peyerschen Plaques des Dünndarms vorkommen und mittels Endozytose Antigene oder Bakterien aus dem Darmlumen aufnehmen können [63]. Bei der selbstständigen Infiltration des Gewebes dringt Salmonella entweder aktiv in Enterozyten ein oder zerstört die Zellverbindungen (Tight Junctions), welche Epithelzellen miteinander verbinden [64]. Die Ausbreitung der Bakterien erfolgt anschließend durch das Retikulohistiozytäre System (RHS). Das RHS besteht aus der Gesamtheit aller Zellen des retikulären Bindegewebes, einschließlich der Phagozyten die vorwiegend für die Streuung der Salmonellen verantwortlich sind. Salcedo et al. (2001) zeigten diesbezüglich, dass Makrophagen die größte Zellpopulation im retikuloendothelialen System darstellen, die intrazellulär Salmonellen tragen [65]. Die anschließende Vermehrung der Bakterien erfolgt in Milz und Leber [66], besonders in Makrophagen, DZs und Neutrophilen, die dort eine Nische für das erfolgreiche Überleben der Salmonellen darstellen [60, 67–69].

Die fakultative intrazelluläre Lebensweise ist eine der wesentlichen Mechanismen, um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, weshalb die wichtigsten Virulenzfaktoren der Salmonellen auch eng mit diesem Virulenzverhalten assoziiert sind [60]. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die in Inseln organisierten Pathogenitätsgene, die so genannten Salmonella pathogenicity islands (SPIs), die ein intrazelluläres Überleben der Bakterien ermöglichen. Die beiden Gengruppen SPI-1 und SPI-2 kodieren für zwei Typ III Sekretionssysteme (T3SS), die für die Injektion bakterieller Proteine in die Wirtszelle oder ihre Sekretion verantwortlich sind [70, 71]. Während der frühen Infektionsphase sind vor allem SPI-1-kodierte Effektorproteine wie SipA, SopB, SopE und SopE2 für die Invasion der Bakterien von Bedeutung. Durch Interaktion mit dem Zytoskelett lösen sie die Aufnahme der Bakterien durch Epithelzellen über Makropinozytose aus [71, 72] und sorgen für die Spaltung von Tight Junctions zwischen den Zellen [73]. Die Injektion dieser SPI-kodierten Proteine löst zudem verschiedene Abwehrmechanismen der Wirtszelle aus. Dazu gehört die Aktivierung von IL-1β und IL-18, durch die Bindung von SipB an Caspase-1, was zur Induktion von Pyroptose führt [74]. Bei der Pyroptose handelt es sich um einen programmierten proinflammatorischen Zelltod, der als Abwehrmechanismus des Wirtes die intrazellulären Nischen der Erreger zerstört. Gleichzeitig werden die freigesetzten Erreger durch die so vermehrt rekrutierten Phagozyten aufgenommen, die als "Vehikel" die Verbreitung der Salmonellen im infizierten Gewebe fördern [64, 75-77]. Nachdem Salmonella in die Wirtszelle eingedrungen ist, sind vor allem SPI-2-kodierte Proteine für den intrazellulären Überlebensprozess notwendig. Die Expression der SPI-2-kodierten Gene wird durch sich verändernde Bedingungen im Phagosom ausgelöst, wie Ansäuerung, steigende Konzentration zweiwertiger Kationen und die Präsenz antimikrobieller Peptide (AMPs) [71]. Das Phagosom wird dann zu einer membrangebundenen Vakuole, der so genannten Salmonella-containing vacuole (SCV), umgewandelt, um der Fusion mit dem Lysosom zu entgehen und eine ungestörte Replikation der Bakterien zu ermöglichen [78, 79].

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *S.* Tm ist das Lipopolysaccharid (LPS) aus dem die Zellwand des Erregers aufgebaut ist. Es handelt sich dabei um einen starken *Toll-like* Rezeptor (TLR) 4 Aktivator, der aus Lipid A, dem Kern-Oligosaccharid, und dem kovalent gebundenen Polysaccharid O-Antigen besteht [1]. Das Endotoxin Lipid A ist an der Verankerung des LPS in der äußeren Membran der Gram-negativen Bakterien beteiligt. Das Grundgerüst von Lipid A besteht aus zwei Glucosaminen, an das sechs bis sieben Acylgruppen gebunden sind. Über verschiedene Enzyme ist Salmonella in der Lage die Anzahl dieser Acylgruppen von Lipid A zu beeinflussen und dadurch die TLR4 Aktivität und die Immunantwort zu modulieren [80]. LPS kann während einer systemischen Infektion eine Sepsis auslösen, wohingegen die Rolle von LPS in der Darminfektion bisher ungeklärt ist [60].

1.1.2.1 Mausmodelle der Salmonellen-Infektion

Einige Salmonella Spezies haben ein sehr eingeschränktes Wirtsspektrum, während andere ein großes Repertoire an verschiedenen Wirtsarten infizieren können. Salmonella enterica serovar Typhi beispielsweise löst nur in Menschen und manchen Primatenarten eine Typhuserkrankung aus, ist aber in Mäusen avirulent. Somit ist kein direktes Modell für die menschliche Typhuserkrankung verfügbar. S. Tm hingegen hat ein breiteres Wirtsspektrum und ist im Menschen ein klassischer Erreger der Gastroenteritis, während er in Mäusen eine systemische, Typhus-ähnliche Erkrankung hervorruft. Aus diesem Grund wird S. Tm als ein Modell für den Salmonellen-induzierten Typhus verwendet. Hat sich S. Tm nach der oralen Infektion über das Darm assoziierte lymphatische Gewebe (gut associated lymphoid tissue, GALT) zu einer systemischen Infektion ausgebreitet, kommt es zur Vermehrung der Bakterien in Leber und Milz, und der Bildung von aus Neutrophilen bestehenden Abszessen und Granulomen mit zentraler Nekrose [66]. Die Läsionen in den inneren Organen sowie die Bakteriämie ähneln der Typhuserkrankung beim Menschen [66]. In diesem Modell kommt es weder zu einer effizienten Besiedlung des Darms durch Salmonellen, noch zu einer akuten Entzündung desselbigen [81]. Es wurde früh beschrieben, dass dieses Phänomen in einem engen Zusammenhang mit der protektiven Eigenschaft der kommensalen Darmflora der Mäuse steht. Mäuse ohne Darmflora zeigen keine so genannte Kolonisierungsresistenz und auch die Wiederbesiedelung dieser Mäuse mit kommensalen Bakterien behebt diesen Phänotyp nicht [81–86]. Dezimierung der natürlichen Darmflora durch Antibiotika kann die Balance im Darm stören und zu Gunsten der Salmonellen verschieben. Im Jahre 2003 entwickelten Barthel et al. ein Mausmodell, das durch Behandlung der Mäuse vor der Infektion mit 20 mg Streptomycin eine bessere Besiedelung des Darms mit S. Tm ermöglicht. Innerhalb eines Tages entwickeln diese Tiere im Caecum und Colon Symptome einer Colitis, die ähnlich der Situation beim Menschen durch Neutrophilen-Infiltration, Ödembildung und Zerstörung des Darmepithels gekennzeichnet ist [87]. Ob die Lokalisation der Entzündungen im Mausmodell die Situation im Menschen widerspiegelt ist umstritten. Im Mausmodell kommt es zu Entzündungen vor allem im Caecum und Colon, während das Ileum kaum betroffen ist. Im Menschen hingegen wird generell von einer Enterocolitis gesprochen, welche Dünndarm und Dickdarm einschließt [81]. Eine Gegenüberstellung beider Modelle ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die für die experimentelle Salmonellen-Infektion häufig verwendeten C57BL/6 Mäuse sind aufgrund einer Punktmutation des *natural resistance-associated macrophage protein* 1 (*Nramp*1)-Gens besonders empfänglich für *S*. Tm Wildtyp-Infektionen und sterben innerhalb von sechs bis neun Tagen. Aus diesem Grund eignen sich diese Tiere nur für Untersuchungen akuter Salmonellen-Infektionen [88]. Möchte man den chronischen Verlauf einer systemischen oder nicht systemischen Salmonellenerkrankung untersuchen, können entweder Mäuse mit dem Wildtyp-Allel von NRAMP1 (beispielsweise 129Sv/Ev Mäuse) oder attenuierte *S*. Tm Stämme eingesetzt werden [88–90]. Die Verwendung attenuierter Stämme ermöglicht nicht nur den Einsatz von gentechnisch veränderten Mäusen, welche häufig auf einem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet werden, sondern stellt auch ein stabiles und reproduzierbares Mausmodell für die intestinale Fibrose dar, einer schwerwiegenden Komplikation bei Morbus Crohn Patienten [89, 91].



Abbildung 2: Verlauf einer Salmonellen-induzierten Colitis gegenüber dem systemischen Typhus

Bei einer Colitis wird durch die Erkennung der Salmonellen eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst, die vor allem durch eine massive Infiltration von Neutrophilen und die Produktion von Mukus und antimikrobiellen Peptiden gekennzeichnet ist [87]. Die Entzündung fördert die extrazelluläre Vermehrung im Darm und die Verbreitung der Salmonellen durch die induzierte Diarrhö [92]. Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Salmonellen-induzierten Typhuserkrankung kaum zu Entzündungen und Vermehrung der Salmonellen im Darm. Vielmehr erfolgt die Verbreitung der Salmonellen über das Retikulohistiozytäre System zu den systemischen Organen. Dort vermehren sich die Bakterien in granulösen Abszessen vor allem intrazellulär in Makrophagen und Neutrophilen [66, 81, 93]. MLK: mesenteriale Lymphknoten.

1.2 Immunabwehr gegen extrazelluläre und intrazelluläre mikrobielle Pathogene

Die Orte der initialen Immunantwort sind sowohl bei extrazellulären als auch intrazellulären Erregern die mukosalen Oberflächen des Körpers, die im Kontakt zur Außenwelt stehen und die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene darstellen. An dieser Linie bilden Epithelzellen und Mukus, der von spezialisierten Epithelzellen (Becherzellen) gebildet wird, eine physikalische Barriere, die dem mukosalen Immunsystem helfen pathogene Eindringlinge abzuwehren [94, 95]. Haben die Krankheitserreger die erste Barriere überwunden, ist sowohl gegen extra- als auch intrazelluläre Krankheitserreger eine schnelle Reaktion des angeborenen Immunsystems gefragt, um die Ausbreitung der Eindringlinge zu verhindern [96]. Ein zentrales Element der Abwehr extrazellulärer Erreger stellt dabei vor allem die Opsonisierung und Neutralisierung dar. Dieses "Einhüllen" von Fremdpartikeln wird in der angeborenen Abwehr durch natürlich vorhandene Antikörper im Zusammenspiel mit Komponenten das Komplement-Systems übernommen [97]. Zudem erfolgt die Abwehr über Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile, die zu der ersten Verteidigungslinie der angeborenen Immunantwort gehören. Sie nehmen in den Körper eingedrungene Krankheitserreger auf und töten sie über oxidative und nicht oxidative Mechanismen ab [96, 98]. Zu den nicht oxidativen Mechanismen, die häufig gegen extrazellulären Bakterien ausreichen, zählen die Ansäuerung der Umgebung, die Aktivität von Cathepsinen und anderer Hydrolasen sowie AMPs, wie Cathelicidine und Defensine. Ein oxidativer Mechanismus ist die Bildung reaktiver Sauerstoffderivate (reactive oxygen species, ROS) durch eine membranständige NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidase, die Superoxid-Anionen produziert und in die sich bildenden Phagolysosomen abgibt [96, 98]. Im Gegensatz zu extrazellulären Pathogenen haben intrazelluläre Erreger vielfältige Mechanismen entwickelt um diesem Schicksal zu entgehen oder zu wiederstehen [99]. Problematisch sind dabei besonders intrazelluläre Bakterien, die innerhalb von Immunzellen leben und damit die Wirtsabwehr schwächen. Beispiele dieser Lebensweise sind Mycobacterium tuberculosis oder Salmonella enterica, die sich fakultativ in Makrophagen vermehren [1]. Für die Abtötung dieser Bakterien spielt die Aktivierung von Makrophagen eine zentrale Rolle. Sie erfolgt durch Zytokine, insbesondere Interferon-γ (IFN-γ), die von angeborenen und spezifischen Lymphozyten sekretiert werden. Die Aktivierung der Makrophagen induziert die Bildung von antimikrobiellen Stickstoffoxiden (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) oder die NO-Synthase-2 (NOS2), die gegen viele intrazelluläre Erreger wirksam sind [98, 100].

Ein wichtiges Element der angeborenen Immunantwort ist zudem die Erkennung intra- und extrazellulärer Krankheitserreger. Rezeptoren auf Epithelzellen und lokalen Gewebsmakrophagen, die so genannten pattern recognition receptors (PRR), erkennen konservierte Strukturen von Mikroorganismen [94]. Diese microbial associated molecular Patterns (MAMPs) umfassen ein weites Spektrum an Molekülen, wie LPS Gram-negativer oder Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien, das Mannan pathogener Pilze oder virale doppelsträngige RNA. Zu dem Repertoire an PRRs gehören TLRs, Nod-like-Rezeptoren (NLRs), Scavenger-Rezeptoren, Integrine und C-Typ-Lektine [101]. Die Erkennung der Pathogene über PRRs von Epithelzellen und lokalen Gewebsmakrophagen führt in der Regel durch Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und AMPs zu einer Entzündungsreaktion und der Rekrutierung von weiteren Abwehrzellen, wie neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten [102, 103]. Neben der Tötung von Krankheitserregern, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Produktion von Zytokinen und Chemokinen und beim Aufbau der adaptiven zellulären Immunantwort durch Prozessierung und Präsentation von Fremdantigenen [4]. Letzteres wird nicht nur durch Makrophagen, sondern durch alle Antigen-präsentierenden Zellen (APZs), wie DZs, bewerkstelligt. Die Antigenpräsentation führt zur spezifischen Stimulation von T-Helfer (TH)-Zellen und zytotoxischen T-Zellen. TH-Zellen stellen eine zentrale Schaltstelle der erworbenen Immunantwort gegen intra- und extrazelluläre Pathogene dar. Die Ausrichtung dieser Lymphozyten wird unter anderem durch die Zytokinproduktion von Zellen des angeborenen Immunsystems gesteuert [97]. Die Ausrichtung zur TH2-induzierten B-Zell-Antwort wird durch IL-4 gefördert und ist, mit der Produktion spezifischer Antikörper, vor allem gegen extrazelluläre Erreger wirksam. Gegen intrazelluläre pathogene Bakterien hingegen spielt die Aktivierung der Makrophagen durch Zytokine der TH1-Antwort (IL-12 und IFN- γ) und die Unterstützung neutrophiler Granulozyten in der TH17-Antwort (durch IL-17 und IL-22) eine große Rolle [4, 97]. In der frühen Phase der Infektion, bis zur Aktivierung spezifischer CD4⁺T-Zellen, übernehmen vor allem Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, wie gamma-delta ($\gamma\delta$)T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), die Produktion proinflammatorischer Zytokine [1, 104–108].

Somit ist der wesentliche Unterschied zwischen der Immunantwort gegen extra- und intrazelluläre Krankheitserreger vor allem die generelle Gewichtung der humoralen und zellulären Wirtsantwort sowohl auf Ebene der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Im Folgenden soll nun auf die Immunantwort gegen die beiden Krankheitserreger *S. pneumoniae* und *S.* Tm eingegangen werden.

1.2.1 Immunantwort gegen S. pneumoniae

Die mukosale Immunantwort gegen Pneumokokken beginnt mit der Besiedelung des Nasenrachenraums, wo die Balance zwischen lokaler Abwehr, Konkurrenz anderer kommensaler Bakterien und Invasivität des jeweiligen Serotyps den Infektionsverlauf bestimmen [11, 32, 109]. Die unmittelbaren Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems sind sowohl in dieser Kolonisierungsphase der Pneumokokken als auch später am Ort der Infektion unverzichtbar. In beiden Phasen steht zu Beginn der Immunantwort die Erkennung der Pathogene. Mehrere Mitglieder der TLR-Familie wurden als Rezeptoren für Pneumokokkenbestandteile identifiziert. TLR2 soll unter anderem die Lipoteichonsäure von *S. pneumoniae* erkennen [110, 111], während TLR4 (normalerweise bekannt als LPS-Rezeptor) das Pneumolysin-Toxin [112] und TLR9 unmethylierte Cystein-Phosphat-Guanin Di-Nukleotide der Bakterien DNA erkennt [113].

Die Erkennung der Pneumokokken von Epithelzellen und lokalen Gewebsmakrophagen über deren PRRs führt über die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [113, 114]. Dies hat eine Entzündungsreaktion zu Folge, die durch starke Infiltration von Neutrophilen gefolgt von peripheren Makrophagen charakterisiert ist [102, 103]. Beide Phagozyten-Typen sind essentiell für die Immunantwort gegen *S. pneumoniae* [113, 115], über ihren Beitrag in dieser Infektion ist bisher jedoch wenig bekannt. Vermutlich sind aber insbesondere Makrophagen an der Koordination der Immunantwort beteiligt [114]. Bekannt ist, dass vor allem Alveolarmakrophagen (AM Φ) während einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie wichtige Produzenten von TNF- α und IL-1 β sind. Diese Zytokine spielen eine zentrale Rolle in der frühen Infektion, indem sie die Zytokinproduktion sowie antimikrobielle Effektormechanismen von Phagozyten verstärken [114, 116]. Neutrophile sind vor allem für die Tötung der Pneumokokken durch intra- und extrazelluläre Mechanismen von zentraler Bedeutung. Dabei ist die Bildung so genannter *neutrophil extracellular traps* (NETs), bestehend aus ausgestoßener DNA und daran gebundener antimikrobieller Komponenten, wie Elastase, Lactoferrin, Myeloperoxidase oder AMPs, eine wichtige antimikrobielle Reaktion der neutrophilen Granulozyten [113, 117].

Einmal erfolgreich den Atemtrakt besiedelt, treffen die Pneumokokken auf lokale Schutzmechanismen der Lunge, wie dem Surfactant (*surface active agent*) [102]. Der Surfactant der Lunge ist eine Mischung aus ca. 90 % Phospholipiden und 10 % Proteinen, die die Oberflächenspannung in den Alveolen reduziert und diese so vor dem Kollabieren schützt [118]. Die Surfactant Proteine (SP) A und D sind zudem an der Abwehrreaktion gegen Pathogene in der Lunge durch Opsonisierung der Erreger und Stimulation der Immunzellfunktionen beteiligt [102, 113, 119]. SP-A kann *in vitro* die Phagozytose von Pneumokokken durch Makrophagen steigern [113, 120], während die Bindung von SP-D an *S. pneumoniae* zur Aggregation und Aufnahme der Bakterien durch Neutrophile führt [121, 122]. Vermutlich vermeidet die Aggregation die Ausbreitung der Pneumokokken durch ihre Immobilisierung, bei gleichzeitiger Begünstigung ihrer Beseitigung durch das Mukuziliäre System [102], welches Fremdkörper durch den Fluss des Mukus und dem Schlagen der Epithelzilien nach außen transportiert [97].

Ein antimikrobieller Mechanismus, der vor allem bei systemischen Infektionen mit S. pneumoniae von Bedeutung ist, ist das Komplementsystem. Seine Beteiligung an der Wirtsantwort gegen Pneumokokken ist bereits seit über 100 Jahren bekannt [102]. Die essenzielle Rolle des Systems wird deutlich bei Patienten mit einer Defizienz für die zentrale Komplement-Komponente C3. Diese Patienten leiden in ihrem Leben vermehrt unter Pneumokokken-Infektionen [113]. Das Komplement-System kann über drei Wege aktiviert werden: (A) Den klassischen Weg über Antikörper-vermittelte Aktivierung durch die Bindung des Komplement Proteins C1q an den Fc-Teil der Antigen gebundenen Antikörper, (B) den alternativen Weg, der ständig auf niedrigem Niveau aktiviert ist, und nur durch die Abwesenheit inhibitorischer Moleküle auf körperfremden Oberflächen verstärkt wird, sowie (C) der Lektin-Weg, welcher durch die Bindung von Mannose-bindenden Lektinen an Zuckerstrukturen auf bakteriellen Oberflächen aktiviert wird. Unabhängig davon über welchen Weg das Komplementsystem aktiviert wird, kommt es zur Phagozytose-steigernden Opsonisierung der Bakterien, Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen und direkten Tötung der Bakterien durch die Formation von Poren in der Bakterienmembran [97]. Der klassische Weg, welcher unter anderem durch Immunglobulin (Ig)-M Bindung vermittelt wird, ist am wichtigsten bei der Aktivierung Komplement-vermittelter Effektorfunktionen in der Pneumokokken-Infektion [123–125], während der alternative Weg vor allem für die Verstärkung der Komplementaktivierung sorgt [123, 126]. Der Lektin-Aktivierungsweg scheint in der Immunantwort gegen Pneumokokken hingegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen [123].

Das adaptive Immunsystem hat eine große Bedeutung in der Immunantwort gegen S. pneumoniae nicht nur aufgrund der Bildung spezifischer Antikörper, sondern auch der Aktivierung spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Die Kolonisierung des Nasenrachenraums bewirkt die Bildung von Antikörpern gegen Kapselpolysacharide oder Oberflächenproteine, die vor einer erneuten Kolonisierung schützen können [127]. Der Erfolg der gegen Kapselpolysaccharide gerichteten Serotherapie zeigte zudem, dass diese Antikörper alleine einen effektiven Schutz vor Pneumokokken-Erkrankung bieten können. Bisher unklar ist jedoch, ob sie auch in der natürlichen Immunantwort gegen S. pneumoniae für eine erfolgreiche Immunantwort verantwortlich sind [127]. Wahrscheinlich ist, dass eine wirksame Immunantwort gegen S. pneumoniae dem Zusammenspiel der zellulären und humoralen Immunantwort bedarf. In neueren Untersuchungen konnte eine Rolle von CD4⁺ T-Zellen sowohl beim Schutz gegen Kolonisierung als auch gegen invasive Pneumokokken-Infektionen gezeigt werden [128-130]. Insbesondere scheinen CD4⁺ T-Zellen des TH17 Typs im Nasenrachenraum zu der protektiven Rolle der T-Zellen beizutragen [103, 130]. TH17-Zellen sind vor allem durch die Produktion von IL-17A und F, IL-22 und IL-26 charakterisiert und tragen durch die Synthese dieser Zytokine zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen bei [130–132].

1.2.2 Immunantwort gegen S. Tm

Der erste Kontakt zwischen gastrointestinalen Erregern und dem Wirt entsteht an der epithelialen Oberfläche des Magen-Darm-Traktes, welche die größte Grenzschicht zwischen Wirt und Umwelt darstellt. Dort sind die Bakterien mit C-Typ Lektinen, Defensinen und andere AMPs konfrontiert [92, 133, 134]. Hier kommt S. Tm in Kontakt mit den Epithelzellen des Darms, den so genannten Enterozyten. Die Aktivierung der Enterozyten sowie lokaler Makrophagen durch MAMPs der Salmonellen führt zu der Produktion von zellulären Transkriptionsfaktoren wie NF-κB, was wiederum die Bildung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine verursacht [135–139]. Die Erkennung der MAMPs erfolgt im Fall der Salmonellen extrazellulär zum großen Teil über TLR2 (erkennt Lipopeptid, auch über TLR1 und 6), TLR4 (erkennt LPS) und TLR5 (erkennt Flagellin) [64, 140]. Für die intrazelluläre Erkennung spielen neben TLR9 (erkennt das Zuckerrückgrat der DNA) auch die NLRs NOD1 und NOD2 (erkennt Peptidoglykan), NLRC4 (erkennt Flagellin) sowie NLRP3 (unbekannter Ligand) eine Rolle [64, 141]. Infizierte Enterozyten signalisieren dem Immunsystem eine Infektion über die Chemokine IL-8, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , -1 β und RANTES sowie durch eine vermehrte Produktion von TNF-α, IFN-γ, IL-1, -6, -12 und IL-18 [142–147].

Die sezernierten Chemo- und Zytokine, vor allem IL-8, TNF- α und IFN- γ , sind essentiell für die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, wie z.B. inflammatorischen Makrophagen, DZs oder Neutrophile, in den Darm [148, 149]. Unter den Zytokinen spielt vor allem IFN- γ eine zentrale Rolle in der Immunantwort gegen *Salmonella*. Bei seinem Fehlen wurde ein erhöhtes Bakterienwachstum in Kombination mit einer reduzierten Überlebensrate des Wirts beobachtet [150–152]. IFN- γ aktiviert Makrophagen, steigert ihre Effektorfunktionen und damit die Effektivität der Bakterien-Tötung [153] sowie die Sekretion verschiedener Zytokine, wie IL-12 und IL-8. Diese Zytokine veranlassen ihrerseits NK-Zellen und T-Zellen zu einer verstärkten Produktion von IFN-γ, wodurch ein Kreislauf positiver Rückkopplung entsteht [134, 142, 154–157]. IL-8 rekrutiert im Menschen weitere neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung [144]. In der Maus übernimmt diese Funktion das homologe Chemokin *keratinocyte chemoattractant* (KC). In beiden Wirten bewirkt IL-12 zusammen mit IL-18 eine Stimulation der T-Zellen in Richtung der inflammatorischen TH1 Immunantwort [158, 159]. Ein Überblick über die angeborene Immunantwort gegen *S*. Tm ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3: Die angeborene Immunantwort gegen S. Tm

Die Invasion der Bakterien erfolgt passiv über M-Zellen des Epithels oder durch aktive Penetration der Enterozyten. Die Bakterien werden über PRRs erkannt, was zur Sekretion verschiedener Zytokine und Chemokine führt. IL-18 und IL-12 regen die Produktion von IFN-y durch T-Zellen an, was zur Aktivierung antimikrobieller Effektorfunktionen in Makrophagen führt. IL-23 stimuliert die Sekretion von IL-22 und IL-17, was eine erhöhte Produktion von Mukus, antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen durch Epithelzellen zur Folge hat. Die Sekretion von IL-8 (KC) und MIP-2 durch Epithelzellen führt verstärkt zur Infiltration von Neutrophilen. DZ: dendritische Zelle, MΦ: Makrophage, MLK: mesenteriale Lymphknoten, ROS: reaktive Sauerstoffderivate.

In der frühen Phase, wenige Stunden bis wenige Tage nach Infektion, kommt es zur intraund extrazellulären Vermehrung der Salmonellen. Die extrazellulären Bakterien werden, wie die Pneumokokken, vor allem durch Antikörper und das Komplement-System angegriffen. Ein wichtiger antibakterieller Mechanismus gegen intrazelluläre Salmonellen ist hingegen die Produktion von ROS und NO die durch die NADPH-Oxidase bzw. iNOS2 in Makrophagen und Neutrophilen generiert werden [160–162]. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung, wird durch ROS auch die Produktion des AMPs CRAMP (*cathelicidin-related antimicrobial peptide*) ausgelöst das gegen Salmonellen wirksam ist [163]. Ein weiterer Mechanismus, der das Wachstum von *S*. Tm in Makrophagen einschränkt, wird durch NRAMP1 vermittelt, das durch ein erhöhtes Ausschleusen von Eisen aus dem Phagosom den Bakterien diesen lebenswichtigen Wachstumsfaktor entzieht [164, 165]. Auch wenn die angeborene Immunantwort hoch effektiv für die Kontrolle der Bakterien in der frühen Phase der Infektion ist, reicht dies nicht für eine erfolgreiche Immunantwort gegen S. Tm aus. Hat sich Salmonella intrazellulär in der SCV manifestiert, geht die antimikrobielle Wirkung der Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems zurück [134, 166]. Für einen wirksamen Schutz gegen S. Tm ist eine adaptive Salmonella-spezifische T-Zell Antwort notwendig [167]. Vor allem CD4⁺ T-Zellen sind essentiell, um Bakterien im Gewebe vollständig zu eliminieren, während CD8⁺T-Zellen eher eine untergeordnete Rolle spielen. [167, 168]. Vermutlich handelt es sich bei dem schützenden Mechanismus der CD4⁺T-Zellen um die Produktion von IFN-y und anderer Makrophagen aktivierender Zytokine [157, 169–171]. Insbesondere CD4⁺T-Zellen des TH17 Typs scheinen eine wichtige Rolle in der anti-Salmonellen-Antwort zu spielen [134, 172]. Ihre charakteristischen Zytokine IL-17 und IL-22 sind beteiligt an der Kontrolle der lokalen Invasion durch Aktivierung und Koordination der mukosalen Immunantwort, inklusive der Chemokin- und Defensin-Expression und der Rekrutierung von Neutrophilen [92, 134]. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es auch zu einer T-Zell-unterstützten B-Zell-Aktivierung und zur Produktion von Antikörpern gegen Polysaccharid- und Lipidantigene [173]. Es gibt derzeit wenig Daten über die Interaktion von B-Zellen und Antikörpern mit S. Tm, obwohl diese Berichten zufolge vor allem beim Schutz gegen Sekundärinfektionen eine wichtige Rolle spielen [174]. Antikörper fördern die Fc-Rezeptor-vermittelte Aufnahme und die Eliminierung von extrazellulären Salmonellen und können so die Penetration von S. Tm in tiefere Gewebsschichten verhindern [174–176].

1.3 Makrophagen und Phagozytose

Makrophagen entwickeln sich aus Blutmonozyten, welche an Endothelzellen adhärieren und durch Interzellularspalten aus dem Blut ins Gewebe und in Körperhöhlen einwandern, um sich dort in langlebige, kaum vermehrende Gewebsmakrophagen umzuwandeln [101, 177]. Je nachdem in welchem Gewebe sie sesshaft werden, unterscheiden sich die Makrophagen in Morphologie, Physiologie und Funktion und besitzen unterschiedliche Namen: Während sie z.B. in der Lunge als AMO bezeichnet werden, sind es in der Peritonealhöhle Peritonealmakrophagen (PMΦ) und in der Leber Kupffer-Zellen [178]. In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits verschiedenste Funktionen von Makrophagen in der Immunabwehr erwähnt. Im Folgenden soll nun auf die Rolle der Makrophagen als professionelle Phagozyten eingegangen werden. Abgesehen von ihrer Rolle bei der Eliminierung eingedrungene Pathogene und der Auslösung der adaptiven zellulären Immunantwort, übernehmen sie wichtige Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase im Körper [178]. Sie bauen als professionelle Phagozyten tote Zellen und Zelltrümmer ab, beseitigen gealterte Erythrozyten oder töten Tumorzellen, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Im Körper ist unentwegt eine Erneuerung von Zellen notwendig, die in der Regel durch programmierten Zelltod (Apoptose) sterben. Apoptotische Zellen werden durch Makrophagen aufgenommen, abgebaut und das Material der Weiterverwertung zugeführt, ein Vorgang der als Efferozytose bezeichnet wird [179].

Wie bei der Erkennung der MAMPs, erfolgt auch die Aufnahme des körpereigenen Materials mit einer Vielzahl spezifischer oder weniger spezifischer PRRs. Dazu gehören u.a. Scavenger-Rezeptoren, Integrine und Lektine [101]. Das bedeutet, ein großer Teil des phagozytierten Materials besteht aus körpereigenem Material, dass im Gegensatz zu bakteriellen Strukturen nicht zu einer Aktivierung des Immunsystems führt [101].

Für ihre Funktion als professionelle Phagozyten brauchen Makrophagen ein effektives Endozytose-/Phagozytosesystem. Darunter versteht man die Internalisierung von Bestandteilen der Plasmamembran, extrazellulärer Moleküle, Flüssigkeiten oder Bakterien. Der Prozess kann in unterschiedliche Schritte unterteilt werden: Invagination der Plasmamembran, Abschnürung des gebildeten Vesikels und Reifung der Endosomen bzw. Phagosomen [180]. Anschließend folgt der Abbau der aufgenommenen Partikel im Lysosom. Der initiale Aufnahmemechanismus kann in Clathrin-abhängige und -unabhängige Endozytose unterteilt werden. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose zählt zu den Clathrinabhängigen Mechanismen [181]. Dagegen ist die Fc- oder Komplementrezeptor-vermittelte Phagozytose und Makropinozytose Clathrin-unabhängig [182]. Der endosomale Weg (Abbildung 4 B) soll im Folgenden kurz anhand der Endozytose über Clathrin-beschichtete Vesikel beschrieben werden.

Nach Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran kommt es zum sog. uncoating der Clathrin-Hülle [177]. Das so entstandene endozytotische Vesikel wandert entlang von Mikrotubuli ins Zellinnere wo es mit anderen Kompartimenten des endosomalen Membransystems verschmilzt [177]. Die einzelnen endozytotischen Kompartimente des endo-lysosomalen Wegs lassen sich schematisch in drei Stufen einteilen: frühe Endosomen (early endosomes), späte Endosomen (late endosomes) und Lysosomen [183]. Oft ist eine klare Trennung zwischen den einzelnen Kompartimenten aber nicht möglich, da viele Übergänge und Überlappungen zwischen den verschiedenen Stadien existieren [184]. In frühen Endosomen, einem Netzwerk aus tubulären Strukturen und Vakuolen nahe der Plasmamembran, findet bereits eine erste Sortierung des aufgenommenen Materials statt [177, 183]. Gemäß seiner Bestimmung wird das Material weitergeleitet und einige internalisierte Bestandteile von hier über das Recycling-Endosom direkt zurück zur Plasmamembran transportiert [185]. Zum Übergang zwischen den endozytotischen Kompartimenten des endo-lysosomalen Wegs existieren verschiedene Modelle. Unter anderem wird von einem kontinuierlichen Prozess der Reifung oder einem vesikulären Transport zwischen den Kompartimenten ausgegangen [186]. Das vermutlich am weitesten akzeptierte Modell ist die "kiss and run"- Hypothese, bei der Transportvesikel vom Trans-Golgi-Apparat mit reifenden Phagosomen und Endosomen vorübergehend fusionieren, Inhaltsstoffe abgeben und sich wieder abschnüren [187]. Durch Abschnürung vom späten Endosom, entstehen bei diesem Prozess multivesikuläre Körperchen, die das für den Abbau bestimmte Material dem Lysosom zuführen [188]. Diese späten Stadien unterscheiden sich von den frühen Endosomen vor allem durch ihren sauren pH-Wert [177].



Abbildung 4: Der Weg ins Lysosom: Endozytose und Autophagie

Abbildung in Anlehnung an Eskelinen und González-Gaitán [188, 189]. A) Nach Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran kommt es zum sog. *uncoating* der Clathrin-Hülle und zur Verschmelzung mit dem frühen Endosom. Gemäß seiner Bestimmung wird das Material weitergeleitet und einige internalisierte Bestandteile von hier über das Recycling-Endosom direkt zurück zur Plasmamembran transportiert. Zur Degradation bestimmtes Material gelangt über das späte Endosom und multivesikuläre Körperchen ins Lysosom. B) Das zelleigene Material gelangt durch die Formierung einer Doppelmembran ins Autophagosom. Autophagosomen durchlaufen, ähnlich wie bei der Endosomenreifung, einen Reifungsprozess zum späten Autolysosomen, bevor das Material schließlich dort abgebaut wird.

Das Substrat gelangt nicht nur über den endozytotischen Weg ins Lysosom, sondern wird auch durch Autophagie (Abbildung 4 A) aus dem Zytoplasma dorthin transportier [177, 190]. Die Autophagozytose dient, im Gegensatz zur Endozytose, dem Abbau und Wiederverwertung von zelleigenem Material [189]. Dabei formt sich eine Doppelmembran um einen Teil des Zytoplasmas oder um Zellorganellen und es entsteht ein frühes Autophagosom. Wie die Endosomen, durchläuft es einen Reifungsprozess, in dem Fusionen mit endosomalen Kompartimenten stattfinden, der auf der Stufe des Lysosoms endet [189]. Im Autolysosom wird der eingeschlossene Inhalt schließlich degradiert.

Lysosomen sind membrangebundene Kompartimente, die mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 5 deutlich saurer sind als die späten Endosomen [191]. Sie sind die wichtigsten Verdauungsorganellen der Zelle und beinhalten im Lumen mindestens 60 verschiedene Hydrolasen, wie Proteasen, Glycosidasen, lysosomale Nukleasen und Phospholipasen [177, 191]. Die Hydrolasen degradieren Proteine, Lipide und Nukleinsäuren in kleine Fragmente, die wieder über aktiven oder passiven Transport durch die lysosomale Membran ins Zytoplasma gelangen. Dort stehen sie für den Aufbau neuer Makromoleküle zur Verfügung [177]. Die meisten lysosomalen Hydrolasen werden als inaktive Vorläuferproteine hergestellt und durch eine proteolytische Spaltung im Lysosom aktiviert, um Schäden außerhalb des Verdauungskompartimentes zu vermeiden [177]. Sie sind selber gegen die lysosomalen Bedingungen resistent und ein besonders Charakteristikum ist ihr saures pH-Optimum [177, 190]. Ihre Aktivität im Lysosom wird durch die vakuoläre Adenosintriphosphatase (v- ATPase) gewährleistet, eine Protonenpumpe die den intralysosomalen pH-Werte konstant hält [177]. Der niedrige pH-Wert hilft zudem bei der Denaturieung von Proteinen, die im sauren pH-Bereich für den Abbau zugänglicher sind [177]. Im Folgenden soll auf die Phospholipasen, als eine wichtige Gruppe der Hydrolasen im Lysosom, eingegangen werden.

1.4 Phospholipasen

Phospholipasen sind eine ubiquitär vorkommende Klasse von Enzymen, die die Spaltung von 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospholipide (im folgenden "Phospholipid" genannt) in Fettsäuren und Lysophospholipide katalysieren [192]. Ihre Klassifizierung in vier Gruppen erfolgt anhand der Lage ihrer Schnittstellen in Phospholipiden, die in Abbildung 5 veranschaulicht werden. Phospholipase A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂) und B (PLB) sind Acylhydrolasen, die spezifisch die Esterbindung zwischen Fettsäureresten und dem Glycerin-Rückgrat abspalten. Dabei greift die PLA₁ an der sn-1-Position und die PLA₂ an der sn-2-Position an, was die Freisetzung von freien Fettsäuren sowie einem lyso-Glycerophospholipid zur Folge hat [193]. Die PLB vereint beide PLA-Aktivitäten zu einer Lysophospholipase-Aktivität, wodurch beide Fettsäureketten abgespalten werden. Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD) gehören zu der Gruppe der Phosphodiesterasen und spalten das Phospholipid in der hydrophilen Kopfgruppe vor oder hinter dem Phosphatrest [193]. Die Superfamilie der Phospholipasen A₂ wird weiter auf Basis ihrer katalytischen Mechanismen (His/Asp, Ser/Asp oder Ser/His/Asp Hydrolasen) sowie funktionellen und strukturellen Eigenschaften in fünf Gruppen unterteilt. Man unterscheidet die sekretierte PLA₂ (sPLA₂), die zytosolische PLA₂ (cPLA₂), die Kalzium unabhängigen PLA₂ (*"independent"* iPLA₂), die *platelet-activating factor* Acetylhydrolase (PAF-AH) und die lysosomale Phospholipase A₂ (LPLA₂) [194].

Wasserlösliche Enzyme die hydrophobe Lipidsubstrate in Phospholipidmembranen spalten, unterscheiden sich in ihrer Kinetik von Enzymen die lösliche Substrate hydrolysieren, denn ihr Substrat liegt als Aggregat in wässriger Phase vor (z. B. Mizelle, Lipiddoppelschicht) und bildet eine hydrophil-hydrophobe Grenzfläche. So wird die katalytische Aktivität der Phospholipasen durch eine Kombination aus Affinität zu der Lipiddoppelschicht und der Spezifität der katalytischen Spaltung (Substratumsatz) bestimmt [195]. Ein Merkmal aller Phospholipasen ist dabei, dass die Bindung an Membranen zu einer Aktivitätssteigerung der Enzyme führen kann, der so genannten Grenzflächenaktivierung [192, 195].





PLA₁ und PLA₂, sowie PLB sind Acylhydrolasen, welche die Esterbindung zwischen Glycerin-Rückgrad (hier orange unterlegt) und Acylresten spalten. PLC und PLD hydrolysieren als Phosphodiesterasen die Bindungen am Phosphatrest.

Phospholipasen haben ein breites Funktionsspektrum, von rein katabolischen Vorgängen über regulatorische Prozesse bis hin zum Abbau von Phospholipiden, die den größten Teil der Lipide in biologischen Membranen ausmachen [193, 196]. Enzyme der Phospholipase A₂ Familie können beispielsweise kleinere bioaktive Moleküle generieren, wie z.B. Arachidonsäure [197, 198], welche als Vorläufer für die Biosynthese der sog. Eikosanoide dienen. Diese sind als Lipidmediatoren wiederum an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt [196]. Einer dieser Lipidmediatoren ist das Prostaglandin E2 (PGE2), das durch Cyclooxygenasen (konstitutiv aktive COX1 und induzierbares COX2) und Prostaglandinsynthasen aus Arachidonsäure hergestellt wird. PGE2 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation, Aktivierung, Reifung, Migration und Zytokinproduktion verschiedener Immunzellen wie Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen und DZs [197]. Der Abbau von endogenen und exogenen Membranen sowie die Degradation von Fremdmembranen wird, wie bereits erwähnt, im Lysosom durch lysosomale Hydrolasen bewerkstelligt. Erst vor wenigen Jahren wurde mit der lysosomalen Phospholipase A₂ (LPLA₂) ein Enzym identifiziert, das für den Abbau der Membranen verantwortlich ist [193, 199].

1.4.1 Lysosomale Phospholipase A₂

Die ersten Berichte einer Kalzium-unabhängigen Phospholipase-Aktivität mit saurem pH-Optimum in der löslichen Fraktion von Rattenleber-Lysosomen stammen aus den Jahren 1967 [200]. In den darauffolgenden Jahren folgten ähnliche Berichte anderer Gruppen [201– 203] bei denen die Aktivität lysosomaler Phospholipasen in weiteren Geweben und Zelltypen nachgewiesen wurden, wie z.B. in Präparationen des Herzmuskels [204], AM Φ von Kaninchen [205], arterieller glatter Muskulatur [206], Ratten-Testes [207] und dem Kortex von Rattennieren [208]. 1996 wurde dann eine neue lysosomale Phospholipase A₂ (LPLA₂) mit saurem pH-Optimum im Rinderhirn beschrieben, die anfänglich über die Transacylierung des N-Acetylsphingosin an der 1-Hydroxylgruppe der sn-2 Fettsäurekette von Phosphatidylcholin charakterisiert und nach ihrem Produkt 1-O-Acylceramid (1-O-Acyl-N-Acetylsphingosin) als 1-O-Acylceramidsynthase (ACS) benannt wurde [199]. Wenig später beschrieb Hiraoka et al. (2002), dass durch dieses Kalzium-unabhängige Enzym die hydrolysierte Acylgruppe entweder auf ein Ceramid oder auf Wasser übertragen werden kann, wodurch 1-O-Acylceramid (Transacetylase-Aktivität) bzw. eine freie Fettsäure (PLA₂-Aktivität) entsteht. Nach Aufreinigung, Klonierung und Sequenzierung erfolgte eine nähere Charakterisierung, an dessen Ende die dominante Phospholipase A₂ Aktivität namensgebend für diese neue lysosomale Phospholipase A₂ (LPLA₂) oder auch Gruppe XV Phospholipase A₂ wurde [209, 210].

Bei der LPLA₂ handelt es sich um ein lösliches und Mannose-reiches monomeres Glycoprotein, bestehend aus einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 45 kDa [199, 210]. Bei der Synthese wird das Enzym post-translational durch die Abspaltung eines Signalpeptids und einer N-Glykolysierung modifiziert [210]. Die bevorzugten Substrate der LPLA₂ sind Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC), zwei häufige Membranphospholipide, sowie Phosphatidylserin (PS), welches als Abbausignal auf apoptotischen Zellen vorkommt [210]. Die höchste Expression der ubiquitär vorkommenden LPLA₂ wurde bisher in Gewebsmakrophagen [211, 212] und insbesondere in AMØ gefunden [213]. Neben der lytischen Funktion des Abbaukompartiments gibt es auch sekretorische Lysosomen die Hydrolasen nach spezifischer Stimulation sekretieren. Auch die LPLA₂ kann von Makrophagen sezerniert werden; Ihr Nachweis gelang in murinem und humanem dem Kammerwasser von Schweineaugen Blutplasma [214] sowie [215]. Die Wiederaufnahme in die Zelle erfolgt über den Mannose-Rezeptor, wonach das Enzym zurück in die Lysosomen transportiert wird und seine volle hydrolytische Wirkung wiedererlangt [216]. Durch eine geringere aber dennoch verbleibende Enzymaktivität der LPLA₂ auch bei dem neutralem pH Wert [209], wie er außerhalb der Zelle besteht, ist nicht auszuschließen, dass das Enzym ebenfalls extrazellulär aktiv ist. Auch wenn dieses Phänomen der Sekretion lysosomaler Hydrolasen mehrfach beschrieben wurde, ist sein biologischer und physiologischer Zweck bisher unbekannt [193].

Das *Lpla*₂-Gen konnte erfolgreich aus Rind, Maus und Mensch kloniert und anschließend eine hoch konservierte Primärstruktur zwischen diesen Spezies abgeleitet werden. Das Gen besteht aus 6 Exons, wovon das fünfte für die katalytische Domäne mit dem Lipase Motiv und einem konservierten und essentiellen Serin kodiert [210]. Durch die Deletion des Exon 5 wurde vor wenigen Jahren eine LPLA₂-/- (LPLA₂-KO) Maus hergestellt [212]. Sie zeigte einen systemischen Verlust der LPLA₂-Aktivität bei einer normalen Lebenserwartung und keiner Vitalitätseinschränkung. Ein milder Phänotyp mit erhöhter Gewichtszunahme entwickelt sich im Alter von 3 Monaten. Aufgrund des eingeschränkten Phospholipidabbaus kommt es in diesem Alter zu einer Akkumulation von Phospholipiden im Lysosom von Makrophagen [212]. Durch die Anreicherung der Phospholipide werden Gewebsmakrophagen größer und zeigen zahlreiche Einschlusskörperchen, was dem Phänotyp einer lysosomalen Lipidspeicherkrankheit entspricht [212, 216–218]. Die Anreicherung von Membranen können

elektronen- oder fluoreszenzmikroskopisch (anhand der Autofluoreszenz) oder durch Anfärbung mit Nilrot visualisiert werden (Abbildung 6). Eine erhöhte Konzentration an Phospholipiden in bronchoalveolären Lavagen und AM Φ in einjährigen LPLA₂-^{/-} Mäusen in Ergänzung zu dem hohen LPLA₂-Expressionslevel in diesen Makrophagen sind Hinweise auf eine Rolle des Enzyms bei dem Abbau von Surfactant in der Lunge [212, 213]. In diesem Alter entwickelten die LPLA₂ defizienten Tiere zudem vergrößerte lymphatische Organe, Glomerulonephritis sowie eine abnorme Serologie mit einem erhöhten Level an Auto-Antikörpern gegen doppelsträngige DNA. Diese Symptome einer Autoimmunreaktion können eine Folge des gehemmten Lipidabbaus sein [193].



Abbildung 6: Akkumulation von Phospholipiden in Gewebsmakrophagen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus einer Arbeit von Hiraoka et al. [212] von Alveolarmakrophagen (A und B) sowei Peritonealmakrophagen (E und F) aus 3-Monate alten $LPLA_2^{+/+}$ (A und E) und $LPLA_2^{-/-}$ (B und F) Mäusen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Nilrot gefärbten Alveolarmakrophagen (C und D) und Peritonealmakrophagen (G und H) aus 3-Monate alten $LPLA_2^{+/+}$ (C und G) und $LPLA_2^{-/-}$ (D und H) Mäusen. Die Fluoreszenzbilder wurden von Dr. Bianca Schneider (Forschungszentrum Borstel) aufgenommen (Schneider et al. in Vorbereitung). (A,C,E und G) LPLA_2^{+/+} Makrophagen; (B,D,F und H) LPLA_2^{-/-} Makrophagen.

LPLA₂^{-/-} Makrophagen zeigen am Beispiel nicht-pathogener *Escherichia coli* Bakterien einen erheblichen Defekt im Abbau intrazellulärer Bakterien (Schneider et al. in Vorbereitung) und apoptotischer Vesikel (James Shayman, persönliche Mitteilung). Schneider et al. konnten zudem einen Einfluss von LPLA₂ Defizienz auf den Verlauf der Wirtsantwort gegen intrazelluläre Bakterien zeigen. Die adaptive Immunantwort gegen den Tuberkuloseereger *M. tuberculosis* ist in LPLA₂^{-/-} Mäuse beeinträchtigt durch eine eingeschränkte Aktivierung spezifischer T-Zellen in den mediastinalen Lymphknoten und der Lunge [219]. Dies hatte eine deutliche Reduzierung der, normalerweise schützenden, IFN-γ dominierten TH-1 Immunantwort zur Folge und damit einhergehend eine Erhöhung der Bakterienlast im Gewebe [219]. Auf der zellulären Ebene sind Makrophagen aus LPLA₂^{-/-} Mäusen *in vitro* eingeschränkt in ihrer Fähigkeit antigenspezifische CD4⁺T-Zellen zu aktivieren (Schneider et al. in Vorbereitung). Dies lässt auf einen Defekt in der Antigen-Präsentation und damit in der

Induktion einer adaptiven T-Zell-Antwort gegen den intrazellulären Erreger schließen. Die molekularen Mechanismen der aufgrund der fehlenden LPLA₂ beeinträchtigten T-Zell-Aktivierung sind bisher nicht bekannt. Jedoch lassen diese Untersuchungen vermuten, dass auch andere Effektormechanismen von Makrophagen eingeschränkt und somit auch Auswirkungen auf die angeborene Immunantwort gegen intra- und extrazelluläre Pathogene denkbar sind.

1.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Rolle der lysosomalen Phospholipase A₂ in der Immunantwort gegen *Streptococcus pneumoniae* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium im Mausmodell untersucht werden. Bei der LPLA₂ handelt es sich um ein hydrolytisches Enzym, das vor allem bei der Phospholipidhomöostase der Zelle und dem Abbau des Surfactant in der Lunge eine wichtige Rolle spielt. Ein veränderter Surfactant-Abbau kann Einfluss auf die Bedingungen für extrazelluläre Krankheitserreger der Lunge haben. In Verbindung mit der potenziellen LPLA₂ Aktivität auch außerhalb der Zelle stellt sich die Frage, welche direkte oder indirekte Rolle die LPLA₂ in Infektionen mit extrazellulären Lungenpathogenen besitzt. Bisher konnte in Untersuchungen LPLA₂-defizienter Mäuse in der Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Lungenerreger *M. tuberculosis* eine erhöhte Bakterienlast einhergehend mit einer geminderten Aktivierung Antigen-spezifischer TH1-Zellen nachgewiesen werden. Bislang nicht untersucht wurde jedoch der Einfluss der LPLA₂ in akuten Infektionsmodellen, die vor allem die angeborene Immunität abbilden. Auch ihre Funktion in der Immunantwort außerhalb des Atmungstraktes ist bis jetzt unbekannt.

Die LPLA₂ wird vor allem in Gewebsmakrophagen exprimiert, in denen es ohne dieses Enzym zu einer Akkumulation von Phospholipidmembranen in Lysosomen kommt. Dadurch entstehen charakteristische Einschlusskörperchen, die ein wesentliches Merkmal einer zellulären Phospholipidose darstellen. Auf dieser Beobachtung begründet sich unsere Hypothese, dass die Akkumulation der Phospholipide in Gewebsmakrophagen die Effektorfunktionen dieser angeborenen Immunzellen beeinträchtigen könnte. Die Auswirkung einer LPLA₂-Defizienz auf die angeborene Immunantwort durch veränderte Effektorfunktionen der Makrophagen, die sowohl bei extrazellulären als auch bei intrazellulären Erregern eine wichtige Rolle spielen, ist bislang nicht geklärt.

Aus diesem Grund soll, unter Verwendung von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen in unterschiedlichen akuten Infektionsmodellen, die Frage beantwortet werden welche Rolle die LPLA2 in der Wirtsantwort gegen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und *Streptococcus pneumoniae* spielt. Das Modell der Pneumokokken-induzierten Pneumonie soll klären, welche Auswirkungen das Fehlen der funktionellen LPLA2 auf die angeborene Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger hat. Darüber hinaus soll die Untersuchung des Salmonellen-induzierten Typhus und der Gastroenteritis einen Einblick in den Einfluss der LPLA2 in akute, systemischen sowie lokalen Darmerkrankungen geben, um schließlich die

Konsequenzen der Defizienz auf Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort näher zu charakterisieren.

Folgende Ziele wurden für die vorliegende Arbeit definiert:

- 1. Vergleich der Infektion mit *S. pneumoniae* und *S.* Tm in Mäusen ohne LPLA₂.
- 2. Die Untersuchung der Immunantwort in der Maus gegen Salmonellen und Pneumokokken in Abwesenheit der LPLA₂.
- 3. Die Untersuchung von LPLA2^{-/-} Makrophagen als Effektorzellen gegen extrazelluläre Gram-positive Pneumokokken bzw. fakultativ intrazelluläre Gram-negative Salmonellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- Albumin Fraktion V, Protease frei (BSA) (Serva)
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl) (Roth)
- Aqua B. Braun (B. Braun)
- Aqua destillata (A. dest) (Deionisierungsanlage, Forschungszentrum Borstel (FZB))
- Collagenase/Dispase (Roche)
- Confocal-Matrix[®] (Micro-Tech-Lab)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) (Life Technologies)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) (Sigma-Aldrich)
- Distilled Water DNase/RNase frei (Invitrogen)
- DMEM (mit Natriumpyruvat) (Biochrom)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth)
- Entellan (Merck)
- Eosin G (Roth)
- Essigsäure (Roth)
- Ethanol (Merck)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich)
- Fötales Kälberserum (FCS) (Biochrom)
- Gentamycin Stocklösung (PAA)
- Glycerin (Sigma-Aldrich)
- Saure Hämalauenlösung nach Mayer (Roth)
- Hamster-Serum (Jackson Immuno Research)
- Hefe-Extrakt (Roth)
- HEPES (Sigma-Aldrich)
- Ionomycin (Sigma-Aldrich)
- Isofluran (Delta Select)
- Kaliumchlorid (KCl) (Roth)
- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃) (Sigma-Aldrich)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich)
- Kanamycin (Calbiochem)
- Ketamin 10 % (WDT)
- LB-Agar (Roth)
- LB-Medium (Roth)
- L-Glutamin (PAN Biotech)

- Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) hergestellt in einer L929-CFS Zellinie
- Maus-Serum (PAA)
- Natriumazid (NaN₃) (Merck)
- Natriumchlorid (NaCl) (Roth)
- Natriumcitrat (C₆H₅Na₃O₇) (Merck)
- Paraffin, Paraplast[®] Embedding Media (McCormick Scientific)
- Paraformaldehyd (PFA) (Roth)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Biochrom)
- Penicillin (Sigma)
- Pferde-Serum (PAA)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich)
- Proteaseinhibitor complete, EDTA frei (Roche)
- Ratten-Serum (PAA)
- RNALater[®] (Life Technologies)
- Rompun 2% (Bayer Health Care)
- Saponin (Calbiochem)
- Schwefelsäure (Fluka)
- Streptomycin (Sigma-Aldrich)
- Todd-Hewitt Medium (Roth)
- Triton-x100 (Roth)
- Trypanblau (Roth)
- Trypticase-Soja-Agar (BD)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich)
- Xylol (Merck)
- Ziegen-Serum (PAN)

2.1.2 Medien und Platten

LB-Medium (Roth) wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Todd Hewitt Yeast-Medium: Todd Hewitt Komplettmedium (Roth) wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und supplementiert mit 0,5 % Hefe-Extrakt

DMEM-komplett Medium: DMEM (Biochrom) supplementiert mit 1 % L-Glutamin, 10 % FCS

BMMΦ-Medium: DMEM (Biochrom) supplementiert mit 1 % L-Glutamin, 10 % FCS, 5 % Pferdeserum, 20 % L-Zell Überstand mit enthaltenem MCSF1 (*Macrophage colony stimulating factor*)

Einfriermedium: BMM Φ -Medium supplementiert mit 20 % FCS und 10 % DMSO

Waschmedium: DMEM (Biochrom) supplementiert mit 5 % FCS
2.1.3 Lösungen und Puffer

- 4 % Paraformaldehyde (PFA) in PBS; pH 7,4
- Blockierungspuffer f
 ür Immunhistologie: 0,1 % Triton x 100, 0,05 % Tween 20, 1 % BSA, 2
 % Ziegenserum in PBS
- Citrat-Puffer: 10 mM Natriumcitrat, 0,05 % Tween 20 in A. dest, pH 6,0
- Eosinlösung: 1 % Eosin in A. dest; filtriert und mit 2-3 Tropfen Eisessig angesäuert
- Erythrozyten-Lysepuffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA in H₂O
- FACS-Puffer: 3 % FCS, 0,1 % NaN₃ in PBS
- Färbepuffer für Immunhistologie: 0,1 % Triton x 100, 0,05 % Tween20 in PBS
- Fc-Blockierungslösung: 1 % Ratten-Serum, 1 % Maus-Serum, 1 % Hamster-Serum, 1 % anti CD16/32 Antikörper)
- HEPES Puffer: 100 mM HEPES in H_2O pH 8.0
- PBS: 2,68 mM KCL, 1,47 mM KH₂PO₄, 36,89 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ in A. dest
- PBST: 0,05 % Tween 20 in PBS
- Lysepuffer für Überlebens-Test: PBS, 0,5 % Triton x 100 (sterilfiltriert)

2.1.4 Kits

- BD[™] CBA flex set's für IFN-γ (A4), KC (A9), MCP-1 (B7), IL-10 (C4), IL-17A (C5), MIP-1α (C7) und TNF-α (C8) (BD)
- LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche)
- LIVE/DEAD[®] Fixable Blue Dead Cell Stain Kit *for UV excitation (Invitrogen)
- Maxima[®] First Strand cDNA Kit for quantitative real-Time PCR (Thermo Scientific)
- Mouse Myeloperoxidase DuoSet (R&D)
- mouse/rat soluble master buffer kit (BD)
- RNeasy[®] plus Mini Kit (Quiagen)
- RNase freie DNase (Quiagen)

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Insofern nicht anders angegeben, wurden alle während dieser Arbeit verwendeten Kunststoffartikel von Greiner Bio-One erworben.

- Deckgläschen \$10mm Thermo Fischer Scientific)
- Impfösen (Sarstedt)
- Kanülen (BD)
- Petrischalen (Sarstedt)
- PTFE Schlauch (VWR)
- Serumseparationsröhrchen Microtainer[®] SST (BD)
- Spritzen (BD)
- SuperFrost[®]Plus Objektträger (Thermo Fischer Scientific)

- Wattestäbchen (Böttger)
- Zellsiebe 100 μm, 70 μm (BD)
- 96-Well Platten (Costar[®])

2.1.6 Geräte

- Autotechnikon STP120 (Thermo Fischer Scientific)
- Dampfgarer (Tefal)
- FACSArray[™] (BD)
- FACS-LSR™II (BD)
- Lab Cycler (SensoQuest)
- Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP5 (Leica)
- Inkubationsschüttler MaxQ 6000 (Thermo Fischer Scientific)
- IVIS[®] Kinetic (Caliper Life Science)
- Kühlzentrifuge Heraeus Multifuge 3SR Plus (Thermo Fischer Scientific)
- Kühlzentrifuge Heraeus Freco21 (Thermo Fischer Scientific)
- Lichtmikroskop Olympus BX41 (Olympus)
- LightCycler[®] 480 II (Roche)
- Mehrkanalpipette 10 μl Research[®] Plus (Eppendorf)
- Mehrkanalpipetten Finnpipette[®] (50 μl und 300 μl) (Thermo Fischer Scientific)
- Mikrotom RM215RT (LEICA)
- Multi Reax (Heidolph Instruments)
- NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific)
- Nalgene[®] Mr. Frosty (Sigma-Aldrich)
- Neubauerzählkammer (Marienfeld-superior)
- Paraffingießstation LEICA EG1140c (LEICA)
- Paraffin-Streckbad 1052 (GFL)
- Photometer 6320D (Jenway)
- Pipetten-Satz Finnpipette[®] (10 μl, 100 μl und 1000 μl) (Thermo Fischer Scientific)
- Rostfreie Stahlperlen 5 mm (Qiagen)
- Scepter[™] Automated Cell Counter (Millipore)
- Shandonkammer (Thermo Scientific)
- Sterilwerkbank MSC-Advantage[™] Class II (Thermo Fischer Scientific)
- Sunrise Reader (Tecan)
- TissueLyser II (Qiagen)
- Vortexer VTX-3000L Mixer Uzusio (Harmony)
- Wasserbad GFL1052 (GFL)
- XGI-8 Gas Anesthesia System (Xenogen Corporation)

2.1.7 Software

- FACSArray[™] System Software (Version 1.0.3, BD)
- FCS Filter[™] v1.0.4 (Soft Flow. Inc.)
- FCAP Array[™] v1.0.1 (Soft Flow. Inc.)
- FACSDiva[™] (Version 6.0, BD)
- FCS Express 4 Flow Cytometry (Version 4.07.0003, DeNovo[™] Software).
- GraphPad Prism[®], Version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA)
- LightCycler[®]480 Software 1.5.0 SP4 (Version 1.5.0.39, Roche)
- Living Image 3.2 (Version 3.2.0.8156, Caliper Life Science)
- LAS AF (Version 2.7.3.9723, Leica Microsystems)
- Magellan V7.0 (Tecan)

2.1.8 Bakterienstämme

Spezies + Serovar	Stamm	Genotyp	Antibiotika- Resistenz	Herkunft
S. Tm	SL1344	Wildtyp	Streptomycin	Prof. Dr. Grassl [89]
<i>S.</i> Tm	SL1344	ΔaroA	Streptomycin	Prof. Dr. Grassl [89]
S. pneumoniae	D39	Δсар	Kanamycin	Pearce et al. 2002 [220]
S. pneumoniae	A66.1	A66.1 XEN10	Kanamycin	Francis et al. 2001 [221]

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

2.1.9 Mausstämme

Die für diese Arbeit verwendeten Versuchstiere der Stämme C57BL/6J (WT) und LPLA₂-^{/-} (LPLA₂-KO) wurden in der Tierhaltung des FZB unter spezifischen pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet. Der LPLA₂-^{/-} Mausstamm wurde auf dem Hintergrund des C57BL/6J Stammes hergestellt und trägt homozygot eine Deletion des Exon 5 des Lpla₂ Gens [212]. Infizierte Tiere wurden in separat belüfteten und mit speziellen Filtern ausgestatteten Käfigen (IVC-Käfige) im biologischen Sicherheitslabor der Schutzstufe 2 des FZB gehalten. Die Tierversuchsvorhaben zu den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V 312-72241.123-3 (98-8/11) und V 312-72241.123-3 (59-4/12) genehmigt. Für alle tierexperimentellen Arbeiten wurden mindestens 12 Wochen alte C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Mäuse beider Geschlechter verwendet. Nach dieser Zeit war der Phänotyp einer Phospholipidose, mit der Akkumulation von Phospholipiden in Makrophagen, vollständig entwickelt [212].

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologisches Arbeiten

2.2.1.1 Kultivierung von Salmonella enterica serovar Typhimurium

S. Tm wurde in LB-Medium mit Streptomycin bei 37 °C unter schütteln über Nacht (ÜN) bis zur stationären Phase angezogen. Für die Bestimmung der Keimlast oder um Bakterienkolonien zu vereinzeln, wurden sie auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und bei 37 °C ÜN angezogen.

Für die Langzeitlagerung wurde zu ÜN-Kulturen 20 % Glycerin zugegeben und diese bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 Kultivierung von Streptococcus pneumoniae

S. pneumoniae wurden in Todd-Hewitt Medium mit 0,5 % Hefe (THY) mit 10 % FCS und mit Kanamycin oder auf Trypticase-Soja-Agar mit 5 % Schafsblut (BD) (TSA) kultiviert. Für die Herstellung einer Bakterienkultur wurden die Bakterien auf einer TSA-platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und für 8 bis 11 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien mit Hilfe einer Impföse auf eine TSA-Platte mit entsprechendem Antibiotikum übertragen. Nach weiteren 9 bis 10 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Bakterien dann mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens in THY-Medium mit 10 % FCS überführt und die Kultur so auf eine OD₆₀₀ von 0,06 bis 0,08 eingestellt. Anschließend wurde die Kultur bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, bis sie einen OD₆₀₀-Wert von 0,35 bis 0,4 erreichte. Die Einhaltung dieser Zeiten war aufgrund der autolytischen Eigenschaften von *S. pneumoniae* notwendig. Für die Langzeitlagerung wurden die Bakterien einer TSA-Platte mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens in 1 ml THY-Medium mit 20 % Glycerinanteil überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2 Zellbiologische Arbeiten

2.2.2.1 Herstellung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen

Primäre Knochenmarksmakrophagen (BMM Φ) wurden aus dem Knochenmark von naiven C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Mäusen gewonnen. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Oberschenkel- und Schienbeinknochen präpariert. Die Knochenmarkszellen wurden mit ca. 20 ml DMEM mit einer 25G Kanüle ausgespült und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das Knochenmark wurde bei 500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) und 4 °C zentrifugiert, das Sediment in 10 ml BMM Φ -Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Es wurden ca. 1x10⁷ Knochenmarkszellen in BMM Φ -Medium pro Petrischalen ausgesät und zur Ausdifferenzierung für 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Zugabe von frischem

BMMΦ-Medium wurden die Zellen weitere zwei bis drei Tage kultiviert und anschließend für die Langzeitlagerung eingefroren. Hierfür wurde das Medium durch eiskaltes PBS ersetzt und die Zellen für 30 Min bei 4 °C darin inkubiert. Dies fördert das Lösen der BMMΦ vom Schalenboden und erleichtert das Abschaben mit einem Zellschaber (Sarstedt). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 500 x g) sedimentiert, in Einfriermedium aufgenommen und langsam bei -80 °C im Nalgene[®] Mr. Frosty (Sigma-Aldrich) eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.2 Gewinnung von Peritonealmakrophagen

Für die Gewinnung von Makrophagen aus dem Peritoneum naiver C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen wurden die Tiere durch überdosierte CO₂-Narkose getötet und das Fell ventral von der Bauchdecke entfernt. Anschließend wurden 5 ml PBS mittels Spritze und stumpfer 18G Kanüle durch die Bauchdecke in die Peritonealhöhle injiziert, das Peritoneum massiert und die Flüssigkeit wieder aus der Bauchhöhle abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dreifach wiederholt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) bei 4 °C wurden die Zellen in 1 ml kaltem DMEM_{komp.} resuspendiert. Die Anzahl der Peritonealzellen wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt, wobei tote Zellen durch Trypanblau-Färbung (Roth) ausgeschlossen wurden. Anschließend wurden jeweils 3 x 10⁵ Peritonealzellen in 200 μl pro Vertiefung einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte (Costar[®]) bzw. 9 x 10⁵ in 1 ml pro Deckgläschen in einer 24-well-Flachboden-Mikrotiterplatte verteilt. Diese Zellzahl wurde aufgrund der Erfahrung verwendet, dass es sich nur bei ca. 1/3 der Zellen um PMΦ handelt. Die Zellen adhärierten bei einer Inkubation ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂. Durch dreimaliges Waschen mit warmen DMEM_{komp.} wurden nicht-adhärente Zellen entfernt.

2.2.2.3 Überleben von S. pneumoniae in Makrophagen

Die peritonealen Zellen aus C57BL/6J sowie LPLA₂^{-/-} Tieren wurden isoliert (siehe 2.2.2.2) und ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In Rekonstitutionsversuchen wurde 12 Stunden vor Versuchsbeginn zu einem Teil der PM Φ aus LPLA₂^{-/-} Tieren 10 µg/ml rekombinante LPLA₂ zugegeben. Der *S. pneumoniae*-Stamm D39 Δ *cap* wurde wie in 2.2.1.2 beschrieben angezogen. Die Bakterien-Kultur wurde 5 Min bei 3500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert und das Sediment in 1 ml DMEM_{komp.} aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde mittels photometrischer Messung (OD₆₀₀) bestimmt und die Bakterien mit einer *multiplicity of infektion* (MOI) von 25 zu den Zellen gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation (4 min, 500 x g) erfolgte die Infektion der Zellen für 30 Min bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien mit Penicillin (50 µg/ml) und Gentamycin (1 µg/ml) in DMEM_{komp.} abgetötet und die Zellen weiter bis zur Ernte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 10, 30, 60, 90, 120 bzw. 240 Minuten wurden die Zellen für die Ernte dreimal mit DMEM_{komp.} gewaschen und anschließend mit 1 % Saponin in 100 µl DMEM_{komp.} bei 37 °C für 10 Min lysiert. Mit dem Zelllysat wurde eine 1:10Verdünnungsreihen angefertigt und jeweils 100 μ l davon auf TSA-Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubation ÜN bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Kolonien zur Bestimmung der *colony forming units* (CFU) ausgezählt. Alternativ wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen wie oben beschrieben infiziert und nach 10 und 240 Minuten mit 4 % PFA für 10 Minuten fixiert. Die Lagerung bis zu immunologischen Färbung erfolgte bei 4 °C in PBS.

2.2.2.4 Vermehrung von S. Tm in Makrophagen

Für die Analysen in BMMO wurde der Wildtyp (WT)-Salmonellen-Stamm SL1344 verwendet. Da peritoneale Makrophagen empfindlicher auf diesen virulenten Stamm reagierten und schon nach wenigen Stunden an Viabilität verloren, wurden die Infektion der PMO mit dem attenuierten Salmonellen Stamm SL1344*DaroA* durchgeführt. SL1344*DaroA* kann keine aromatischen Aminosäuren bilden und ist somit in seinem Wachstum und seiner Virulenz beeinträchtigt [222, 223], was die Lebensdauer der PMФ im Versuch verlängerte. Die BMMΦ bzw. PMΦ aus C57BL/6J bzw. LPLA₂-^{/-} Tieren wurde wie in 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben isoliert und der entsprechende S. Tm Stamm angezogen (siehe 2.2.1.1). Die Bakterienkultur wurde 5 Min bei 3500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert und das Sediment in 1 ml DMEMkomp. aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde mittels photometrischer Messung (OD₆₀₀) bestimmt und die S. Tm in einer MOI von 5 zu den Zellen gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation (4 min, 500 x g) erfolgte die Infektion der Zellen für 30 Min bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Abtötung extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen für 30 Min mit Gentamycin (100 μ g/ml) in DMEM_{komp.} bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit DMEMkomp, wurde das Medium anschließend mit 10 µg/ml Gentamycin ersetzt, um DMEM_{komp.} durch das extrazelluläre Bakterienwachstum zu hemmen. Die Ernte erfolgte nach 1, 4, 9, 24, 48 und 72 Stunden, wobei die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und anschließend mit 100 µl Lysepuffer lysiert wurden. Mit dem Lysat wurde eine 1:10-Verdünnungsreihe angefertigt und jeweils 100 µl auf LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach 24 Stunden bei 37°C wurden die Kolonien zur Bestimmung der CFU ausgezählt.

2.2.3 Tierexperimentelles Arbeiten

2.2.3.1 Streptococcus pneumoniae induziertes Pneumonie Modell

2.2.3.1.1 Intranasale Infektion

Für die intranasale Infektion der Mäuse wurde der Pneumokokken Stamm A66.1 XEN10, wie in 2.2.1.2 beschrieben, angezogen. Die Kultur wurde 10 Min bei 3500 x g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) und das Sediment in 1 ml PBS (0,5 % FCS) resuspendiert. Die Bakterienzahl wurde mittels photometrischer Messung (OD₆₀₀) bestimmt. Die Infektion der Tiere erfolgte unter Narkose mit Ketamin/Rompun (100 mg/kg / 10 mg/kg). Hierfür wurden 20 µl Bakteriensuspension mit ca. $5x10^6$ Bakterien in die Nasenlöcher der narkotisierten Mäuse geträufelt, welche dann mit der Atmung inhaliert wurden. Die Infektionsdosis wurde anschließend anhand einer 1:10-Verdünnunsgreihe des Inokulums (siehe 2.2.2.3) überprüft. Die Tiere wurden nach der Infektion täglich 1 bis 2 Mal begutachtet und ihr Wohlergehen nach einem Bewertungssystem (siehe Anhang 1) beurteilt. Erreichten die Tiere eine durchschnittliche Bewertung von 3,5, wurden sie tierschutzgerecht getötet.

2.2.3.1.2 Visualisierung der Bakterienlast im IVIS® Spectrum Imaging System

Die Verwendung des IVIS[®] Kinetic (Caliper Life Science) zur Echtzeitmessung der Ausbreitung von biolumineszierenden Bakterien im Wirt sollte die Verfolgung des Infektionsverlaufes erleichtern und eine genauere Darstellung der Lokalisation von Pneumokokken im Wirt bei ein und demselben Tier zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglichen. Für diese Verbreitungsanalyse der biolumineszierenden Pneumokokken mit einem nicht invasiven bildgebenden Verfahren wurden die infizierten Tiere (siehe 2.2.3.1.1) schonend mit Isofluoran betäubt (gasförmig, in Sauerstoff verdünnt; Gasfluss 0,25 Liter/Minute für 5 Tiere; Dosis: 5 % zum Einschlafen, 3 % während der Bildgebung) und anschließend die Lumineszenz für 5 Minuten im IVIS[®] Kinetic detektiert.

2.2.3.1.3 Organentnahme im Pneumonie-Modell

Zur Analyse wurden infizierte Mäuse mittels überdosierter CO₂ Narkose nach 1, 2 oder 3 Tagen getötet. Nach Öffnen der Bauchdecke und des Brustraumes wurde das Blut mittels einer Spritze und 26G Kanüle (BD) aus dem Herzen entnommen und der Blutkreislauf mit 20 ml PBS perfundiert. Das Blut wurde umgehend 1:2 mit PBS (0,5 % FCS) verdünnt und für die Bestimmung der Keimlast (siehe unten) verarbeitet. Anschließend wurde die Haut und die Schilddrüse über der Trachea entfernt und diese durch das Anheben mit einer Pipettenspitze exponiert. Mit einer Schere wurde ein kleines Loch mittig der Trachea platziert, um mittels Schlauch und einer 25G Kanüle die Nasenhöhle mit 1 ml PBS (0,5 % FCS) zu spülen. Die Flüssigkeit wurde mit Hilfe einer Pipette von der Nase abgenommen. Für die Bronchoalveolarlavage wurde der Schlauch mit Orientierung in Richtung Lunge erneut in die Trachea eingeführt, um diese ebenfalls mit 1 ml PBS (0,5 % FCS) zu spülen. Nach erfolgter Lavage wurde die Lunge entnommen und ein Teilstück für histologische Untersuchungen in 4 % Paraformaldehyde (PFA) für 24 Stunden fixiert. Der Rest der Lunge wurde für die Bestimmung der Keimlast in 1 ml PBS (0,5 % FCS) mit Hilfe eines 100 µl Zellsiebes und dem Stempel einer 5 ml Spritze homogenisiert. Von dem Homogenisat sowie der Lavage der Nasenhöhle und der Lunge, wurden mit PBS (0,5 % FCS) 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt und jeweils 100 µl auf TSA-Platte ausgestrichen. Nach 16 bis 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Kolonien zur Bestimmung der CFU ausgezählt.

2.2.3.2 Salmonella induziertes Typhus- und Colitis-Modell

2.2.3.2.1 Orale Infektion

Für die orale Infektion der Mäuse wurde der Stamm SL1344wt wie in 2.2.1.1 beschrieben angezogen. Die Kultur wurde bei 3500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert und in 1 ml HEPES-Puffer aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde mittels photometrischer Messung (OD_{600}) bestimmt. Im Typhus-Modell erfolgte die orale Infektion der Mäuse mit ca. $3x10^8$ Bakterien in 100 µL HEPES-Puffer über eine Schlundsonde (Gavage). Für die Induktion einer *Colitis* wurden die Tiere 24 Stunden vor Versuchsbeginn oral mit 20 mg Streptomycin in 100 µL *A. dest* behandelt und anschließend mit ca. $3x10^6$ Salmonellen in 100 µL HEPES -Puffer über eine Schlundsonde infiziert. Die Infektionsdosis wurde anhand einer 1:10-Verdünnunsgreihe des Inokulums (siehe 2.2.2.4) überprüft. Die Tiere wurden nach der Infektion täglich 1 bis 2 Mal begutachtet und ihr Wohlergehen nach einem Bewertungssystem (Anhang 1) beurteilt. Erreichten die Tiere eine durchschnittliche Bewertung von 3,5, wurden sie tierschutzgerecht getötet.

2.2.3.2.2 Organentnahme bei Salmonellen-Infektion

Zur Analyse wurden infizierte Mäuse mittels zervikaler Dislokation nach 2 oder 4 Tagen getötet. Nach Öffnen der Bauchdecke und des Brustraumes wurde das Blut mittels einer Spritze und 26G Kanüle aus dem Herzen entnommen und in ein Serumseparationsröhrchen (BD) überführt. Das Blut wurde bei 10000 x g für 2 Min zentrifugiert (Heraeus Freco21 Thermo Fisher Scientific) und das Serum bei -20 °C für spätere Analysen gelagert. Caecum, Colon und Ileum sowie die mesenterialen Lymphknoten (MLK), Leber und Milz wurden präpariert. Für histologische Untersuchungen wurden je 0,5 cm der Caecumspitze, des Colons und des Ileums, sowie ¼ der Milz, ein Teilstück der Leber und ein MLK in 4 % PFA für 24 Stunden fixiert. Weitere Proben von Caecum, Colon, Ileum, MLK, Leber und Milz wurden für molekularbiologische Analysen in RNALater® (Life Technologies) bei -80°C gelagert. Zur Verifizierung des Genotyps der Versuchstiere wurde ein Stück des Ohrs entfernt und bei -20 °C aufbewahrt. Die Genotypisierung wurde von Kristine Hagens (Zell. Mikrobiologie, FZB) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Keimlast wurden Ileum, Caecum, Colon und MLK sowie die Hälfte der Milz und ein Stück der Leber in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitor (comlete Mini EDTA-free, Roche) mittels einer Metallkugel und dem TissueLyser II (Qiagen) 5 Min bei 30 Hz homogenisiert. Von dem Homogenisat wurden mit PBS 1:10-Verdünnungsreihen angefertigt und 10 μ l auf einer LB-Agarplatte in Triplikaten ausgestrichen. Aufgrund der teilweise niedrigeren Keimlast der systemischen Organe und des Ileums wurde von diesen Homogenisaten zusätzlich 100 μ l unverdünnt auf eine separate LB-Platte ausplattiert. Nach 24 Stunden bei 37 °C wurden die Kolonien zur Bestimmung der CFU ausgezählt. Das übrige Homogenisat wurde 10 Min bei 8000 x g zentrifugiert und die Überstände für spätere Analysen bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Gastrointestinaltrakt von Mäusen

Für die durchflusszytometrischen Analysen von Organlysat war eine Einzelzellsuspension der einzelnen Darmabschnitte notwendig. Hierfür wurden die infizierten Mäuse mittels zervikaler Dislokation nach 2 oder 4 Tagen getötet und das Caecum entnommen. Nach gründlicher Entfernung von Fettgeweberesten wurden die Darmteile der Länge nach aufgeschnitten, dreimal in Waschmedium gewaschen und anschließend mit einer Schere bis zu einer breiigen Konsistenz zerkleinert. Der zerkleinerte Darm wurde für 1 Stunde bei 37 °C unter orbitalem Schütteln (Inkubationsschüttler MaxQ 6000 (Thermo Fischer Scientific) in Waschmedium mit 0,5 mg/ml Collagenase/Dispase (Roche) verdaut und anschließend 1 Min gründlich geschüttelt (Multi Reax, Heidolph Instruments). Um unverdaute Gewebereste zu entfernen und die Zellen gründlich zu vereinzeln, wurde das Lysat anschließend durch ein 100 μ l und ein 70 μ l Zellsieb (BD) gegeben. Die Zellen wurden bei 500 x g für 5 Min zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific), das Sediment mit 5 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 0,5 ml FACS-Puffer gründlich resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem *Scepter Cell Counter* (Millipore) bestimmt.

2.2.3.2.4 Analyse des Mikrobioms in Kotproben von C57B/6J und LPLA₂-^{/-} Tieren

Die Mikrobiom-Analyse der Kotproben nicht infizierter C57BL/6J sowie LPLA₂-^{/-} Tiere wurde von Dr. Phillip Rausch (Arbeitsgruppe Evolutionsgenomik) vom Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie (Plön), mittels 16S rRNA-Sequenzierung durchgeführt. Zu Beginn der Analyse wurde der Datensatz auf eine durchschnittliche Sequenzanzahl von 4.493,5 ±29,069 SD pro Probe normalisiert und eine durchschnittliche Abdeckung der Spezies innerhalb der bakteriellen Gemeinschaften von etwa 86% erreicht (Good's coverage: 85,871±0,061 SD). Die Klassifizierung der Sequenzen auf Stamm- und Gattungsebene erfolgte über den "RDP naive baysian classifier" [224] unter Verwendung der Sequenzdatenbank "RDP *Trainset* 9" (modifiziert durch Patrick Schloss). Die bioinformatische Analyse des Datensatzes wurde ebenfalls von Dr. Phillip Rausch durchgeführt.

2.2.4 Immunologische Analysen

2.2.4.1 Phänotypisierung der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Einzelzellsuspensionen (2.2.3.2.3) wurden 5x10⁵ Zellen pro Färbung in eine 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatte (Costar®) gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) wurden die Überstände verworfen und das Sediment resuspendiert (Vortexer VTX-3000L Mixer Uzusio, Harmony). Die Zellen wurden anschließend mit 50 µl Fc-Blockierungslösung für 15 Min bei 4 °C inkubiert, mit 150 µl FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen gelockert. Die Färbung der Zellen erfolgte in 50 µl Antikörperlösung für 20 Min bei 4 °C im Dunkeln (Tabelle

2). Neben den Antikörpern (Tabelle 2) enthielt die Antikörperlösung auch einen Lebend-Tod-Farbstoff (LIVE/DEAD[®] Fixable Blue Dead Cell Stain Kit, Invitrogen), um bei der Messung lebende Zellen selektieren zu können. Die ungebundenen Antikörper wurden durch Zugabe von 150 µl FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation entfernt. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl 4 % PFA resuspendiert und gemessen.

Die Messung erfolgte an einem FACS-LSR[™]II (BD) mit einem 355 nm und einem 488 nm Festkörperlaser sowie einem 633 nm roten Helium-Neon-Laser. Während der durchflusszytometrischen Messung wurde das Programm FACSDiva[™] (Version 6.0, BD) genutzt und die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms FCS Express 4 Flow Cytometry (Version 4.03.0011, DeNovo[™] Software). Die Strategie der Auswertung ist im Anhang 2 und 3 gezeigt.

Antigen	Klon	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
CD3e	145-2C11	armenischer Hamster	РЕ-Су7	1:200	BD
CD4	GK1.5	Ratte	PerCP-Cy5.5	1:320	Biolegend
CD8	53-2.1	Ratte	FITC	1:600	BD
CD11b	M1/70	Ratte	APCeFlour- 780	1:400	eBioscience
CD11c	N418	Hamster	PE-Cy7	1:640	eBioscience
CD16/CD32 (FC-Block)	2.4G2	Ratte	-	1:100	BD
CD45	30-F11	Ratte	PerCP-Cy5.5	1:1600	BD
CD90.2	53-2.1	Ratte	APCeFlour- 780	1:640	eBioscience
F4/80	BM8	Ratte	APC	1:200	Biolegend
γδTCR	eBioGL3 (GL-3, GL3)	armenischer Hamster	APC	1:40	eBioscience
Ly-6G and Ly- 6C (Gr1)	RB6-8C5	Ratte	FITC	1:1000	BD
Ly6-G	1A8	Ratte	PE	1:400	BD
NK1.1 (NKR-P1B and NKR-P1C)	РК136	Maus	PE	1:160	BD

Tabelle 2: Antikörper für die Verwendung in der Durchflusszytometrie

2.2.4.2 Zytokinquantifizierung mittels BD™ cytometric bead array

Für die Konzentrationsbestimmung verschiedener Chemokine und Zytokine in Serum und Organlysaten des Caecums infizierter Mäuse oder in Zellkulturüberständen wurden das durchflusszytometrisch-basierte cytometric bead array (CBA) System von BD verwendet. Die Zusammenstellung des individualisierten Kits enthielt das mouse/rat soluble master buffer kit sowie die BD[™] CBA flex sets für IFN-γ (A4), KC (A9), MCP-1 (B7), IL-10 (C4), IL-17A (C5), MIP-1 α (C7) und TNF- α (C8). Die relative Position der Bead Population in dem Koordinatensystem des BD CBA flex set Systems ist in Klammern angegeben. Die Messung der Proteinmengen wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die Organlysate für 10 Min bei 8000 x g (Heraeus Freco21 Thermo Fisher Scientific) und 4 °C zentrifugiert und anschließend 50 µl des Organlysates, Serums oder Zellkulturüberstandes bzw. 50 µl der mitgelieferten Standardlösung (seriell 1:2 verdünnt in assay diluent) in einer 96-well-Rundboden- Mikrotiterplatte (Costar®) gegeben. Nach Zugabe von 50 µl Bead-Mischung (enthält jeweils 0,5 µl Bead Lösung aller verwendeten flex sets verdünnt in bead capture dilution buffer) wurde alles resuspendert und bei RT für 1 Stunde inkubiert. Nachfolgend wurden 50 µl Detektions Reagens (enthält jeweils 0,5 µl PE detection reagent aller verwendeten flex set, verdünnt in PE detection reagent diluent) zugegeben und erneut bei Raumtemperatur für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Nicht gebundenes Bead und Detektions Reagens wurde durch zweimaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer (BD™ CBA wash buffer) und Zentrifugation bei 500 x g (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Fisher Scientific) bei 4 °C für 5 Min entfernt. Für die Messung wurde das Bead-Gemisch in 150 µl Waschpuffer resuspendiert. Die quantitative Analyse erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messung am FACSArray[™] (BD) mit Hilfe der FACSArray[™] System Software (Version 1.0.3, BD). Die Daten wurden anschließend mit Hilfe der FCS Filter™ v1.0.4 (Soft Flow. Inc., Minneapolis, USA) und FCAP Array[™] v1.0.1 (Soft Flow. Inc.) ausgewertet.

2.2.4.3 Myeloperoxidase (MPO) ELISA

MPO wurde mittels DuoSet Mouse MPO (R&D) im Caecum-Homogenisat von *S*. Tminfizierten Mäusen (siehe 2.2.3.2.1) gemessen. Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die TMB-Farbreaktion anschließend bei 450 nm und 620 nm am Sunrise Reader (Tecan) gemessen. Die MPO-Konzentration wurde mit Hilfe der Software Magellan V7.0 (Tecan) bestimmt.

2.2.5 Histopathologische und immunchemische Analysen

2.2.5.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte

Gewebeproben wurden für 24 Stunden (h) in 4 % PFA fixiert und anschließend in PBS bis zur Verarbeitung gelagert. Die Proben wurden in dem Autotechnikon (Microm STP 120, Thermo Fisher Scientific) dehydriert und in Paraffin übertragen (1 h 4 % PFA, 1 h 70 % EtOH, 1 h 80 %

EtOH, 1h 90 % EtOH ,1 h 96 % EtOH, 3x 1 h 100 % EtOH, 2x 1 h Xylol, und zweimal für 1,5 h in Paraffin (65 °C)). Die Organe wurden anschließend in einer Paraffingießstation (Leica EG1140C, Leica) bei 65 °C in flüssigem Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Organen wurden mittels Rotationsmikrotoms (Leica RM2155, Leica) 4 μ m dicke Schnitte angefertigt und in *A. dest* (RT) gegeben, um Falten vorsichtig herauszustreichen. Anschließend wurden die Schnitte in 39 °C warmem H₂O im Wasserbad (GFL1052, GFL) gestreckt, auf SuperFrost®Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific) übertragen und bei 37 °C ÜN getrocknet.

2.2.5.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung

Die Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung wurde für die pathologische Bewertung der Organe verwendet. Unmittelbar vor histologischen Analysen wurden die Schnitte mit Xylol (2 x 10 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 2 Min 100 % EtOH, dann nacheinander 2 x 2 Min 96 % EtOH und 2 x 1 Min in 70 % EtOH) rehydriert. Nach dem Spülen in *A. dest* wurden die Schnitte für 10 Min mit Hämalaunlösung nach Mayer (Roth) gefärbt und 10 Min in Leitungswasser differenziert, wobei sich die Zellkerne blau anfärbten. Die Schnitte wurden erneut kurz in *A. dest* gespült und für 1 Min in 1 % Eosin gegengefärbt, sodass das Zellplasma rot wurde. Anschließend wurden die Schnitte wieder kurz in *A. dest* gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (in 96 % EtOH dippen, 2 x 2 Min 100 % EtOH) und Xylol (2 x in Xylol dippen) dehydriert und mit Entellan eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation wurden am Lichtmikroskop BX41 (Olympus) durchgeführt.

2.2.5.3 Pathologische Bewertung des Darms

Die pathologische Bewertung von H&E angefärbten Caecum-Schnitten wurde an dem Lichtmikroskop BX41 (Olympus) durchgeführt. Von jedem Caecum wurde die Entzündung anhand eines detaillierten Bewertungssystems (Tabelle 3) beurteilt und nach einem Zahlensystem (in Klammern angegeben) bewertet. Dabei stand der Wert 0 für keine pathologische Veränderung und der Wert 23 für die schwerste pathologische Veränderung. Die Bewertung erfolgte blind von zwei unabhängigen Personen, woraus anschließend der Konsens gebildet wurde. Das Bewertungssystem ist nachfolgend dargestellt:

	Untersuchtes Merkmal	Wert		
Lumen	Apoptotische Epithelzellen	Keine (0); ab 10 Zellen (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3)		
	Neutrophile	Keine (0); ab einer Zelle (1); moderat (2); Lumen ist dicht gefüllt (3)		
Oberflächenepithel	Desquamation	Keine (0); Vereinzelt < 30 % (1); großflächig > 30 % (2)		
	Ulzeration	Keine (0); Vorhanden (1)		
Mukosa	Kryptenabzesse	Keine (0); Vereinzelt (1); mehr als 5 (2); mehr als 20 (3)		
	Inflammatorisches Infiltrat	Keine (0); Vereinzelt < 15 % (1); moderat (2); großflächig > 50 % (3)		
	Lymphaggregate	1 kleines LA (0); 2-4 kleine LA (1);		
		mehr als 5 kleine oder 1 großes LA (2)		
Submukosa	Lymphaggregate	1 kleines LA (0); 2-4 kleine LA (1);		
		mehr als 5 kleine oder 1 großes LA (2)		
	Neutrophile	Keine (0); wenige (1); viele (2)		
	Ödem	Mild < 10 % (0); moderat (1);		
		großflächig > 80 % (2)		

Tabelle 3: Pathologisches Bewertungssystem des Salmonella-infizierten Caecum

2.2.5.4 Histologische Immunfluoreszenz-Färbung

Mittels Immunfluoreszenz können durch die Wahl verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mehrere antigenspezifisch Strukturen oder Zellen gleichzeitig angefärbt werden. Unmittelbar vor der Immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte mit Xylol (3 x 5 Min Xylol) und in einer absteigenden Alkoholreihe (1 Min 1:2-Xylol/EtOH-Gemisch, 2 x 5 Min 100 % EtOH, dann nacheinander in 100 % EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH und 40 % EtOH kurz dippen) rehydriert. Nach dem Wässern in *A. dest* wurden die Schnitte für das *Antigen-Retrieval* in einem Dampfgarer (Tefal) 30 Min in vorgewärmten Citrat-Puffer inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in PBS gewaschen und in eine Shandonkammer (Thermo Scientifics) eingespannt. Die Schnitte wurden 20 Min mit Blockierungspuffer inkubiert und der entsprechende primäre Antikörper in Blockierungspuffer verdünnt (Tabelle 4). 100 μ l des Antikörpers wurden auf die Schnitte gegeben und bei 4 °C ÜN oder 1 Stunde bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBST gewaschen und die entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper in Färbepuffer aufgetragen (Tabelle 4). Nach 1 Stunde wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBST gewaschen und für 10 Min bei RT mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBST

gewaschen und mit Confocal-Matrix[®] (Micro-Tech-Lab) eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation wurde am Konfokalmikroskop TCS SP5 (Leica) durchgeführt.

Antigen	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Myeloperoxidase (MPO)	Kaninchen	-	1:100	Thermo Fisher Scientific
Salmonella LPS	Maus	-	1:500	Meridian Life Science
Pneumokokken	Kaninchen	-	1:100	Prof. Sven Hammerschmidt (Universität Greifswald)
Maus IgG	Ziege	Cy2	1:100	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen IgG	Ziege	Cy2	1:100	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen IgG	Ziege	СуЗ	1:600	Jackson ImmunoResearch

Tabelle 4: Antikörper für Immunhistologie und Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

2.2.5.5 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

Die Zellen wurden vor der immunologischen Färbung wie in 2.2.2.3 beschrieben, infiziert und auf Deckgläschen fixiert. Anschließend wurden die Zellen 15 Min in 50 mM NH₄Cl (in PBS) inkubiert und 20 Min mit 10 % Ziegenserum in PBS blockiert. Die extrazelluläre Färbung erfolgte auf nicht permeabilisierten Zellen mit dem primären anti-Pneumokokken Antikörper (Tabelle 4) sowie dem entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörper verdünnt in PBS mit 1 % Ziegenserum für jeweils 45 Min bei RT im Dunkeln. Zwischen jedem Schritt wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton X100 in PBS für 15 Minuten und die Wiederholung beider Färbe- und Waschschritte. Zum Schluss wurden die Zellen für 10 Min bei RT mit DAPI gefärbt, erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Confocal-Matrix[®] (Micro-Tech-Lab) eingedeckt. Die Auswertung und Dokumentation wurde am Konfokalmikroskop TCS SP5 (Leica) durchgeführt.

2.2.6 Molekularbiologische Analysen

2.2.6.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Aus den verschiedenen Gewebeproben wurde RNA mittels dem RNeasy[®] Plus Mini Kit (Quiagen) isoliert. Die in RNALater[®] (Life Technologies) aufbewahrten Gewebestücke (siehe 2.2.3.2.2) wurden dafür aufgetaut und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit *Lysis Buffer* und einer Metallkugel überführt. Nach dem zweiminütigen Homogenisieren mit Hilfe des TissueLyser II (Qiagen) bei 30 Hz wurden die Proben nach Herstellerangaben weiterbehandelt. In die Extraktion wurde zusätzlich ein optionaler DNA-Verdau auf der Säule mit dem RNase-freien

DNase Set (Quiagen) nach Angaben des Herstellers integriert. Abschließend wurde die RNA mit 30 bis 50 μ l RNase-freiem H₂O eluiert und die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific) bei 260 nm bestimmt. Verunreinigungen wurden zusätzlich bei 280 nm gemessen. Bis zur Weiterverwendung wurden isolierte RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Reverse Transkription

Um die Transkription verschiedener Gene quantifizieren zu können, wurde die RNA durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurden 1 µg RNA nach Angaben des Herstellers mit dem Maxima[®] *First Strand cDNA Synthese Kit* für q-Real-Time-PCR (Thermo Scientific) in cDNA umgeschrieben. Die Umschreibung erfolgte bei folgendem Programm in dem Lab Cycler (SensoQuest): 10 Min bei 25 °C, 15 Min bei 50 °C und 5 Min bei 85 °C. Die Proben wurden anschließend 1:10 verdünnt und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 Quantitative Real-Time-PCR mittels LightCycler

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR am LightCycler®480 II (Roche) untersucht. Mit dieser Methode kann die Amplifikation der cDNA durch SYBR Green I, einem Farbstoff der sich in die doppelsträngige DNA einbaut, in Echtzeit verfolgt werden. Als interner Standard wurde ein Mastermix aus cDNA infizierter BMM Φ und mit PMA/Ionomycin (5 ng/500 ng) stimulierter Milzzellen in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:2, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200, 1:1000) verwendet. Für das jeweilige Gen (Tabelle 5) wurden Primer-Mixe mit 10 μ M forward und 10 μ M reverse Primer vorbereitet und bei -20 °C gelagert. Die quantitative Real-Time-PCR wurde mit dem LightCycler®480 SYBR Green I Master Kit von Roche nach Herstellerangaben vorbereitet, wobei 0,2 μ I Primer-Mix und 1 μ I cDNA in einem 10 μ I Ansatz eingesetzt wurden

Temperatur	Zeit	Wiederholungen
95°C	10 min	
95°C	10 sek	
58-63°C in 0,5°C Schritten	10 sek	45 x
72°C	8 sek	
72°C	1 sek	
95°C	10 sek	
65°C	10 sek	

Es wurde nach dem folgenden Temperatur-Protokoll gearbeitet:

Die Spezifität der Real-Time-PCR wurde mittels Schmelzkurven-Analyse überprüft. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der LightCycler®480 Software 1.5.0 SP4 (Version 1.5.0.39, Roche).

	Primer Sequenz	
Gen	forward	reverse
Gapdh	ATTGTCAGCAATGCATCCTG	ATGGACTGTGGTCATGAGCC
lfn-γ	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
Tnf-α	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
II-17A	CTCTCCACCGCAATGAAGAC	AGCTTTCCCTCCGCATTGA
ll-12p40	CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
Кс	ACCCAAACCGAAGTCATAGC	TCTCCGTTACTTGGGGACAC
Мср-1	CCTGCTGTTCACAGTTGCC	ATTGGGATCATCTTGCTGGT
Mip-1α	ACCATGACACTCTGCAACCA	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG
II-10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
II-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA

Tabelle 5: Primer-Kombinationen für die quantitativer Real-Time-PCR

2.2.7 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism[®], Version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die einzelnen Datengruppen wurden zuerst mit dem Kolmogorov-Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Eine Normalverteilung der Daten wurde angenommen, wenn der p-Wert > 0,05 war. Die Beurteilung der statistischen Unterschiede erfolgte bei normalverteilten Datensätzen mit dem Student's t-Test (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %) oder mit dem 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni Mehrfach-Vergleichstest (Konfidenzintervall 95 %). Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem Mann-Whitney Test analysiert (zweiseitig, Konfidenzintervall 95 %). Soweit nicht anders angegeben, lagen die ermittelten p-Werte > 0,05 und die zu untersuchenden Unterschiede wurden als nicht signifikant eingestuft. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternen gekennzeichnet und wie folgt definiert, *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle der LPLA₂ in der Pneumokokken-Infektion

In bisherigen Untersuchungen wurde die Funktion der LPLA₂ in der Wirtsantwort auf den intrazellulären Lungenerreger *M. tuberculosis* beschränkt [219]. Inwiefern dieses Enzym auch eine Rolle in der Immunabwehr gegen primär extrazellulär lebende Lungenpathogene spielt, wurde bisher nicht betrachtet. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in der vorliegenden Studie *Streptococcus pneumoniae* als ein extrazellulärer Modellorganismus für bakterielle Pneumonie verwendet.

3.1.1 LPLA₂-defiziente Peritonealmakrophagen in der Pneumokokken-Infektion

Gewebsmakrophagen sind nach heutigem Kenntnisstand der Zelltyp mit der höchsten Expression an lysosomaler Phospholipase A₂ [211–213]. Um die antibakterielle Effizienz LPLA₂ defizienter Makrophagen gegenüber *S. pneumoniae* im Vergleich zu C57BL/6J Makrophagen zu untersuchen, wurden PMΦs isoliert und mit *S. pneumoniae in vitro* infiziert (2.2.2.3). Da diese Bakterien durch ihre Kapsel vor der Aufnahme durch Phagozyten geschützt werden, wurde bei *in vitro* Untersuchungen der Kapsel-defiziente Stamm D39Δ*cap* verwendet.

Die Analyse der Fähigkeit von Makrophagen, Pneumokokken abzutöten, ergab keinen Unterschied zwischen C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} PM Φ (Abbildung 7). Bereits nach wenigen Stunden waren in Makrophagen beider Versuchsgruppen die Bakterien annähernd bis zur Nachweisgrenze von 10 Bakterien pro Ansatz eliminiert worden (Abbildung 7 A und B).

Um zu bestätigen, dass die Pneumokokken von den Makrophagen und nicht durch das zugegebene Antibiotikum abgetötet wurden, und um dabei intrazelluläre von extrazellulären Bakterien unterscheiden zu können, wurde eine differentielle Antikörperfärbung durchgeführt (siehe 2.2.5.5). Die mikroskopische Analyse zeigte eine schnelle Aufnahme der Pneumokokken nach bereits zehn minütiger Infektion sowie die fast vollständige Eliminierung innerhalb von 4 Stunden (Abbildung 7 C).



Abbildung 7: Intrazelluläres Überleben von S. pneumoniae in Peritonealmakrophagen

PMΦs aus C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen wurden mit einer MOI von 25 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert (A und B) bzw. mit 4 % PFA fixiert (C). A und B) Nach 30 minütiger Infektion wurden die Makrophagen in Gentamycin/Penicillin haltigem Medium kultiviert, um nicht internalisierte extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach der Lyse der Zellen wurde die CFU durch Ausplattieren auf Agarplatten bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung zweier unabhängiger Versuche (A und B). Gepunktete Linie: Detektionslimit. Der 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni-Test ergab keine signifikanten Unterschiede. C) Die fixierten Zellen wurden 10 und 240 Minuten nach Infektion immunologisch mit anti-Pneumokokken Antikörper intrazellulär (grün) und extrazellulär (rot) sowie mit DAPI (blau) gefärbt. Extrazelluläre Bakterien erscheinen gelb bis rot. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme der Zellen eines Versuchsansatzes in 1600facher Vergrößerung. Größenbalken: 10 μm.

3.1.2 Kein Einfluss von LPLA₂-Defizienz auf die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie in Mäuse

Um sekundäre Effekte der LPLA₂-Defizienz mit einzubeziehen, welche veränderte Umgebungsbedingungen und Funktionen verschiedenster Zellpopulationen einschließt, wurde der Einfluss der fehlenden LPLA₂ auf die Pneumokokken-Infektion im komplexen lebenden Organismus untersucht. Hierfür wurden C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse mit dem biolumineszierenden *S. pneumoniae* Stamm Xen10 (Caliper Life Science) intranasal infiziert und der Infektionsverlauf zum einen mit einem nicht invasiven bildgebenden Verfahren (IVIS® Kinetic, Caliper Life Science) verfolg und zum anderen über einer Endpunktanalyse mit Bestimmung der Bakterienlast untersucht. Der Stamm Xen10 basiert auf dem WT Stamm A66.1, ein klinisches Isolat des Serotyp 3, welches für die Auslösung lokaler Pneumonien in Mäusen verwendet wurde [221, 225]. Dieser Stamm zeigt weniger schnell eine hämatogene Ausbreitung mit nachfolgender Sepsis als Stämme des Serotyps 2, zu welchem der häufig in Vakzinierungsstudien verwendete Stamm D39 gehört. Die Infektionsdosis wurde auf 5x10⁶



Abbildung 8: Untersuchung von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen mit einem nicht invasiven bildgebenden Verfahren

C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5x10⁶ Pneumokokken infiziert und der Krankheitsverlauf wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten im IVIS® Spectrum Imaging System (Caliper) überprüft. Gezeigt sind Tiere unter Isofluran-Betäubung an Tag 3 nach Infektion (oben) und die entsprechenden Lungen nach Tötung der Tiere (unten). Die Bilder wurden mit dem **IVIS**® Kinetic (Caliper Life Science) aufgenommen. Dargestellt sind die Anzahl gemessener lumineszenter Signale in 5 Minuten.

Die Biolumineszenz der Pneumokokken sollte die Überwachung des Infektionsverlaufes erleichtern und die Untersuchung einzelner Tiere zu mehreren Zeitpunkten mit einem nicht invasiven bildgebenden Verfahren (IVIS[®] Kinetic, Caliper Life Science) ermöglichen. Die Messung der Ausbreitung von biolumineszierenden Pneumokokken im Wirt scheiterte jedoch an sehr schwachen lumineszenten Signalen. Um messbare Signale zu erhalten brauchte es nicht nur eine hohe Keimlast von über 1x10⁶ Bakterien, sondern auch eine hohe Stoffwechselaktivität der Bakterien, sodass schwache Lumineszenz im Laufe der Infektion erst nach Adaption der Pneumokokken an den Wirt an Tag 3 bis 4 in den Mäusen detektiert wurde (Abbildung 8). Da dieses Verfahren kein Informationsgewinn für den Versuch darstellte, wurde die Untersuchung der Tiere mit dem IVIS[®] Kinetic eingestellt. Aus Gründen

der Vergleichbarkeit wurde für weitere Experimente an dem lumineszenten A66.1 Stamm Xen10 festgehalten.

Die Bestimmung der Keimlast im Lungengewebe, der Lavage der Lunge und des Nasenrachenraums sowie im Blut, in Kombination mit der histologischen Untersuchung der Lunge, zeigt den gewünschten Krankheitsverlauf Xen10-infizierter C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäuse mit Anzeichen einer Pneumonie ohne Sepsis. Nur bei wenigen Tieren kam es zu einer Ausbreitung der Bakterien ins Blut (Abbildung 9 A), wohingegen eine hohe Pneumokokkenlast von bis zu $4x10^7$ Pneumokokken im Lungengewebe und in der Lungenlavage auf eine Pneumonie hindeuteten (Abbildung 9 C und D). Unterstützt wurde dies von charakteristischen lokal begrenzten Infiltraten im Lungengewebe, welche in H&E gefärbten Lungenschnitten in Abbildung 10 repräsentativ an Tag 1 und 2 der Infektion gezeigt sind. Eine Bakterienlast von bis zu $2,2x10^6$ Bakterien im Nasenrachenraum der Tiere zeigte die erfolgreiche Besiedlung an.



Abbildung 9: Streptococcus pneumoniae-Last in infizierten C57BL/6J und LPLA2-/- Mäusen

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden intranasal mit 5x10⁶ Bakterien infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten getötet. Es wurde die Bakterienlast A) im Blut, B) in der Nasenhöhle, C) in der bronchoalveolaren Lavage und D) im Lungengewebe bestimmt. Das Blut wurde hierzu nach Abtötung aus dem Herzen entnommen und das Lungengewebe wurde homogenisiert. Die Nasenhöhle und Lunge wurden jeweils aus Richtung der Trachea mit 1 ml PBS/FCS gespült und die enthaltenen Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Dargestellt ist die CFU pro ml Organlysat resp. Lavage, und der Median von einem repräsentativen Experiment aus drei Versuchsansätzen. Gepunktete Linie: Detektionslimit. Der Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede.



Abbildung 10: Pathologie *S. pneumoniae* infizierter Lungen von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen

C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^{6} Bakterien infiziert und A) an Tag 1 sowie B) an Tag 2 getötet. Die Lunge wurde isoliert und in 4 % PFA fixiert. 4 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme von einem aus fünf Tieren je Genotyp A) an Tag 1 der Infektion und B) an Tag 2 der Infektion. Größenbalken: bei 40facher Vergrößerung 1000 µm, bei 200facher Vergrößerung 100 µm. Pfeile: Infiltrationen im Lungengewebe. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchsansätzen.

Vergleicht man die Bakterienlast sowie die histopathologischen Veränderungen der Lunge in den beiden Mausgruppen C57BL/6J und LPLA₂-^{/-}, so konnte kein Unterschied im Krankheitsverlauf der *S. pneumoiae*-Infektion festgestellt werden. In beiden Gruppen zeigte sich ein ähnlicher akuter Krankheitsverlauf mit rückläufiger Bakterienlast im Lungengewebe und Bronchoalveolarlavage innerhalb von drei Tagen nach Infektion. 20 % bis 30 % der Tiere in beiden infizierten Gruppen erreichten zwischen Tag 3 und 6 den moribunden Zustand und mussten getötet werden (Abbildung 11).



Abbildung 11: Überlebensrate *S. pneumoniae* infizierter C57BL/6J und LPLA₂-/- Mäusen

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden intranasal mit 5x10⁶ Bakterien infiziert. Das Wohlbefinden der Tiere wurde zweimal täglich nach einem Bewertungssystem beurteilt (Anhang 1). Bei Erreichen einer Bewertung von 3,5, wurden die Tiere tierschutzgerecht getötet.

3.2 Die Bedeutung der LPLA₂ in der Salmonellen-Infektion

Die Rolle der LPLA₂ bei Infektionen außerhalb des Atemtraktes wurde bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit *S*. Tm als Modellorganismus für einen fakultativ intrazellulären Erreger im Darm eingesetzt. *S*. Tm wird in der Maus in verschiedenen Infektionsmodellen verwendet, von denen hier zwei akute Modelle, das Typhus-Modell sowie das Colitis-Modell, ausgewählt wurden. Die Infektion mit einem WT-Stamm von *S*. Tm führt in immunkompetenten Mäusen zu einem Typhus-ähnlichen Krankheitsverlauf mit systemischer Ausbreitung der Bakterien, aber nur geringen Entzündungszeichen im Darm [66, 174]. Um das im Menschen übliche Krankheitsbild einer Colitis im Mausmodell hervorzurufen, werden die Tiere vor der Infektion mit Antibiotikum behandelt. Dies führt zu einer Reduktion der natürlichen Darmflora der Mäuse und erleichtert *S*. Tm die Kolonisierung des Darms [81, 87].

3.2.1 Typhusmodell: Der Verlauf der Infektion mit *S*. Tm ist vergleichbar in LPLA₂^{-/-} und C57BL/6J Mäusen

Für die Infektion im Typhus-Modell wurden C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Tiere mit 3x10⁸ Salmonellen oral infiziert. Zur Bestimmung der Keimlast und histologischen Untersuchungen wurden Milz, Leber und mesenteriale Lymphknoten (MLK) sowie verschiedene Darmabschnitte an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und analysiert.

An Tag 2 der Infektion wurde S. Tm in den meisten Tieren in den systemischen Organen wie Leber, Milz und MLK nachgewiesen und am 4. Tag der Infektion kam es zu einem starken Anstieg der Keimlast um 2 bis 3 logarithmische Stufen. Im Mittel lag die Bakterienlast an Tag 4 bei 10^3 bis 10^5 Bakterien pro Organ (Abbildung 12 A bis C). In der Leber beispielsweise wurde an Tag 4 in beiden Gruppen ein ähnliches Bakterienwachstum auf durchschnittlich $2x10^5$ CFU in C57BL/6J und 5,5x10⁵ Bakterien in LPLA₂-/- Tieren gemessen (Abbildung 12 B). Bei allen untersuchten systemischen Organen zeigte sich dabei eine vergleichbare Bakterienlast in beiden Versuchsgruppen ohne signifikante Unterschiede, wobei eine Tendenz hin zu mehr Salmonellen in den LPLA₂-/- Tieren an Tag 4 nach Infektion erkennbar ist.

Außerdem besiedelte *S.* Tm 2 Tage nach Infektion in jedem Tier alle drei untersuchten Darmabschnitte in ähnlichem Maße. Im Darm kam es im Vergleich zu den systemischen Organen aber zu einem geringeren Anstieg der Keimlast am vierten Tag der Infektion, im Caecum und Colon um ca. eine logarithmische Stufe, während sie im Ileum annähernd konstant blieb (Abbildung 12 D bis F). Dabei hatten C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse wie in den systemischen Organen an beiden Tagen der Untersuchung vergleichbar hohe Durchschnittswerte mit einem Median von 5,6x10⁴ bzw. 5,2x10⁴ CFU pro Caecum an Tag 4 (Abbildung 12 E).

Die histopathologische Untersuchung erfolgte an H&E gefärbten Schnitten des Caecums, da dieser Teil des Darms am stärksten durch die Salmonellen-Infektion betroffen war. Repräsentative Gewebsschnitte einer Maus je Zeitpunkt und Gruppe sowie die Darstellung der pathologischen Bewertung ist in Abbildung 13 gezeigt. An Tag 2 nach Infektion gab es in beiden Gruppen kaum Anzeichen einer Entzündung im Caecum. Nur vereinzelt waren abgelöste Zellen im Lumen zu erkennen. Erst am vierten Tag der Infektion kam es häufiger zum Auftreten von Zellmaterial im Lumen. In einzelnen Tieren waren zudem Veränderung der Kryptenstruktur sowie vereinzelt Ödembildung sichtbar (Abbildung 13 A).





C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden oral mit 3x10⁸ Bakterien infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten getötet. Die Bakterienlast wurde in A) Milz, B) Leber und C) mesenterialen Lymphknoten sowie D) lleum, E) Caecum und F) Colon bestimmt. Die Organe wurden hierzu in 1 ml PBS homogenisiert und die enthaltenen Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Dargestellt ist die CFU pro Organ sowie der Median von neun Tieren aus zwei vereinten Experimenten. Gepunktete Linie: Detektionslimit. Der Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede.



Abbildung 13: Pathologie Salmonellen-infizierter Caeca von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen im Typhus-Modell

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden oral mit 3x10⁸ Bakterien infiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten getötet. Das Caecum wurde isoliert und in 4 % PFA fixiert. 4 μm dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. A) Dargestellt ist jeweils eine Aufnahme von einem aus fünf Tieren mit den meisten Entzündungsmerkmalen in 100facher Vergrößerung, L: Lumen, M: Mukosa, SM: Submukosa, MP: Muscularis propria, Größenbalken: 500 μm. B) Mittelwerte der pathologischen Bewertung des gesamten und C) einzelner Bereiche des Caecums. Die pathologische Bewertung wurde anhand von folgenden Kriterien von zwei unabhängigen Personen blind bestimmt: Zellen im Lumen des Darms (Pfeilspitze), Desquamation des Epitheliums, Infiltration (gepunkteter Pfeil) und Bildung von Krypt-Abszessen (schwarzer Pfeil) sowie Ödembildung (Sternchen) und Granulocyten-Vorkommen in der Submukosa. Dargestellt sind zwei vereinte Experimente. Der Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Um den Grad der Entzündung quantitativ bewerten zu können, wurden die H&E gefärbten Schnitte nach einem pathologischen Bewertungssystem untersucht (2.2.5.3). Diese Bewertung reichte von 0 bis 23, wobei 0 keine Entzündung und 23 den höchsten Schweregrad der Entzündung beschreibt. Die Bewertung der Pathologie zeigt sehr große Unterschiede im Grad der Entzündung zwischen den einzelnen Tieren beider Gruppen. Die Caeca einiger Mäuse erreichten auch an Tag 4 nach Infektion nur eine Bewertung von 0 oder 1, während andere mit einer Bewertung von maximal 11 bei C57BL/6J und 13 bei LPLA2^{-/-} Mäusen bereits deutliche Entzündungszeichen zeigten (Abbildung 13 B). Diese Anzeichen einer Entzündung betrafen in beiden Gruppen alle untersuchten Regionen des Caecums (Abbildung 13 C). Die hohe Varianz in der Pathologie ist wie bei der Bakterienlast in beiden zu untersuchenden Gruppen gleichermaßen ausgeprägt, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen festgestellt werden konnten (Abbildung 13 A bis C).

Die Analyse der Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Caecum von LPLA₂^{-/-} Tieren im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen zeigte, wie schon bei der Bakterienlast und der pathologischen Bewertung, eine große Streuung zwischen den einzelnen Tieren (Abbildung 14). In LPLA₂^{-/-} Tieren kam es im Infektionsverlauf zu einem leichten aber nicht signifikanten Anstieg der *II-17A* Expression, während diese Beobachtung bei C57BL/6J Mäusen nicht gemacht werden konnte (Abbildung 14 D). Aus diesem Anstieg resultierte an Tag 2 der Infektion ein signifikant höherer *II-17A* mRNA-Level in LPLA₂^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Tieren. Bei allen anderen untersuchten Zytokinen kam es zwar zu einem leichten Anstieg der Genexpression im Infektionsverlauf, jedoch konnte kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 14).



Abbildung 14: Chemokin und Zytokin Genexpression in infizierten Caeca von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen im Typus-Modell

C57BL/6J (weiße Balken) und LPLA₂-^{*f*-} (schwarze Balken) Mäuse wurden oral mit 3x10⁸ Salmonellen infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und das Caecum entnommen. Nach Isolation der mRNA wurde die relative Genexpression von A) *Mcp-1*, B) *Mip-1* α und C) *Kc* sowie D) *II-17A*, E) *Ifn-* γ und F) *Tnf-* α im Verhältnis zu *Gapdh* mittels q-Real-Time-PCR bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von neun bis zehn Tieren zwei vereinter Experimente. **: p ≤ 0,01; Mann-Whitney Test.

3.2.2 Der Einfluss der LPLA₂ auf den Infektionsverlauf in der *S.* Tminduzierten Colitis

3.2.2.1 Erhöhte Keimlast in LPLA₂ defizienten Mäusen im Colitis-Modell

Für die Untersuchung der Funktion von LPLA₂ in der *Salmonella*-induzierten Colitis wurden C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt, um die natürliche Darmflora zu reduzieren und die Kolonisierung des Darms durch *S*. Tm zu erleichtern [87]. Die Infektion erfolgte oral mit 3x10⁶ Bakterien. Zur Bestimmung der Keimlast und histologischen Untersuchungen wurden Milz, Leber und MLK sowie verschiedene Darmabschnitte an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und analysiert.

Im Colitis-Modell unterlag die Bakterienlast in Leber und Milz in C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Tieren einer relativ kleinen Streuung, war aber im Vergleich zum Typhusmodell deutlich niedriger. An Tag zwei nach Infektion wurden im Mittel 10² Bakterien pro Organ in beiden Mausgruppen nachgewiesen, wobei sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen erkennen ließen (Abbildung 15 A und B). In der Leber beispielsweise stieg die CFU an Tag vier auf 2,3x10⁴ in C57BL/6J Tieren respektive 4x10⁴ CFU in LPLA₂-^{/-} Mäusen. Auch in den MLKs, Ileum, Caecum und Colon kam es zu einem Anstieg der Bakterienlast im Verlauf der Infektion. Im Gegensatz zu Leber und Milz zeichnete sich hier allerdings am 4. Tag nach Infektion eine signifikant höhere Bakterienlast in den LPLA₂-^{/-} Tieren ab, im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (Abbildung 15 C bis D). In jedem der drei Darmabschnitte sowie den MLK lag die Bakterienlast zu diesem Zeitpunkt der Infektion in LPLA₂-^{/-} Tieren im Mittel um zwei logarithmische Stufen über der von C57BL/6J Mäusen. Im Caecum bedeutete dies in C57BL/6J Mäusen einen Median bei 5,3x10⁶ CFU währen in LPLA₂-^{/-} Tieren der Median der Bakterienlast bei 2,3x10⁸ CFU pro Organ lag (Abbildung 15 E).





C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäusen wurden 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie oral mit $3x10^6$ Bakterien infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet. Es wurde die Bakterienlast in Milz (A), Leber (B) und mesenterialen Lymphknoten (D), sowie Ileum (D), Caecum (E) und Colon (F) bestimmt. Die Organe wurden hierzu in 1 ml PBS homogenisiert und die enthaltenen Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert. Dargestellt ist die CFU pro Organ sowie der Median von zehn Tieren aus zwei vereinten Experimenten. Gepunktete Linie: Detektionslimit. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Mann-Whitney Test. Die höhere Bakterienlast in $LPLA_2^{-/-}$ Tieren hatte allerdings keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere. In beiden Gruppen erreichten nahezu alle Tiere den moribunden Zustand zwischen Tag 5 und 7 nach Infektion (Abbildung 16).



Abbildung 16: Überlebensrate *S.* Tm infizierter C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen im Colitis-Modell

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden oral mit 3x10⁶ Bakterien infiziert. Das Wohlbefinden der Tiere wurde zweimal täglich nach einem Bewertungssystem beurteilt (Anhang1). Bei Erreichen einer Bewertung von 3,5, wurden die Tiere tierschutzgerecht getötet.

3.2.2.2 *S.* Tm löst eine geringere Entzündung im Caecum von LPLA₂^{-/-} Mäusen aus

Die histopathologische Untersuchung der Caeca wiesen die Tiere, wie in vorangegangenen Studien bereits gezeigt [87], deutlich mehr Anzeichen einer Entzündung auf als im Typhus-Modell. An den Tagen 2 und 4 nach Infektion wurde im Caecum eine starke Veränderung der Kryptenstruktur festgestellt (Abbildung 17 A). Die Mukosa und Submukosa waren durch eine massive Infiltration von Zellen stark verdickt und die ursprüngliche Struktur der Krypten wurde dadurch fast vollständig zerstört. Im Lumen befanden sich tote Zellen und die Desquamation der Epithelschicht war stark ausgeprägt, sodass die Epithelschicht an einigen Stellen bereits aufgelöst war. Außerdem wurden an beiden Zeitpunkten Kryptenabszesse in der Mukosa beobachtet (Abbildung 17). Im Gegensatz dazu wurde keine Entzündung im Ileum und nur eine milde Entzündung des Colons in beiden Mausstämmen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Der Schweregrad der Entzündung wurde wie im Typhus-Modell anhand H&E gefärbter Schnitte quantitativ nach einem pathologischen Bewertungssystem beurteilt (2.2.5.3). Diese Bewertung reichte von 0 bis 23, wobei 23 den höchsten Schweregrad der Entzündung beschreibt. Die pathologische Bewertung der *S*. Tm-induzierten Veränderungen im Caecum zeigte am 2. Tag der Infektion einen signifikanten Unterschied im Entzündungsgrad der Caeca. In C57BL/6J Tieren war das Mittel der Bewertung bei 13,5, während es in LPLA2^{-/-} Mäusen bei nur 11,5 lag (Abbildung 17 B).



Abbildung 17: Pathologie des Colitis-Modells in Caeca von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen nach Salmonellen Infektion

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie oral mit $3x10^{6}$ Bakterien infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet. Das Caecum wurde isoliert und in 4 % PFA fixiert. 4 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit H&E angefärbt und histologisch untersucht. A) Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme von einem aus 5 Tieren an Tag 2 nach Infektion in angegebener Vergrößerung, L: Lumen, M: Mukosa, SM: Submukosa, MP: Muscularis propria, Größenbalken: 500 µm B) Mittelwerte der pathologischen Bewertung des gesamten und C) einzelner Bereiche des Caecums. Die pathologische Bewertung wurde anhand von folgenden Kriterien von zwei unabhängigen Personen blind bestimmt: Zellen im Lumen des Darms (Pfeilspitze), Desquamation des Epitheliums, Infiltration (gepunkteter Pfeil) und Bildung von Krypt-Abszessen (schwarzer Pfeil) sowie Ödembildung (Sternchen) und Granulocyten-Vorkommen in der Submukossa. Dargestellt sind zwei vereinte Experimente. *: p < 0,05; Mann-Whitney Test. Dieser Unterschied war vor allem in der weniger stark ausgeprägten Ödembildung in LPLA₂^{-/-} Tieren begründet. Während im Caecum von C57BL/6J Mäusen die Submukosa fast vollständig durch Ödembildung verdickt war, trat dies bei LPLA₂^{-/-} Mäusen nur partiell auf (Abbildung 17 A). Zudem konnte in dem Caecum-Lumen infizierter LPLA₂^{-/-} Tiere tendenziell weniger totes Zellmaterial gefunden werden. Dadurch fällt am 2. Tag der Infektion vor allem die pathologische Bewertung des Lumens und der Submukosa in LPLA₂^{-/-} Tieren schwächer aus als in C57BL/6J Mäusen (Abbildung 17 C). An Tag 4 der Infektion konnte kein Unterschied festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt lag eine massive Entzündung des Caecums vor, die im Mittel eine Bewertung von 15 in beiden Gruppen erhielt (Abbildung 17 B und C).

3.2.2.3 Verändertes Chemokin- und Zytokinprofil in LPLA₂^{-/-} Mäusen nach *S.* Tm-induzierter Colitis

Um die Faktoren zu charakterisieren, die zu einer verstärkte Bakterienlast mit gleichzeitig reduzierten pathologischen Veränderung im Caecum von LPLA₂-^{/-} Tieren führen, erfolgte eine Analyse der Chemokine und Zytokine auf RNA- und Proteinebene. Für ersteres wurde mRNA aus Maus-Caeca isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und das Expressionsniveau mittels q-Real-Time-PCR ermittelt. Um die Daten zu verifizieren, erfolgte der Nachweis auf Proteinebene im Lysat der Caeca und im Serum der Tiere mithilfe des CBA-Systems (BD).

Inflammatorische Chemokine sind unter anderem für die Rekrutierung und Aktivierung entzündungsspezifischer Zellen während einer Infektion zuständig und haben so eine wichtige Funktion in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr. Bei der Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen spielt dabei MCP-1 eine wichtige Rolle [226], während die Rekrutierung bzw. Aktivierung von Neutrophilen vornehmlich von KC und MIP-1α übernommen wird [142, 227].

Die untersuchten Chemokine, MCP-1, MIP-1 α und KC zeigten im Verlauf der Infektion einen Anstieg sowohl auf Ebene der Genexpression (Abbildung 18 A bis C), als auch in der Proteinmenge (Abbildung 19). Im Organlysat des Caecums viel dieser bei allen drei Chemokinen deutlich höher aus als im Serum der infizierten Mäuse (Abbildung 19). Bei den Chemokinen KC und MCP-1 zeigte sich der Anstieg auf Gen- und Proteinebene im Verlauf der Infektion in beiden Gruppen gleichermaßen (Abbildung 18, Abbildung 19). Der signifikant höhere Gehalt an MIP-1 α im Caecum von LPLA₂^{-/-} Tieren am 4. Tag der Infektion konnte weder anhand der Genexpression (Abbildung 18 B) noch in wiederholten Versuchsansätzen bestätigt werden. Auch an Tag 2 konnte kein Unterschied zwischen C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen bezüglich der MIP-1 α Expression beobachtet werden.



Abbildung 18: Chemokin- und Zytokin-Genexpression in infizierten Caeca von C57BL/6J und LPLA₂-/-Mäusen im Colitis-Modell

C57BL/6J (weiße Balken) und LPLA₂-^{/-} (schwarze Balken) Mäuse wurden 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie oral mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und das Caecum entnommen. Nach Isolation der mRNA wurde die relative Genexpression von A) *Mcp-1*, B) *Mip-1* α und C) *Kc* sowie D) *II-17A*, E) *Ifn-y* und F) *Tnf-* α im Verhältnis zu *Gapdh* mittels q-Real-Time-PCR bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung von fünf Tieren eines repräsentativen Experimentes aus vier Versuchsansätzen. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Mann-Whitney Test.



Abbildung 19: Chemokinkonzentrationen in infizierten Caeca und Seren von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie oral mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet. Es wurde Serum sowie das Caecum entnommen, das Caecum in 1 ml PBS homogenisiert und anschließend die Proteinkonzentration von A) KC, B) MCP-1 und C) MIP-1 α mittels CBA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von 4 bis 5 Tieren eines Experimentes aus drei Versuchsansätzen. Gepunktete Linie: Detektionslimit. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Mann-Whitney Test.



Abbildung 20: Zytokinkonzentrationen in infizierten Caeca und Seren von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden 24 Stunden vor Infektion mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet. Es wurde Serum sowie das Caecum entnommen, das Caecum in 1 ml PBS homogenisiert und die Proteinkonzentration von A) IFN- γ , B)TNF- α und C) II-17A mittels CBA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von 4 bis 5 Tieren eines Experimentes aus drei Versuchsansätzen. Gepunktete Linie: Detektionslimit. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Mann-Whitney Test. Im Fall der klassischen proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α , die die Funktionen verschiedener Immunzellen beeinflussen, wurde im Verlauf der Infektion ebenfalls eine erhöhte Gen- sowie Proteinexpression in beiden Mausgruppen festgestellt (Abbildung 18 A und B, Abbildung 20 A und B). Weder bezüglich IFN- γ noch TNF- α wurde wiederhohlbar ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden. Signifikant mehr TNF- α auf Proteinebene im Caecum von LPLA₂-/- Mäusen an Tag 4 der Infektion konnte ähnlich MIP-1 α , weder auf Ebene der Genepression noch auf Proteinebene im Serum bestätigt werden, und war zudem in weiteren Versuchen nicht reproduzierbar. Dies galt auch für die signifikant niedrigere IFN- γ Menge im Serum von LPLA₂-/- Tieren an Tag 4 der Infektion (Abbildung 20 A).

Ein ebenfalls wichtiges Zytokin in der Immunabwehr gegen *S.* Tm ist IL-17A [172, 228, 229]. In beiden Mausgruppen kam es nach der Infektion zu einem stufenweisen Anstieg der IL-17A Genexpression im Caecum, welcher in LPLA₂-^{/-} Tieren deutlich höher ausfiel als in C57BL/6J Mäusen (Abbildung 18 C). In Übereinstimmung mit einer erhöhten Genexpression wurde auch eine signifikant höhere IL-17A Proteinmenge im Serum und Caecum von LPLA₂-^{/-} Tieren sowohl an Tag 2, als auch an Tag 4 der Infektion beobachtet (Abbildung 20 C).

Kaum ein Anstieg konnte hingegen bei der Genexpression der Zytokine II-10, II-12 und II-6 im Laufe der Infektion in beiden Mausgruppen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.4 Zelluläre Zusammensetzung des infizierten und entzündeten Caecums im Colitis-Modell

In der antimikrobiellen Wirtsantwort gegen *S*. Tm sind neben Zytokinen und Chemokinen auch ein breites Spektrum an Immunzellen beteiligt, welche in einem engen Zusammenspiel für die erfolgreiche Immunantwort gegen den Erreger nötig sind [92, 134]. Aus diesem Grund war neben der Chemokin- und Zytokinproduktion ebenfalls die zelluläre Zusammensetzung des infizierten und entzündeten Caecums in LPLA2^{-/-} Tieren von Interesse. Um diese zu untersuchen wurden die gesamten Zellen aus dem Caecum infizierter C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäuse isoliert und wie unter 2.2.3.2.3 beschrieben mit Hilfe des *Scepter Cell Counter* (Millipore) gezählt. Für die Färbung und anschließende durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen wurden jeweils 5x10⁵ Zellen eingesetzt. Von dieser Zellzahl ausgehend wurden mithilfe einer Lebend-Tod-Färbung (siehe 2.2.4.1) im Caecum der LPLA2^{-/-} Mäuse eine deutlich geringere Zahl lebender Zellen bei gleichzeitig mehr Zellschrott detektiert, als in C57BL/6J Tieren (Abbildung 21). Aus diesem Grund wurde bei der Analyse der Zellpopulationen grundsätzlich der relative Anteil an allen lebenden oder CD45-positiven lebenden Zellen bestimmt. Die Strategie der Auswertung ist in Anhang 2 und 3 gezeigt.


J Abbildung 21: Lebende Zellen im infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA2^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden mit 20 mg

Quadrate) Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Gesamtzellen aus dem Caecum isoliert. Die Zellen wurden anschließend durchflusszytometrisch mithilfe einer Lebend-Tod-Färbung diskriminiert und analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl lebender Zellen von 3 bis 6 Tieren aus zwei vereinten Experimenten. *: p < 0,05; Student's t-Test.

3.2.2.4.1 Lymphoide Zellen im Caecum von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen

Für die Charakterisierung der Lymphozyten wurde der relative Anteil an CD4⁺, CD8⁺ und $\gamma\delta$ TCR⁺ ($\gamma\delta$ T-Zellen) T-Zellen sowie NK-1.1⁺ CD3e⁻ Zellen (NK-Zellen) von allen gemessenen lebenden Zellen im Caecum von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen nach *S*. Tm-Infektion bestimmt. Der Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen stieg im Laufe der Infektion sehr leicht an. Tendenziell lag ihr Anteil in LPLA2^{-/-} Tieren sowohl während der Infektion, als auch in uninfizierten Tieren niedriger als in C57BL/6J Mäusen, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 22 A). Der Anteil an CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen blieb in beiden Gruppen während der Infektion konstant bei 3 bis 4 bzw. 1 bis 2 Prozent (Abbildung 22 C und D). Es war weder ein Anstieg im Infektionsverlauf, noch ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Mausgruppen zu verzeichnen (Abbildung 22 C und D).

Im Gegensatz zu den T-Lymphozyten wurde für NK-Zellen ein 5facher Anstieg im prozentualen Anteil lebender Zellen von 0,1 % in uninfizierten Tieren auf 0,5 % am zweiten Tag der Infektion beobachtet, welcher in beiden Gruppen gleichermaßen ausgeprägt war (Abbildung 22 B). Im Folgenden stieg ihr Anteil am 4. Tag der Infektion in C57BL/6J Tieren weiter auf durchschnittlich 0,7 % an, während er in LPLA₂^{-/-} Tieren auf 0,3 % sank, wodurch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen zustande kam (Abbildung 22 B).



Abbildung 22: Lymphozytenpopulationen im infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet, die Gesamtzellen aus dem Caecum isoliert und A) $\gamma\delta$ T-Zellen, B) NK-Zellen sowie C) CD4⁺ und D) CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 bis 9 Tieren aus zwei vereinten Experimenten. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Student's t-Test.

3.2.2.4.2 Myeloide Zellen im Caecum von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen

Für die Charakterisierung myeloider Zellen wurde der relative Anteil der $F4/80^+$ CD11b⁺ CD11c⁻ (Makrophagen), CD11c⁺ Ly6G⁻ Gr-1⁻ (DZ), CD11c⁻ F4/80⁻ Ly6G⁻ CD11b⁺ Gr1⁺ (inflammatorische Monozyten) und Gr-1⁺ Ly6G⁺ F4/80⁻ CD11c⁻ (neutrophile Granulozyten) an lebenden CD45⁺ Leukozyten bestimmt.

Im Verlauf der Infektion stieg der Anteil an Makrophagen im Caecum der C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Tiere nur unwesentlich von durchschnittlich 6 bzw. 10 Prozent auf 12 bzw. 14 Prozent an Tag 2 an und fiel an Tag 4 auf 9 bzw. 12 Prozent ab (Abbildung 23 A). Tendenziell war im Caecum der LPLA₂-^{/-} Tiere, ob infiziert oder uninfiziert, ein höherer Anteil an Makrophagen zu beobachten als in C57BL/6J Caeca, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Der Anteil der DZs an lebenden Leukozyten im Caecum bleibt im Laufe der Infektion nahezu konstant und bewegt sich zwischen 1 bis 2 Prozent (Abbildung 23 B). An Tag 4 der

Infektion wurden dabei, im Vergleich zu C57BL/6J Tieren mit 1,8 %, in LPLA₂-^{/-} Mäusen mit 1,2 % ein signifikant niedriger Anteil an CD45⁺ Zellen als DZs identifiziert. Die Anzahl inflammatorischer Monozyten stieg in C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Tieren im Verlauf der Infektion gleichermaßen, von 0,3 respektive 0,6 % in uninfizierten auf ca. 1 % in infizierten Mäusen, an (Abbildung 23 C).



Abbildung 23: Myeloide Zellpopulationen im Salmonellen-infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA2^{-/-} Mäusen

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit 3×10^6 Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet, die Gesamtzellen aus dem Caecum isoliert und Makrophagen (A), dendritische Zellen (DZs) (B), inflammatorische Monozyten (C) sowie neutrophile Granulozyten (D) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert von 3 bis 9 Tieren aus zwei vereinten Experimenten. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; Student's t-Test.

Eine wichtige Rolle in der Salmonellen-induzierten Colitis spielen neutrophile Granulozyten, die zu einem großen Teil zu der Entzündung im Darm infizierter Tiere beitragen [230]. Wie bereits in vorangegangenen Studien für Wildtyp Mäuse gezeigt wurde [87, 230], kommt es im Infektionsverlauf zu einem drastischen Anstieg an Neutrophilen von ca. einem Prozent der CD45⁺ Zellen in uninfizierten Tieren, auf 33 % in C57BL/6J und 42 % in LPLA2^{-/-} Mäusen an Tag 2 der Infektion (Abbildung 23 D). Am 4. Tag der Infektion konnte eine Reduktion des Neutrophilen-Anteils an CD45⁺ Zellen in C57BL/6J Tieren auf 25 % beobachtet werden,

während ihr Anteil in LPLA₂^{-/-} Mäusen mit 38 % annähernd konstant blieb. Damit wurde der tendenziell höhere Anteil an Neutrophilen im Caecum von LPLA₂^{-/-} Tieren an Tag 2, zu einem signifikanten Unterschied 4 Tage nach Infektion (Abbildung 23 D).

Die Beobachtung des erhöhten Neutrophilen-Anteils im Caecum der LPLA₂-^{/-} Tiere, konnte durch die Quantifizierung von MPO in Lysaten des Caecums mit Hilfe eines ELISAs sowie eine immunhistopathologische Untersuchung der Maus Caeca bestätigt werden. Bei MPO handelt es sich um ein Enzym, das vor allem in den Granula von Neutrophilen sowie in geringerer Menge in Makrophagen gespeichert wird, um nach der Freisetzung durch aktivierte Zellen antimikrobiell wirksame ROS herzustellen. Für die Quantifizierung von MPO im ELISA wurde dasselbe Organlysat verwendet, welches auch im CBA-Test für die Quantifizierung von Chemokinen und Zytokinen eingesetzt wurde.

In Übereinstimmung mit der erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten im Caecum bei der durchflusszytometrischen Analyse, konnte bei der Bestimmung der MPO-Konzentration ein Anstieg im Infektionsverlauf detektiert werden (Abbildung 24). Bereits 2 Tage nach Infektion zeigte sich eine tendenziell höhere MPO-Konzentration in LPLA2^{-/-} Tieren im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen. Am 4. Tag der Infektion lag die MPO-Konzentration in LPLA2^{-/-} Tieren durchschnittlich doppelt so hoch wie in den C57BL/6J Tieren, wodurch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen entstand (Abbildung 24).



Abbildung 24: Quantitative Analyse der MPO-Konzentration im Caecum von C57BL/6J und LPLA₂-/- Mäusen im Colitis-Modell

C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{/-} (schwarze Quadrate) Mäusen wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit $3x10^6$ Salmonellen infiziert wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet. Es wurde das Caacum entnommen, in 1 ml PBS homogenisiert und die Proteinkonzentration von MPO mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von vier bis fünf Tieren eines repräsentativen Experimentes aus drei Versuchsansätzen. *: p < 0,05; Mann-Whitney Test.

Für die immunhistologische Analyse wurden 4 μm dicke Paraffinschnitte mit einem anti-MPO Antikörper und einem rot-fluoreszierenden sekundären Antikörper, sowie anti-Salmonellen-LPS-Antikörper und einem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper gefärbt. Zur Orientierung wurden außerdem die Kerne der Zellen mit DAPI (blau) angefärbt (Abbildung 25, Abbildung 26).



Abbildung 25: MPO-positive Zellpopulationen im Lumen und der Mukosa infizierter Caeca von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen im Colitis-Modell

C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit $3x10^{6}$ Bakterien infiziert wurden. An Tag 4 wurden die Tiere getötet. Das Caecum wurde isoliert, in 4 % PFA fixiert und 4 µm dicke Paraffinschnitte wurden immunhistologisch mit anti-MPO (rot), anti-SL LPS (grün) und DAPI (blau) gefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme der Caeca von einem aus 5 Tieren in 630facher Vergrößerung. L: Lumen, M: Mukosa, gestrichelte Linie: Gewebegrenze, Größenbalken: 100 µm.

Anhand der immunhistologischen Färbung konnte die Infiltration an Neutrophilen genauer lokalisiert werden. Ein Großteil der neutrophilen Granulozyten war im Lumen (Abbildung 25) sowie der Submukosa (Abbildung 26) zu finden, während nur wenig Neutrophile in der Mukosa lokalisiert waren (Abbildung 25). In den immunhistologischen Schnitten erschien in der Submukosa des Caecums von LPLA₂^{-/-} Tieren ein höherer Anteil an MPO-positiven Zellen lokalisiert zu sein im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen (Abbildung 26). Dieser Eindruck entstand hingegen weder im Lumen noch in der Mukosa des Caecums beider Gruppen (Abbildung 25).



Abbildung 26: MPO.positive Zellpopulationen in der Submukosa des infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen im Colitis-Modell

C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäuse wurden mit 20 mg Streptomycin behandelt bevor sie 24 Stunden später oral mit $3x10^{6}$ Bakterien infiziert wurden. An Tag 4 wurden die getötet. Das Caecum wurde isoliert, in 4 % PFA fixiert und 4 µm dicke Paraffinschnitte wurden immunhistologisch mit anti-MPO (rot) und DAPI (blau) gefärbt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme der Caeca von zwei aus 5 Tieren an Tag 4 nach der Infektion in 630facher Vergrößerung. M: Mukosa, SM: Submukosa, MP: Muscularis propria, gestrichelte Linie: Gewebegrenze, Größenbalken: 100 µm.

3.2.3 LPLA₂^{-/-} Mäuse besitzen eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms im Darm

Im Verlauf der Arbeit stellte sich die Frage, ob eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms im Darm von LPLA₂^{-/-} Mäusen ursächlich für eine erhöhten Bakterienlast und IL-17A-Produktion im *S.* Tm-induzierten Colitis-Modell sein könnte. Um dies zu untersuchen wurde eine Mikrobiom-Analyse der Kotproben nicht infizierter C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Tiere, von Phillip Rausch (Arbeitsgruppe Evolutionsgenomik) vom Max-Planck-Institut für

Evolutionsbiologie (Plön), mittels 16S-rRNA-Sequenzierung durchgeführt. Zu Beginn der Analyse wurde der Datensatz auf eine durchschnittliche Sequenzanzahl von 4493,5 ±29,069 SD pro Probe normalisiert und eine durchschnittliche Abdeckung der Spezies innerhalb der bakteriellen Gemeinschaften von etwa 86 % erreicht (Good's coverage: 85,871±0,061 SD). Die Klassifizierung der Sequenzen auf Stamm- und Gattungsebene erfolgte über den *"RDP naive baysian classifier"* [224] unter Verwendung der Sequenzdatenbank *"RDP Trainset* 9" (modifiziert durch Patrick Schloss).

Die Vielfalt zweier Bakteriengemeinschaften kann auf unterschiedlichen Ebenen betrachtet werden. Bei der α -Diversität handelt es sich um die Artenvielfalt innerhalb einer Gemeinschaft, während die β-Diversität die Diversität zwischen zwei unterschiedlichen Gemeinschaften darstellt. In der hier gezeigten Untersuchung wurde zunächst mit der quantitativen Analyse der bakteriellen Großgruppen (Stamm) begonnen, in der keine Unterschiede in der Häufigkeit der vorkommenden Bakterienstämme zwischen C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen auftraten. Dies gilt sowohl für die dominanten Gruppen Bacteroidetes und Firmicutes (Abbildung 28 A), als auch für die weniger prominenten Bakteriengruppen (z.B. Proteobacteria, Deferribacteres, Abbildung 27 B). Betrachtet man die Verteilung, Zahl phylogenetische Verwandtschaft der Bakterien auf Gattungsebene und mit unterschiedlichen Modellen (Abbildung 28), zeigt sich konstant eine höhere Diversität in LPLA₂^{-/-} Mäusen (Shannon H: P=0,036, Chao1: P=0,012, Phylogenetische Diversität: P<0,005). Der Artenreichtum wird hierbei durch den Chao1-Index angegeben, wobei die phylogenetische Diversität auch die Verwandtschaft der Bakteriengattungen zueinander betrachtet, indem alle Astlängen eines phylogenetischen Stammbaums aufsummiert werden, die zu jedem einzelnen Mitglied der Gemeinschaft führen. Die Shannon Entropie misst die Gleichmäßigkeit der Verteilung der unterschiedlichen Arten in der Bakteriengemeinschaft und ist dabei sensitiv gegenüber der Anzahl selten gemessener Gattungen.

Im Gegensatz zu den oben genannten Modellen zeigt der Simpson Index keinen Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (Abbildung 28 B, Simpson (1-D): P= 0,190), wonach die niedrigere Diversität in C57BL/6J Mäusen nicht durch die Dominanz einiger weniger Bakterienarten verursacht wird (Abbildung 28 B). Der Simpson-Index gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei willkürlich gewählte Stichproben einer Bakteriengemeinschaft der gleichen Art angehören und ist dabei empfindlicher gegenüber Änderungen in den häufig vorkommenden Arten einer Bakteriengemeinschaft.



Abbildung 27: Quantitative Analyse der Großgruppen im Mikrobiom von C57BL/6J (WT) und LPLA2^{-/-} Mäusen

Die Analyse der Mikrobiota erfolgte in Kotproben von jeweils zehn C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen. Gezeigt ist die Anzahl an Sequenzen A) in dominanten und B) bei seltener vorkommenden Bakterienstämmen. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile von 10 Tieren.



Abbildung 28: Qualitative Analyse der α -Diversität im Mikrobiom von C57BL/6J (WT) und LPLA₂^{-/-} Mäusen

Die Analyse des Mikrobioms erfolgte in Kotproben von jeweils zehn C57BL/6J (WT) und $LPLA_2^{-/-}$ Mäusen. Die α -Diversität wurde auf Basis des Artenprofils einer jeden Kotprobe berechnet (Art-OTUs von Sequenzen mit 97 % iger Sequenzidentität). Gezeigt ist A) die Shannon Entropie, B) der Simpson Index, C) der Chao1 Artenreichtum und D) die phyloginetische Diversität. Dargestellt sind die Mediane und die Quartile von 10 Tieren.

Um die Unterschiede des Mikrobioms im Darm von C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} Mäusen näher zu beleuchten, wurden Analysen zur Differenzierung der Bakteriengemeinschaft auf Ebene der β -Diversität durchgeführt. Neben der gemeinsamen Präsenz einzelner Spezies in beiden Gruppen (Jaccard Koeffizient, Abbildung 29 A), wurde ebenfalls deren Häufigkeit (Bray-Curtis Koeffizient, Abbildung 29 B) und ihre phylogenetische Verwandtschaft berechnet (*unweighted & weighted* UniFrac, Abbildung 29 C und D). Jedes dieser Maße weist auf signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in beiden Mausgruppen hin (Jaccard: F_{1,18}= 1,787, *R*²=0,090, *P*<0,0001, Bray-Curtis: F_{1,18}= 2,646, *R*²= 0,128, *P*=0,0002, *unweighted* UniFrac:F_{1,18}= 2,395, *R*²= 0,117, *P*<0,0001, *unweighted*

UniFrac: $F_{1,18}$ = 3.489, R^2 = 0.162, P= 0,0074). Dieser Unterschied hält ebenfalls der Überprüfung durch formellere Tests stand. Diese Analysen beruhend auf Modellen, welche testen, ob sich die Verteilung der Bakteriengattungen beider Gemeinschaften nur aufgrund der unterliegenden Genotypen unterscheiden (*Redundanz Analyse* (RDA): $F_{1,18}$ = 3,393, R^2 = 0.180, P=0,0001; *Cononical Correspondence Analysis* (CCA): $F_{1,18}$ = 1,931, R^2 = 0.097, P=0,0002; Anhang 4).



Abbildung 29: Koordinaten-Analyse in der β -Diversität der Mikrobiota von C57BL/6J und LPLA₂-/-Mäusen

Die Analyse des Mikrobioms erfolgte in Kotproben von jeweils zehn C57BL/6J und LPLA₂-^{-/-} Mäusen. Dargestellt ist A) der Jaccard Koeffizient, B) der Bray-Curtis Koeffizient, sowie C) die *unweighted* und D) *weighted* UniFrac-Analyse. PCo: *Principal Coordinate*

3.2.4 Einfluss der LPLA₂ auf die Funktion von Makrophagen in der *in vitro* Infektion mit *S*. Tm

3.2.4.1 Verändertes Wachstum von *S.* Tm Δ*aroA* in LPLA₂-defizienten Makrophagen

Um die Gründe für die veränderte Immunantwort in der Salmonellen-induzierten Colitis in LPLA₂ defizienten Mäusen auf zellulärer Ebene weiter zu untersuchen, wurden *in vitro* Studien in LPLA₂-defizienten Makrophagen durchgeführt. Makrophagen sind nicht nur der Zelltyp mit der höchsten Expression an LPLA₂, sondern sie spielen auch eine zentrale Rolle bei einer Salmonellen-Infektion sowohl als Effektorzellen, als auch als Wirtszellen [60, 231].

Begonnen wurde mit der Analyse der Fähigkeit von BMMΦ aus C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} Mäusen das Überleben des *S*. Tm Wildtyp-Stammes SL1344 einzuschränken. Diese BMMΦ zeigen, bei LPLA₂-Defizienz, nicht die für Gewebsmakrophagen beschriebene Akkumulation von Phospholipiden und waren deshalb für die Überprüfung des direkten Einflusses der LPLA₂ auf das Salmonellenwachstum geeignet. 4 bis 9 Stunden nach der Infektion konnte ein Wachstum von *S*. Tm in BMMΦ festgestellt werden. Nach 24 bis 48 Stunden ging die Vitalität der Wirtszellen zurück, wodurch es zu einer Reduktion der Bakterienzahl kam. Es konnte kein Unterschied im Überleben von *S*. Tm in C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} BMMΦ festgestellt werden (Abbildung 30).





BMMΦ aus C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäusen wurden für 30 Min mit *S*. Tm WT infiziert und anschließend extrazelluläre Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert und Verdünnungsreihen auf Agar ausplattiert. Dargestellt sind die intrazellulären, vitalen Bakterien als CFU aus zwei unabhängigen Versuchen. MOI: A) 10, B) 1. Der 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni-Test ergab keine signifikanten Unterschiede.

Im Organismus spielen ausdifferenzierte Gewebsmakrophagen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, aber vor allem auch in der Gewebshomöostase und dem Gewebsumbau. Da der Phospholipidosephänotyp in LPLA₂^{-/-} Mäusen vor allem in Gewebsmakrophagen ausgeprägt ist, sollte das Überleben von *S*. Tm im nächsten Schritt in PMΦ untersucht

werden. Diese Zellen reagieren unter Zellkulturbedingungen, im Vergleich zu BMM Φ , empfindlicher auf die Infektion mit dem hoch virulenten Salmonellen WT-Stamm. Durch den schnellen Zelltod 4 bis 9 Stunden nach Infektion konnte das Wachstum dieses Stammes in PM Φ nicht zuverlässig gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde für dieses Experiment der attenuierte *S.* Tm-Stamm $\Delta aroA$ gewählt, der von sich aus keine aromatischen Aminosäuren bilden kann und somit in seinem Wachstum beeinträchtigt ist.



Abbildung 31: Intrazelluläres Überleben von S. Tm ΔaroA in PMΦ

PM Φ aus C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂-^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäusen wurden für 30 Min mit *S* Tm *ΔaroA* infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert und Verdünnungsreihen auf Agar ausplattiert. Dargestellt sind die intrazellulären, vitalen Bakterien als CFU aus zwei unabhängigen Versuchen A und B, von vier Experimenten. MOI: 5. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni-Test.

Im Gegensatz zu BMM Φ konnte in PM Φ in den ersten neun Stunden nach Infektion kein Wachstum, sondern eine Reduktion der Bakterienzahl festgestellt werden (Abbildung 31). Erst nach 24 Stunden wurde ein erneuter Anstieg der Bakterienzahl in LPLA₂^{-/-} PM Φ beobachtet, während die CFU in C57BL/6J PM Φ kontinuierlich weiter sank.

3.2.4.2 LPLA₂ ^{-/-} Makrophagen produzieren weniger KC nach Infektion mit *S.* Tm

Aufgrund des erhöhten Salmonellenwachstums in LPLA₂^{-/-} Makrophagen und der veränderten Zytokinproduktion in LPLA₂^{-/-} Mäusen, stellte sich die Frage, ob LPLA₂^{-/-} PMΦ eine veränderte Zytokin- oder Chemokinproduktion aufweisen. Um dies zu überprüfen wurde der Zellkulturüberstand aus den *in vitro* Überlebens-Tests (2.2.2.4 und 3.2.4.1) mithilfe des CBA analysiert.

Bei allen gemessenen Zytokinen konnte ein Anstieg in der Proteinkonzentration nach Infektion beobachtet werden (Abbildung 32). Während dabei die MCP-1 Konzentration kontinuierlich anstieg wurde die höchste Konzentration bei den anderen Zytokinen und Chemokinen bereits 24 Stunden nach Infektion gemessen und blieb bis 48 Stunden nach Infektion konstant (Abbildung 32). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration an MCP-1 zwischen Salmonellen-infizierten C57BL/6J und LPLA₂-^{/-} PMΦ zu einem der Untersuchungszeitpunkte und auch die signifikant niedrigere IL-10-Produktion 48 Stunden nach Infektion war in weiteren Versuchsansätzen nicht reproduzierbar (Abbildung 32 B und D).

Die Konzentration an TNF- α sowie KC in Zellkulturüberständen von LPLA₂^{-/-} PM Φ war hingegen sowohl 24, als auch 48 Stunden nach Infektion niedriger als bei C57BL/6J PM Φ (Abbildung 32 A und C). Dabei lag der KC-Proteingehalt zu beiden Zeitpunkten in den Überständen der C57BL/6J PM Φ jeweils doppelt so hoch wie in denen der LPLA₂^{-/-} PM Φ (Abbildung 32 C). Eine signifikant niedrigere TNF- α -Konzentration im Überstand von LPLA₂^{-/-} PM Φ konnte hingegen nur in 2 von 4 durchgeführten Versuchsansätzen gefunden werden.



Abbildung 32: Chemokin- und Zytokinproduktion von C57BL/6J und LPLA₂^{-/-} PM Φ nach *S*. Tm Δ *Aroa*-Infektion

PMΦ aus C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} (schwarze Quadrate) Mäusen wurden für 30 Min mit *S*. Tm Δ*Aroa* infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurde der Überstand der Zellen für eine Analyse von A) TNF-α, B) IL-10, C) KC und D) MCP-1, mittels CBA, verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten eines repräsentativen Versuchsansatzes von 4 Experimenten. Gepunktete Linie: Detektionslimit. MOI: 5. *: p < 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni-Test.

3.2.4.3 Die Chemo-/Zytokinproduktion in LPLA₂^{-/-} PMΦ ist nicht durch rekombinante LPLA₂ rekonstituierbar

Um zu prüfen, ob die erhöhte Bakterienlast sowie die geringere Produktion an KC in LPLA₂^{-/-} PMΦ durch rekombinante LPLA₂ rekonstituiert werden kann, wurde 12 Stunden vor der Infektion *in vitro* rekombinante LPLA₂ zu LPLA₂^{-/-} PMΦ gegeben und die Salmonelleninfektion durchgeführt. Auch nach Zugabe des Enzyms blieb die KC-Produktion sowie das Bakterienwachstum in LPLA₂^{-/-} PMΦ auf dem Level unbehandelter LPLA₂ defizienter PMΦ (Abbildung 33). Der Proteingehalt an KC im Zellüberstand in C57BL/6J PMΦ verdoppelte sich im Verhältnis zu LPLA₂^{-/-} PMΦ. Trotz LPLA₂-Gabe konnte ein erhöhtes Bakterienwachstum 24 bis 48 Stunden nach Infektion beobachtet werden (Abbildung 33 B).



Abbildung 33: Versuch der Rekonstitution des Bakterienwachstums sowie der KC-Produktion in $LPLA_2^{-/-}PM\Phi$ nach *S*. Tm $\Delta aroA$ infektion

Peritonealmakrophagen aus C57BL/6J (weiße Kreise) und LPLA₂^{-/-} Mäusen (schwarze Quadrate) sowie LPLA₂^{-/-} PM Φ nach Zugabe von 10 µg/ml rekombinanter LPLA₂ (schwarze Dreiecke) wurden für 30 Min mit *S*. Tm Δ *aroA* infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamycin abgetötet. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden A) die Zellen lysiert und Verdünnungsreihen auf Agar ausplattiert (Dargestellt sind intrazelluläre, vitale Bakterien) und B) der KC Proteingehalt im Überstand der Zellen mittels CBA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten eines Versuchsansatzes. MOI: 5. ***: p ≤ 0,001; 2-Wege ANOVA-Test mit Bonferroni-Test.

4 Diskussion

Die LPLA₂ ist primär in Gewebsmakrophagen exprimiert und trägt zum zellulären Abbau von Membranen und Surfactant bei [215]. LPLA2-Defizienz führt zu einer Akkumulation von Phospholipiden in den Lysosomen von Gewebsmakrophagen, wodurch charakteristische Einschlusskörperchen entstehen, die ein wesentliches Merkmal einer Phospholipidose darstellen [212]. Aufgrund der hohen Expression von LPLA₂ in AMΦ und ihrer Rolle beim Surfactant-Abbau konzentrierten sich bisherige Untersuchungen vor allem auf die Funktion des Enzyms in der Lunge [212, 213]. Einschränkungen in der adaptiven Immunantwort konnte in LPLA₂^{-/-} (KO) Mäusen bereits für die Infektion mit dem Lungenpathogen M. tuberculosis gezeigt werden. Die Tiere wiesen eine geminderte Stimulation Antigenspezifischer TH1-Zellen auf, was eine erhöhte Bakterienlast im Gewebe zur Folge hatte [219]. Diese Beeinträchtigung ist vermutlich auf die eingeschränkte Funktion von LPLA2-KO Makrophagen zurückzuführen, die im Vergleich zu WT Makrophagen Probleme haben Antigen-spezifische T-Zellen effizient zu aktivieren oder zu rekrutieren [219]. Neben ihrer Rolle als APZ sind Makrophagen als wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems vor allem für die Eliminierung eingedrungener Pathogene und die Produktion von Zytokinen verantwortlich. Einschränkungen ihrer antimikrobiellen Effektorfunktionen aufgrund einer LPLA2-Defizienz könnten relevant für akute Infektionen sowohl mit intra- als auch extrazellulären Erregern sein. Die Bedeutung der LPLA₂ in der angeborenen Immunantwort, sowie ihre Funktion außerhalb des Atmungstraktes sind bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurde die Rolle des Enzyms in der Immunantwort gegen extrazelluläre Pneumokokken in der Lunge und gegen fakultativ intrazelluläre Salmonellen im Darm untersucht. Für letzteres wurden zwei verschiedene Mausmodelle ausgewählt, der S. Tminduzierte Typhus sowie ein Colitis-Modell. Alle gewählten Infektionen sind akute Modelle und bilden damit vor allem die angeborene Immunantwort ab.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die LPLA₂ für die Immunantwort gegen Pneumokokken keine Rolle spielte, während ihr Fehlen die Entzündung und das Bakterienwachstum in der Salmonellen-induzierten Colitis, jedoch nicht im Typhus-Modell, beeinflusste. Einer erhöhten Bakterienlast und verstärkten Infiltration von Neutrophilen im Darm LPLA₂-defizienter Mäuse im Colitis-Modell ging eine erhöhte IL-17-Konzentration voraus. Inwiefern die beobachteten Unterschiede im Infektionsverlauf bei LPLA₂-defizienten Mäusen mit einer veränderten Reaktion von LPLA₂-KO Makrophagen oder lymphoider Zellpopulationen im Darm der KO Tiere in Verbindung steht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.1 Die Abwesenheit funktioneller LPLA₂ beeinflusst die akute Pneumokokken-induzierte Pneumonie nicht

Die Konsequenzen der LPLA₂-Defizienz für die Infektion mit extrazellulären bakteriellen Erregern der Lunge sind bisher unbekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein akutes *S. pneumoniae* Pneumonie-Modell verwendet, um den Einfluss der LPLA₂ auf die angeborene Immunantwort extrazellulärer Erreger zu analysieren.

Lange bekannt ist die antimikrobielle Wirkung der sPLA₂ gegen extrazelluläre Gram-positive Bakterien wie Listeria monocytogenes und Staphylococcus aureus [232, 233]. Die antibakterielle Funktion beruht auf der Eigenschaft, Phospholipide der Bakterienmembran zu hydrolysieren, wobei die spezifische antibakterielle Wirkung von der positiven Ladung der Enzyme abhängig ist [233, 234]. Es wurde gezeigt, dass die LPLA₂ ebenfalls sezerniert werden kann und auch bei neutralem pH-Wert eine geringe Enzymaktivität besitzt [209, 216]. So kann sie theoretisch auch außerhalb der Zelle Bakterienmembranen angreifen. Abgesehen direkten Effekt sind auch indirekte Effekte von einem durch veränderte Umgebungsbedingungen oder Veränderung der angeborenen Immunantwort denkbar. Durch eine Behinderung des Surfactant-Abbaus aufgrund einer LPLA₂-Defizienz, verändert sich die Lipidzusammensetzung in der Lunge [212]. Dadurch könnten LPLA₂-KO Tiere extrazellulären Lungenpathogenen andere Umgebungsbedingungen bieten als WT Mäuse. Auch ein Einfluss der veränderten Lipidzusammensetzung im Surfactant auf die Effektorfunktionen von Makrophagen ist denkbar. Berichte zeigen, dass der Surfactant Ersatzstoff Surventa und andere Surfactant-ähnliche Lipide die Phagozytose von S. pneumoniae durch AMO behindern können [235]. In vivo konnte zudem in Lungen neugeborener Kaninchen nach Behandlung mit künstlichem Surfactant eine verminderte Fähigkeit Gruppe-B-Streptokokken zu eliminieren beobachtet werden [236].

In der hier durchgeführten Arbeit konnte ich weder einen Unterschied bei der Aufnahme oder Abtötung der extrazellulären Pneumokokken zwischen KO und WT PMO in vitro, noch einen veränderten Krankheitsverlauf der Pneumokokken-induzierten Pneumonie zwischen LPLA₂-KO und WT Mäusen in vivo feststellen. Die hohe Pneumokokken-Last an Tag 1 nach Infektion in der Lungenlavage und dem Lungengewebe von bis zu 4x10⁷ Pneumokokken in beiden Gruppen wurde im Infektionsverlauf bis Tag 3 um drei bis fünf logarithmische Stufen reduziert. Ein direkter Einfluss der LPLA2-Defizienz auf die Pneumokokken in der Lunge ist demnach unwahrscheinlich und auch die Abtötung der Bakterien in Makrophagen ist durch die LPLA₂-Defizienz nicht beeinflusst. Dass der verminderte Abbau des Lungensekrets ebenfalls keine Auswirkungen auf den Infektionsverlauf in LPLA2-KO Tieren zeigte, kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte der Einfluss einer veränderten Phospholipidzusammensetzung im Surfactant in KO Tieren bei einem ansonsten funktionierenden Immunsystem von untergeordneter Bedeutung sein. Zum anderen könnte sich ein verminderter Abbau des Lungensekrets auch erst in älteren LPLA₂-defizienten Tieren auf eine Infektion mit Lungenkeimen auswirken. Eine deutliche Veränderung des Phospholipidgehalts im Surfactant der Lunge wurde in einjährigen LPLA₂-KO Mäusen beobachtet [212], wohingegen die hier verwendeten Tiere 3 bis 4 Monate alt waren.

Auch wenn die LPLA₂ für die Immunantwort gegen eine akute Pneumokokken-induzierte Pneumonie in den hier durchgeführten Untersuchungen keine Relevanz hatte, ist ein Einfluss z.B. auf die mukosale Immunantwort im Nasenrachenraum bei einer chronischen Besiedlung denkbar. Im Gegensatz zu der schnellen Reduktion der Pneumokokken in der Lunge konnte eine langsamere Abnahme der Bakterienlast im Nasenrachenraum in beiden untersuchten Mausgruppen festgestellt werden, was für eine stabile Besiedelung der Tiere spricht. Ob es im Rahmen einer langfristigen Besiedlung von LPLA₂-KO Tieren zu einer Veränderung im Infektionsverlauf kommt, ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit und müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.2 Die LPLA₂ nimmt Einfluss auf den Verlauf einer Salmonelleninduzierten Colitis, nicht aber auf die systemische Salmonellen-Infektion

Die Auslösung einer Salmonellen-Colitis nach Gabe von Streptomycin wurde 2003 von Barthels et al. als Mausmodell eingeführt [87]. Dabei geht eine hohe Bakterienlast einher mit einer starken Entzündung im Caecum, die durch Infiltrationen der Mukosa und Submukosa mit Entzündungszellen, der Formation von Krypt-Abszessen und einer Ödembildung in der Submukosa charakterisiert ist [87]. Dieser Verlauf der Salmonellen-induzierten Colitis war in der vorliegenden Arbeit sowohl bei WT als auch bei LPLA2-KO Mäusen zu beobachten. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen zeigte sich jedoch in der Anzahl der Salmonellen im Darm. KO Tiere entwickelten 4 Tage nach der Infektion in allen drei Darmabschnitten sowie den mesenterialen Lymphknoten (MLK) eine höhere Salmonellenlast. Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied in der Salmonellenlast oder den pathologischen Veränderungen zwischen beiden Mausgruppen im Typhus-Modell beobachten werden. In diesem seit Jahrzehnten verwendeten Mausmodell resultierte die Infektion mit S. Tm, im Einklang mit Literaturangaben für WT-Mausstämme [237, 238], in den meisten WT und LPLA₂-KO Tieren bereits 2 Tage nach Infektion in einer Besiedlung von Leber und Milz. Dabei entwickelten sich keine bis wenig Anzeichen einer Entzündung im Darm [66]. Das Bakterienwachstum um mindestens zwei logarithmische Stufen an Tag 4 der Infektion in den systemischen Organen stand ebenfalls im Einklang mit früheren Beobachtungen in WT-Mausstämmen [237, 238]. Auch wenn es nur bei wenigen Tieren zu einer geringen Entzündungsreaktion kam, waren im Typhus-Modell alle drei untersuchten Darmabschnitte konstant mit ca. 10⁴ CFU besiedelt. Bezüglich der Keimlast konnte jedoch in keinem der untersuchten Organe ein Unterschied zwischen LPLA₂-KO und WT Tieren festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass das Fehlen der LPLA₂ einen maßgeblichen Einfluss auf die entzündliche mukosale Immunantwort hat, jedoch keine Rolle in der systemischen Salmonellen-Infektion spielt.

4.2.1 Ein vermehrtes Wachstum der Salmonellen in KO Mäusen korreliert mit einer verstärkten Rekrutierung von Neutrophilen im Caecum

Die signifikant höhere Bakterienlast in allen Abschnitten des Darms und den MLK der LPLA₂-KO Tiere 4 Tage nach Salmonellen-Infektion im Colitis-Modell hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Mäuse. Beide untersuchten Mausgruppen erreichten nach 5 bis 7 Tagen den moribunden Zustand. Dies stand im Einklang mit Literaturangaben für die Salmonellen-Infektion in C57BL/6 Mäusen [239]. Vermutlich wurde der moribunde Zustand vor allem durch die systemische Ausbreitung der Bakterien und der damit einhergehenden Gewebszerstörung durch massive Entzündungen in den Organen herbeigeführt [66, 239], die gleichermaßen in WT und KO Tieren zu finden war. Es konnte jedoch ein Einfluss der Besiedlung des Darms auf die einwandernden inflammatorischen Zellen beobachtet werden. Die größere Salmonellenlast im Darm und den MLK der LPLA2-KO Mäuse ging einher mit einer signifikant höheren Anzahl an Neutrophilen im Caecum der Tiere an Tag 4 der Infektion, welche sowohl über die Charakterisierung Ly6G⁺ GR1⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie als auch über die Proteinmenge an MPO im Organlysat nachweisbar war. Diese Beobachtung könnte mit der Interaktion der Salmonellen mit Epithelzellen in Zusammenhang stehen. Die Erkennung der Salmonellen durch diese Zellen führt zu der Produktion von IL-8 und dem Eicosanoid Hepoxilin A(3) [144, 240-242] sowie der Lösung der epithelialen Tight Junctions [149], wodurch die Einwanderung von Neutrophilen in das Darmlumen erleichtert bzw. verstärkt wird. Eine erhöhte Anzahl an Salmonellen im Darm von LPLA₂-KO Mäusen könnte somit die vermehrte Infiltration von Neutrophilen gefördert haben.

Welche Rolle Neutrophile in der Salmonellen-Infektion spielen, ist bisher nicht endgültig geklärt. Im systemischen Infektionsmodell wurde aufgrund der hohen Suszeptibilität von Mäusen ohne funktionelle neutrophile Granulozyten gegenüber Salmonellen meist auf einen essentiellen Beitrag dieser Zellen zur Kontrolle der Infektion geschlossen [239, 243–245]. Spees et al. schlussfolgerten kürzlich aus der Beobachtung einer erhöhten Bakterienlast in Milz und Leber von Mäusen nach Neutrophilen-Depletion in der Salmonellen-induzierten Colitis ebenfalls auf eine schützende Wirkung dieser Zellen gegenüber der systemischen Ausbreitung des Erregers [246]. Dies wird indirekt durch eine Untersuchung in IL-17-Rezeptor-defizienten (II-17ra^{-/-}) Tieren im Colitis-Modell unterstützt, in der die reduzierte Einwanderung von Neutrophilen im Darm der Mäuse mit einer erhöhten Bakterienlast in MLKs und Milz korrelierte [172]. Im Gegensatz zu den Literaturangaben waren in den hier untersuchten LPLA2-KO Mäusen mehr Neutrophile im Caecum zu beobachten als bei WT Tieren, was jedoch mit einer höheren Salmonellenlast in den MLKs an Tag 4 der Infektion korrelierte. Die postulierte protektive Wirkung der Neutrophilen bei der systemischen Verbreitung der Salmonellen im Colitis-Modell bestätigt sich in dem hier untersuchten Modell demnach nicht. In zukünftigen Studien sollte die Rolle der LPLA₂ in Neutrophilen näher beleuchtet werden.

Neben der fehlenden schützenden Wirkung der Neutrophilen in LPLA₂-KO Tieren auf die systemische Ausbreitung der Salmonellen konnte die massive Infiltration dieser Immunzellen 2 Tage nach Infektion auch eine weitere Vermehrung der Bakterien im Darm der Mäuse nicht verhindern. Letztere Beobachtung war konsistent mit der anderer Gruppen. In Streptomycin-behandelten Mäusen konnten bereits innerhalb von 10 Stunden nach Infektion Neutrophile im Lumen des Darms nachgewiesen werden [82, 247], wobei die Bakterienzahl mindestens für weitere 4 Tage nach der Infektion anstieg [248]. Dies spricht für einen eher geringen Beitrag der Neutrophilen zur Eliminierung der Salmonellen im Darm. Loetscher et al. stellten sogar die Hypothese auf, dass Neutrophile zur Vermehrung der Salmonellen mit Neutrophilen im Darm beitragen [230]. Sie konnten eine Assoziation der Salmonellen mit Neutrophilen im Darmlumen nachweisen, die den Erreger im Darm vor Antibiotika-Behandlungen schützten. Aus dieser Beobachtung resultierte die These, dass Neutrophilen den Salmonellen eine Nische zur Vermehrung im Darm bieten, die sie vor antimikrobiellen Faktoren schützt, die Bakterien jedoch nach der geringen Lebensspanne der Neutrophilen von maximal ein bis zwei Tagen in das Lumen des Darms entlassen werden [230].

Auch die Effektorfunktionen der Neutrophilen könnten zu der höheren Bakterienlast im Caecum beitragen. Durch die Ausschüttung antimikrobiell wirkender ROS durch Neutrophile werden aus Thiosulfaten Tetrathionate hergestellt. Diese dienen Salmonellen als Elektronen-Akzeptoren in der anaeroben Atmung und ermöglichen ihnen in dem Sauerstoff-limitierten Umfeld einer Entzündung im Colitis-Modell effektiver Energie zu produzieren als die meisten kommensalen Bakterien, die kein Tetrathionat fermentierten können [249, 250]. Auch die antimikrobielle Funktion der Sauerstoffradikale, im Zusammenspiel mit der von sezernierten AMPs, kann zu der Vermehrung der Salmonellen im Darm beitragen. AMPs wirken nicht nur auf Salmonellen, die gegen viele dieser Effektorfunktionen eine hohe Resistenz besitzen [251–253], sondern schädigen auch die Mikrobiota des Darms. Dadurch wird die Zusammensetzung des Mikrobioms verändert und es entstehen neue Nischen für die Vermehrung der Salmonellen [254]. Somit könnte die vermehrte Anzahl an Neutrophilen im Caecum sowohl durch ihre Effektormechanismen, als auch über ihre Funktion als schützende Nische für die Salmonellen, die erhöhte Vermehrung des Erregers im Darm von LPLA₂-KO Tieren gefördert haben. Ob das stärkere Salmonellenwachstum im Darm zu der höheren Anzahl an Neutrophilen im Caecum der LPLA₂-KO Tier geführt hat oder vice versa, lässt sich aufgrund der zeitlichen Überschneidung nicht klären. Wahrscheinlich ist, dass sich beide Mechanismen gegenseitig bedingen und eine stärkere Vermehrung der Salmonellen im Caecum der KO Tiere zu einer vermehrten Infiltration von Neutrophilen führte, was wiederum ein Wachstum der Salmonellen zur Folge hatte. Der höhere Anteil an Neutrophilen, der anhand der immunhistologischen Färbung überwiegend in der Submukosa des Caecums nachgewiesen wurde, deutet allerdings darauf hin, dass die Vermehrung der Salmonellen im Darm vor allem zu der Rekrutierung von Neutrophilen in die Submukosa beigetragen hat. Dieser Eindruck könnte jedoch auch dadurch entstanden sein, dass der Darminhalt während der Aufarbeitung der Proben häufig nicht quantitativ erhalten blieb und so die ursprüngliche Anzahl der Neutrophilen im Darmlumen nicht verglichen werden kann.

Da Neutrophile durch ihre Effektorfunktionen zur Zerstörung des Gewebes und pathologischen Veränderungen im Caecum beitragen [64, 246], ließ der erhöhte Anteil dieser Zellen ebenfalls eine stärkere Pathologie im Darm der LPLA2-KO Tiere vermuten. Im Widerspruch dazu steht allerdings, dass bei WT und KO Mäusen an Tag 4 der Infektion keine unterschiedlichen pathologischen Veränderungen im Caecum beobachtet werden konnte. Die Pathologie war an Tag 2 der Infektion in KO Mäusen sogar schwächer (Abbildung 17). Dass generell keine stärkere Entzündung im Caecum der LPLA₂-KO Mäuse festgestellt wurde, könnte der Zusammensetzung des Bewertungssystems geschuldet sein. Die meisten Faktoren waren am 4. Tag der Infektion bereits maximal ausgeprägt, was in einer bereits sehr hohen Bewertung (bis zu 17 von 23 Punkten) resultierte. Bestimmte pathologische Veränderungen wie Lymphozytenaggregate, die zu einer maximalen pathologischen Bewertung geführt hätten, wurden nicht beobachtet. Die Bewertungsmatrix könnte für eine stark ausgeprägte Entzündung nicht ausreichend fein unterteilt gewesen sein, um noch einen Unterschied im Grad der Entzündung festzustellen. Als zusätzliche Kriterien sollten in zukünftigen Analysen andere Entzündungsindikatoren, wie z.B. die Lipocalin-2-Expression, herangezogen werden.

4.2.2 Der Einfluss des geringeren Anteils an DZs und NK-Zellen und ihrer Zytokine in Salmonellen infizierten LPLA₂-KO Mäusen

Im Gegensatz zu der größeren Anzahl an Neutrophilen konnte ein kleiner Anteil lebender Zellen bzw. lebender CD45⁺ Zellen in beiden Mausgruppen als NK-Zellen (<1 %) bzw. DZs (1-2 %) identifiziert werden. Dabei war der Anteil an beiden Zellpopulationen in LPLA₂-KO Mäusen an Tag 4 der Infektion in der Colitis signifikant niedriger als in WT Tieren. DZs können auf der Epithelseite apikal Salmonellen über Zellausläufer aufnehmen, spielen aber im Verlauf der Infektion vor allem eine Rolle als APZ für die Aktivierung von Antigenspezifischen T-Zellen und bei der Produktion von Zytokinen [255]. In der akuten Phase der Infektion bis Tag 4 ist jedoch kein großer Beitrag Antigen-spezifischer T-Zellen zur Immunantwort zu erwarten. In den hier beschriebenen Untersuchungen zeigte vor allem die gleichbleibenden Anzahl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, dass die Proliferation und Einwanderung von T-Zellen bis Tag 4 der Infektion in beiden Mausgruppen noch nicht fortgeschritten war. Somit war die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen durch DZs für die Eliminierung der Salmonellen in der veränderten Immunität der LPLA2-KO Mäuse vermutlich von untergeordneter Bedeutung. Durch ihre wichtige Rolle für die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und IL-12 in der frühen Phase einer Salmonellen-Infektion [139] könnte die im Darm der KO Mäuse beobachtete geringere Anzahl an DZs jedoch zur verminderten Kontrolle des Salmonellenwachstums beigetragen haben. In den bisherigen Untersuchungen wurde allerdings keines dieser Zytokine betrachtet, wodurch hier kein Zusammenhang hergestellt werden kann.

Die Rolle von NK-Zellen in der Immunantwort gegen Salmonellen ist bereits mehrfach untersucht worden [256–259]. NK-Zellen haben einen Einfluss sowohl auf die Entzündung im

Darm als auch den Verlauf der systemischer Infektionen [260, 261]. Die Depletion dieser lymphoiden Zellpopulation in C57BL/6 Mäusen führte in der Salmonellen-Infektion zu einer stärkeren Vermehrung der Bakterien im Darm, die um den Faktor 1000 höher war als bei Mäusen mit funktionierenden NK-Zellen bei deutlich reduzierten Anzeichen einer Entzündung [259]. Diese Effekte wurden vor allem darauf zurückgeführt, dass NK-Zellen, zusammen mit anderen lymphoiden Zellen, eine der wichtigsten frühen Quellen für IFN-γ darstellen [260, 261]. Die IFN-γ Produktion ist in der hier untersuchten Salmonellen-induzierten Colitis im Caecum zwischen LPLA₂-KO und WT Mäusen vergleichbar. Lediglich im Serum konnte in einem von drei Versuchsansätzen eine reduzierte Proteinmenge an IFN-γ nachweisen werden. Daraus lässt sich schließen, dass NK-Zellen und von ihnen produziertes IFN-γ für die beobachteten Unterschiede zwischen KO und WT Mäusen von untergeordneter Bedeutung sind. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein verminderter Anteil an NK-Zellen oder DZs im Caecum von KO Mäusen zu der erhöhten Bakterienlast an Tag 4 beigetragen hat.

IFN-y aktiviert insbesondere Makrophagen und Epithelzellen und spielt somit eine zentrale Rolle in der Immunantwort gegen Salmonellen. Ohne IFN-γ kommt es zu einem erhöhten Bakterienwachstum und frühen Versterben der Versuchstiere [150, 151, 262]. Wie oben bereits erwähnt, konnte im Vergleich zu WT Mäusen in den LPLA2-KO Tieren mit erhöhter Bakterienlast im Darm keine veränderte IFN-y Konzentration gemessen werden. Zudem wurde keine eindeutig niedrigere TNF- α -Expression in KO Tieren nachgewiesen. Da IFN- γ und TNF- α zur Aktivierung von Makrophagen essentiell sind, ist eine verminderte Aktivierung der Makrophagen in KO Tieren für die erhöhte Bakterienlast im Darm in der Salmonelleninduzierten Colitis unwahrscheinlich. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe im Tuberkulose-Modell. LPLA₂-KO Mäuse wiesen nach Infektion mit *M. tuberculosis* deutlich geringere Proteinlevel an IFN-y und TNF- α in Lunge und Milz auf, als WT Tiere, woraus eine verminderte Aktivierung der Makrophagen und damit eine schlechtere Eliminierung der Erreger abgeleitet wurde [219]. Jedoch wurde dieser Phänotyp zu späteren Zeitpunkten, 20 Tage nach Infektion, und nicht in den ersten beiden Wochen beobachtet. Zudem lässt sich der Infektionsverlauf mit unterschiedlichen Erregern nur schwer vergleichen.

Somit ist die Rolle des geringeren DZ- und NK-Zell-Anteils sowie der von ihnen produzierten Zytokine bei der Salmonellen-induzierten Colitis in LPLA₂-KO Mäusen weiterhin unklar. Vermutlich spielen sie bei dem veränderten Infektionsverlauf im Caecum von KO Tieren eine untergeordnete Rolle, ein Einfluss dieser Zellen ist jedoch nicht komplett auszuschließen.

4.2.3 Die Bedeutung von IL-17 in LPLA₂-KO Mäusen

Neben IFN- γ und TNF- α wurde auch IL-17 in den letzten Jahren als wichtiges Zytokin in der schützenden Immunantwort gegen *Salmonella* identifiziert. Dies gilt vor allem bei der lokalen Salmonellen-induzierten Colitis, in der IL-17 bereits wenige Tage nach Infektion im Darm exprimiert wird [157, 172, 263]. Ferner entwickelten Salmonellen-infizierte *Il-17ra*^{-/-}

Mäuse eine höhere Bakterienlast als WT Tiere, was die protektive Wirkung von IL-17 gegenüber der Salmonellen-induzierten Colitis verdeutlicht [172]. In den hier beschriebenen Untersuchungen konnte ein schneller Anstieg der IL-17-Produktion vor allem bei LPLA₂-KO Tieren beobachtet werden, während er bei WT Mäusen zeitverzögert erst am 4. Tag der Infektion gemessen wurde (Abbildung 18 D und Abbildung 20 C). Die im Vergleich zu WT Mäusen höhere IL-17-Expression im Caecum an Tag 2 konnte sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Auch nach Anstieg der IL-17-Expression in WT Tieren 4 Tage nach Infektion blieb die IL-17-Konzentration im Serum der KO Mäuse signifikant erhöht. Ein Defizit an IL-17 wurde im Colitis-Mausmodell mit II-17ra-/- Mäusen bisher mit einer verstärkten systemischen Ausbreitung der Salmonellen in MLK, Milz und Leber in Verbindung gebracht [172]. Im Gegensatz zu diesen Berichten konnte in LPLA₂-KO Tieren mit erhöhter IL-17-Produktion im Caecum weder an Tag 2 noch an Tag 4 der Infektion eine verminderte Dissemination der Bakterien in Leber oder Milz beobachtet werden. In den MLK von KO Tieren wurde im Vergleich zu WT Mäusen sogar eine signifikant höhere Salmonellenlast nachgewiesen. Dass weder die oben beschriebene höhere Anzahl Neutrophiler, noch die höhere IL-17 Konzentrationen im Caecum eine Auswirkung auf die systemische Ausbreitung der Bakterien hatten, sehr wohl aber auf die lokale Vermehrung im Darm, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ein Fehlen der LPLA₂ vor allem die lokale, mukosale Immunantwort verändert. Dies wird unterstrichen durch ausbleibenden Effekte der erhöhten IL-17-Produktion in LPLA₂-KO Tieren im systemischen Typhus-Modell (Abbildung 14 D).

Ein Hinweis darauf, dass vor allem die lokale, mukosale Immunantwort durch die LPLA₂-Defizienz betroffen ist, liefert auch die Betrachtung der IL-17-Effektorfunktionen. IL-17 ist an der Rekrutierung von Immunzellen und Aktivierung sowie Koordination der mukosalen Immunantwort beteiligt, z.B. der Produktion von Chemokinen und AMPs [264]. Durch Stimulierung der IL-8- bzw. KC-Sezernierung in Epithelzellen führt IL-17 zur Rekrutierung von Neutrophilen [265–267]. Die IL-17 bedingte Induktion des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) bewirkt zudem die Granulopoese der Granulozyten [268, 269]. Beides könnte in LPLA₂-KO Mäusen zu einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen beigetragen haben. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine höhere KC-Produktion in LPLA₂-KO Mäusen im Vergleich zu WT Tieren gemessen werden (Abbildung 18 C und Abbildung 19 A). Auch MIP-2 wird durch IL-17 induziert und trägt zu der Infiltration von Neutrophilen bei [267, 270]. Dieses Chemokin wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht weshalb keine Aussage über die Auswirkung der erhöhten IL-17-Produktion auf MIP-2 getroffen werden kann.

Der zeitliche Verlauf der Infektion in LPLA₂-KO Mäusen legt nahe, dass die höhere IL-17-Konzentration neben der Infiltration von Neutrophilen auch die Vermehrung der Salmonellen im Darm gefördert hat. Die vermehrte Induktion von IL-17 im Caecum der LPLA₂-KO Tiere wurde bereits an Tag 2 der Infektion gemessen, während das stärkere Salmonellenwachstum sowie der höhere Anteil an Neutrophilen erst an Tag 4 beobachtet wurde. Unterstützt wird diese Vermutung durch Literaturangaben zu IL-17-Effektormechanismen. Es konnte in unterschiedlichen Zellinien, inklusive Fibroblasten und Epithelzellen gezeigt werden, dass IL-17 die Produktion von Lipocalin-2 oder AMPs, wie Defensinen, in Epithelzellen steigert [271–275]. Dies geschieht teilweise in Synergie mit IL-22 und TNF- α [271–275]. Salmonellen sind unempfindlicher als kommensale Bakterien des Darms gegen Lipocalin-2 [276, 277], das durch Abfangen von Siderophoren die bakterielle Eisenaufnahme und somit das Wachstum von Bakterien hemmt [278–280]. Durch diese und andere Resistenzen [251–253] haben Salmonellen einen Vorteil gegenüber den kommensalen Bakterien des Darms, wodurch sich die Pathogenität des Erregers erhöht [254]. Somit fördert IL-17 über die Induktion von AMP und Lipocalin-2 zusammen mit der oben beschriebenen Salmonellen-induzierten Infiltration der Neutrophilen die Entzündungsreaktion und so das Wachstum von Salmonellen im Darm [249, 254, 281]. Über diese mukosalen Abwehrmechanismen könnte demnach die höhere Konzentration an IL-17 im Caecum von LPLA₂-KO Tieren mit der höheren Salmonellenlast im Darm in Verbindung stehen.

Ein jüngerer Bericht steht jedoch im Gegensatz zu allen anderen bisherigen Studien über den Beitrag von IL-17 zu der Salmonellen-induzierten Colitis [282]. In dieser Untersuchung konnte weder eine veränderte Bakterienlast im Darm oder systemischen Organen, noch Unterschiede in IL-17-induzierter Geneexpression in IL-17-defizienten Mäusen nachgewiesen werden [282]. Diese Untersuchungen wurden allerdings vor allem mit einer attenuierten *S.* Tm Mutante durchgeführt, die nur eins von zwei T3SS besitzt. Die Abwehr gegen attenuierte Salmonellen unterscheidet sich von der gegen virulente Stämme, was die Unterschiede zu bisherigen Untersuchungen erklären könnte.

Es stellte sich nun die Frage, welche Zellen für die erhöhte IL-17-Produktion in LPLA₂-KO Tieren verantwortlich sind und wie diese durch den Verlust der LPLA₂ beeinflusst sein könnten. Als IL-17-Produzenten werden neben TH17-Zellen vor allem invariante NKT-Zellen, γδT-Zellen und NK-Zellen beschrieben, interessanterweise sollen aber auch Neutrophile dazu beitragen [104, 132, 283]. Abgesehen von TH17-Zellen und γδT-Zellen ist der Beitrag dieser Zellpopulationen zu der Produktion von IL-17 in der Salmonellen-Infektion bisher noch unbekannt, konnte aber in Infektionen mit Toxoplasma gondii für NK-Zellen [108] sowie in LPS-induzierten Entzündungen der Atemwege für NKT-Zellen und Neutrophile nachgewiesen werden [284, 285]. Während der Salmonellen-induzierten Colitis wurden vor allem CD4⁺ TH17-Zellen als IL17-Produzenten identifiziert [172, 228]. Da es sich in der vorliegenden Arbeit, wie auch in den anderen Berichten [157, 172, 228], um eine schnelle Induktion von IL-17 in der intestinalen Mukosa handelt, sind klassisch aktivierte TH17-Zellen der adaptiven Immunantwort als Quelle unwahrscheinlich [172, 263]. Bereits 24 Stunden nach Infektion wurden IL-17-produzierende CD4⁺ T-Zellen im Caecum von Mäusen gefunden, deren IL-17-Produktion auf einen NOD-Rezeptor-abhängigen Mechanismus zurückgeführt wurde [228]. Das frühe Auftreten der Zellen sowie die Beteiligung der invarianten Rezeptoren sprechen dafür, dass es sich bei den T-Zellen um Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort handelt. Es gibt auch Berichte über γδT-Zellen sowie CD4 CD8 T-Zellen, die in der Salmonellen-induzierten Colitis zu der Produktion von IL-17 beitrugen [229, 286]. voT-Zellen wurden als IL-17 Quelle auch in Infektionen mit E. coli, L. monocytogenes und M. tuberculosis beschrieben [287–289]. Keiner dieser Zellpopulationen konnte zum Zeitpunkt der erhöhten IL-17-Produktion vermehrt an Tag 2 der Salmonellen-Infektion in LPLA₂-KO Tieren beobachtet werden (Abbildung 22). CD4⁺ T-Zellen, die am wahrscheinlichsten zu der IL-17 Produktion im Caecum beigetragen haben, waren in beiden Gruppen gleichermaßen vorhanden und nur bei dem Anteil der voT-Zellen konnte ein leichter, nicht signifikanter Anstieg in der Infektion beobachtet werden. NKT-Zellen (CD3⁺, NK1.1⁺) konnten überraschenderweise in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang 2). Dadurch war ein Vergleich zu bisherigen Untersuchungen in LPLA₂-KO Mäusen, in denen eine reduzierte Anzahl an NKT-Zellen in Milz, Leber und Thymus gefunden wurde, nicht möglich [290]. Lediglich der tendenziell höhere Anteil an Neutrophilen an Tag 2 der Infektion könnte in KO Tieren mit dem höheren IL-17-Level im Caecum in Verbindung gebracht werden. Diese Untersuchungen geben jedoch keinen Aufschluss darüber, ob einige der genannten Zellpopulationen bei gleicher Anzahl vermehrt IL-17 produzieren. In weiteren Untersuchungen würde vor allem die Identifizierung der IL-17-produzierenden Zellen Aufschluss darüber geben, ob die frühe Expression an IL-17 in LPLA₂-KO Mäusen z.B. auf Neutrophile oder einen größeren Anteil IL-17-produzierender T-Zellen im Darm der KO Mäuse zurückzuführen ist.

Ein möglicher Mechanismus könnte eine frühere Stimulation der vorhandenen IL-17produzierenden Zellen durch IL-23 und/oder IL-1ß darstellen, zwei synergistisch IL-17induzierende Zytokine [229, 286, 291, 292]. Dadurch könnte es in LPLA₂-KO Mäusen zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-17 gekommen sein. Die Anzahl der myeloiden Zellen gibt jedoch darauf keinen Hinweis. Die Anzahl der Makrophagen und inflammatorischen Monozyten sowie der DZs, die Hauptproduzenten von IL-1 β und IL-23 sind [291, 293–299], war an Tag 2 der Infektion im Caecum beider Versuchsgruppen vergleichbar. Um diese Theorie zu überprüfen, wäre in kommenden Untersuchungen die Quantifizierung dieser Zytokine bzw. der sie produzierenden Zellpopulationen im Caecum der Mäuse nötig. In diesem Zusammenhang könnte ebenfalls die Produktion des Lipidmediators PGE2 interessant sein. PGE2 kann durch die Erhöhung der IL-1β und IL-23-Sekretion ebenfalls die Produktion von IL-17 unterstützen [300–303]. In der vorliegenden Arbeit war jedoch die Quantifizierung von PGE2 nicht möglich, da dies eine aufwendige Aufreinigung der Organlysate erfordert hätte. Anhand der Genexpression der PGE2 produzierenden Enzyme COX2 und PGE2_Synthase im Caecum von LPLA2-KO Mäusen konnte bisher jedoch kein Hinweis auf eine veränderte Produktion dieses Lipidmediators gefunden werden (nicht gezeigte Daten). Auch in der Infektion mit *M. tuberculosis* wurde in Lunge, Lymphknoten und Milz kein Unterschied in der PGE2-Konzentration zwischen LPLA2-KO und WT Mäusen gefunden. Daraus kann eher eine untergeordnete Rolle der LPLA₂ für die Produktion von Lipidmediatoren abgeleitet werden.

Folglich kann bisher nicht abschließend geklärt werden, wie genau es durch die hohe IL-17-Produktion in LPLA₂-KO Tieren zu einer stärkeren Vermehrung der Salmonellen im Darm der Tiere gekommen ist, jedoch ist eine Beteiligung der entzündungssteigernden Wirkung von IL-17 an diesem Effekt wahrscheinlich.

4.2.4 Der mögliche Beitrag des Mikrobioms zu der erhöhten IL-17 Produktion im Caecum von LPLA₂-KO Tieren

Nicht nur einwandernde, sondern auch residente Zellen können im Darm zu der früheren IL-17-Produktion im Caecum der LPLA₂-KO Tiere an Tag 2 der Infektion beitragen. IL-17produzierende CD4⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺ T-Zellen wurden in einem *staedy-state* Level im GALT und insbesondere in der Lamina Propria von nicht infizierten Mäusen gefunden [304, 305]. Ihr Vorkommen war streng assoziiert mit den kommensalen Bakterien des Darms [305–307]. Gnotobiotische Tiere ohne Mikrobiom zeigten keinerlei IL-17-Expression im Darm, was jedoch durch eine Besiedlung mit Kot-Homogenisaten rekonstituiert werden konnte [305]. Nicht nur die bloße Anwesenheit der Bakterien war hierbei von Bedeutung für die Anzahl der IL-17-produzierenden Zellen, sondern auch ihre Zusammensetzung [305, 308]. Neben den Studien von Ivanov et al. gibt es viele weitere Hinweise auf die modellierende Wirkung der Mikrobiota gegenüber dem Immunsystem im Darm, die Infektionen beeinflussen können [309–312]. Die Abhängigkeit des Krankheitsverlauf vom Mikrobiom wurde in unterschiedlichen Colitis-Modellen in Nagetieren beobachtet [313-315] und konnte ebenfalls in der Salmonellen-Infektion nachgewiesen werden [82, 86, 316, 317]. Auch in unserem Labor wurde eine deutliche Veränderung des Infektionsverlaufes im Salmonelleninduzierten Typhus-Modell festgestellt, je nach Herkunft der Mäuse (nicht gezeigte Daten). Dies ist konform mit Beobachtungen von Ivanov et al. (2008), dass C57BL/6J Mäuse von mehreren kommerziellen Anbietern aufgrund verschiedener Mikrobiome erhebliche Unterschiede in der Anzahl IL-17-produzierender Zellen im Darm zeigten [305]. Obwohl die hier verwendeten Tiere alle aus der hauseigenen Zucht stammten, wurde eine unterschiedliche Zusammensetzung der Darmmikrobiota bei nicht infizierten LPLA2-KO und WT Tieren beobachtet (Abbildung 28 und Abbildung 29). Die geringere Diversität der Bakteriengattungen in WT gegenüber KO Mäusen ging nicht mit einer Dominanz einzelner Gruppen einher. Inwiefern diese unterschiedliche Bakterienzusammensetzung einen Einfluss auf die Infektion hatte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Trotz unterschiedlicher Mikrobiome wurde im Typhus-Modell mit intakter Darmflora, im Gegensatz zum Colitis-Modell, kein Unterschied im Infektionsverlauf zwischen WT und LPLA₂-KO Mäusen gefunden. Eine Behandlung der Tiere mit Streptomycin reduziert die kommensalen Mikrobiota im Darm um ca. 90 % [254]. Dennoch kann ein Effekt des verbleibenden, möglicherweise unterschiedlichen Mikrobioms auf den Infektionsverlauf im Colitis-Modell nicht vollständig ausgeschlossen werden. Auch ein Effekt der Mikrobiota auf die Entwicklung des Immunsystems, insbesondere auf IL17-produzierende Zellen, im Vorfeld der Streptomycinbehandlung, ist möglich und könnte Einfluss auf den Infektionsverlauf genommen haben.

Wie die unterschiedlichen Bakterien das Immunsystem im Darm verändern, ist bisher weitgehend unbekannt [310]. Kürzlich wurde erstmals nachgewiesen, dass nicht nur MAMPs des Mikrobioms das Immunsystem stimulieren, sondern auch die Stoffwechselprodukte der kommensalen Bakterien einen Einfluss haben. Vor allem kurzkettige Fettsäuren, wie Buttersäure, förderten die Entwicklung regulatorischer T-Zellen (Foxp3⁺), die eine antiinflammatorische Wirkung besitzen [318, 319]. Möglicherweise trägt die LPLA₂ wie in der Lunge auch im Darm zum Phospholipidstoffwechsel bei. Die Freisetzung von Fettsäuren durch die LPLA₂ könnte dann auch auf die Entwicklung von Immunzellpopulationen einwirken und z.B. auf die Balance zwischen IL-17-produziernden T-Zellen und regulatorischen T-Zellen Einfluss nehmen. Eine Wirkung auf das Verhältnis dieser beiden Zellpopulationen wurde bereits für die Zusammensetzung des Mikrobioms nachgewiesen [305]. Eine verminderte Produktion von Fettsäuren durch das Fehlen der LPLA₂ in KO Mäusen könnte somit z.B. das Gleichgewicht im Darm in Richtung IL-17-Produzenten verschoben haben, wodurch es zu einer vermehrten IL-17-Produktion kam. Aufgrund eines ähnlichen Mechanismus könnte die LPLA2 ebenfalls die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen. Auch wenn bisher vor allem die Abhängigkeit des Mikrobioms von der Ernährung oder von Hormonen des Wirtes untersucht wurde [312, 320, 321], ist ein Beitrag des Wirtslipid-Metabolismus vorstellbar.

Ein direkter Beitrag der LPLA₂ zur Regulation von IL-17 im Darm der Mäuse kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Ebenso ist es möglich, dass sich die Mikrobiota-Zusammensetzung im Darm von LPLA₂-KO Mäusen von der in WT Tieren aufgrund eines veränderten Phospholipidstoffwechsels bei LPLA₂-Defizienz unterscheidet. Um dies zu überprüfen, müsste die Untersuchung des Mikrobioms und des Infektionsverlaufes im Colitis-Modell an Geschwistertieren durchgeführt werden.

4.3 Auswirkung der fehlenden LPLA₂ auf die Effektorfunktionen von Makrophagen in der Salmonellen-Infektion

Makrophagen sind ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems und gleichzeitig essentielle Wirtszellen für pathogene Salmonellen [231]. Vor allem Gewebsmakrophagen sind stark LPLA₂-exprimierende Zellen und zeigen eine deutliche Anreicherung von Phospholipiden in ihren Lysosomen [211–213]. Veränderungen dieser Phospholipidbeladenen Immunzellen könnten also im Zusammenhang mit der erhöhten Salmonellenlast oder der frühen IL-17-Produktion im Caecum von LPLA₂-KO Tieren stehen.

Neben der Akkumulation von Phospholipiden wurde ebenfalls die Ablagerung anderer Makromoleküle in Kompartimenten des endosomalen/lysosomalen-Systems der Zelle beschrieben, die zu unterschiedlichen Speicherkrankheiten führen können. Über die Folgen, die diese Akkumulationen in der Zelle auf Immunfunktionen haben, ist bisher wenig bekannt. Die Konsequenzen der Substrat-Akkumulation sind abhängig vom gespeicherten Material, dem Ausmaß des Speicherns und dem Typ der speichernden Zellen [217, 322]. Je nach Art der akkumulierten Moleküle und des Zelltyps sind die Symptome verschiedenster Speicherkrankheiten sehr unterschiedlich [217, 323]. Es wird angenommen, dass die Akkumulation zellulären Materials sekundär unterschiedliche biochemische und zelluläre Signalwege beeinflusst und es so zu der Pathologie im Gewebe kommt [217]. Eine Veränderungen der Signaltransduktion durch das Fehlen der LPLA₂ ist bisher unbekannt und auch ein direkter Zusammenhang zwischen Phospholipidstoffwechselkrankheiten und einer LPLA₂-Defizienz konnte bisher nicht hergestellt werden [324]. Ein immunologischer Defekt, der jedoch direkt mit dem Fehlen der LPLA₂ in Verbindung gebracht wurde, ist eine verminderte Präsentation von endogenen Lipidantigenen durch CD1d in DZs aus der Milz LPLA₂-defizienter Mäuse [290]. Diese Beobachtung konnte allerdings in unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden. NKT-Hybridomzellen wurden in unseren in vitro Untersuchungen von LPLA₂-KO und WT PM Φ gleichermaßen aktiviert (nicht veröffentlichte Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe). Eine reduzierte Anzahl an NKT-Zellen in Milz, Leber und Thymus, die durch CD1d-gekoppelte Lipidantigene aktiviert werden, wurde in Mausmodellen anderer Lipidspeicherkrankheiten, wie dem Niemann-Pick-Syndrom, gefunden [325]. Das Niemann-Pick-Syndrom ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die durch einen Defekt der Sphingomyelinase ebenfalls mit einem behinderten Phospholipidstoffwechsel in Verbindung gebracht wird. In AMO aus ASM (Acid-Sphingomyelinase)defizienten Mäusen, die ein Mausmodell des Niemann-Pick-Syndroms darstellen, konnte eine deutlich reduzierte Produktion von Superoxidanionen (O2) im Vergleich zu WT AMO nachgewiesen werden [326]. Diese reduzierte Fähigkeit zur Produktion von ROS wurde ebenfalls in Monozyten mit Akkumulation an Glycosylceramiden aus Patienten mit Gaucher-Syndrom (Morbus Gaucher) gefunden, bei denen ein Defekt der Glucocerebrosidase vorliegt [327]. Unterstützt werden diese Berichte von Beobachtungen des gleichen Phänomens in Makrophagen mit akkumulierten low density Lipoproteinen (LDL) [328] und in AMO von Ratten, in denen eine Akkumulation von Phospholipasen durch die Behandlung der Tiere mit amphiphilen Medikamenten (cationic amphiphilic drugs, CAD) verursacht wurde [329, 330]. Makrophagen aus Patienten mit CAD-induzierter Phospholipidose ähneln morphologisch sehr LPLA₂-defizienten Makrophagen [324, 331]. Somit ist auch ein Effekt der LPLA₂-Defizienz auf die Abwehrmechanismen der Makrophagen nicht ausgeschlossen. Deshalb wurde die Fähigkeit von LPLA₂-KO Makrophagen untersucht das Wachstum der Salmonellen einzuschränken und Zytokine zu sezernieren. Die Untersuchung in BMMØ erfolgte dabei mit WT Salmonellen, wohingegen PMΦ mit S. Tm ΔaroA infiziert wurden. Dies kann zu Unterschieden im Infektionsverlauf führen, war aber notwendig, da PMD sehr empfindlich auf die Infektion mit WT Salmonellen reagierten und es bereits 4 bis 9 Stunden nach Infektion zum Zelltod kam.

In den ersten 6 Stunden der *in vitro* Salmonellen-Infektion, in denen vor allem ROS zu der frühen Eliminierung des Erregers beitragen [332, 333], konnte in PMΦ beider Versuchsgruppen gleichermaßen eine effiziente Reduktion der intrazellulären Bakterien beobachtet werden. Dies spricht gegen einen generellen Defekt der Makrophagen bei der Phagozytose oder der Produktion von ROS bzw. intrazellulär-wirkenden AMPs. Erst über

einen längeren Beobachtungszeitraum von 24 bis 48 Stunden waren PMΦ aus LPLA₂-KO Tieren weniger effektiv als WT PMΦ bei der Kontrolle des Salmonellenwachstums. Dieser Effekt ist vermutlich auf induzierbares NO zurückzuführen, die erst zu späteren Zeitpunkten ab ca. 10 Stunden nach Infektion für die Eliminierung intrazellulärer Salmonellen in Makrophagen von Bedeutung sind [332, 334]. Bisher konnte jedoch kein Defekt in der induzierten NO₂⁻-Produktion bei der Stimulation von LPLA₂-KO PMΦ mit IFN-γ oder Infektion mit *M. tuberculosis* festgestellt werden [219]. Dennoch könnte in den hier durchgeführten Untersuchungen eine IFN-γ unabhängige iNOS-Induktion in LPLA₂-KO PMΦ durch die autokrine/parakrine Aktivierung durch Makrophagen-synthetisierte Zytokine wie TNF- α oder IL-1 *in vitro* weniger effizient ablaufen als in WT PMΦ. Hierfür spricht die tendenziell geringere TNF- α -Produktion der LPLA₂-KO PMΦ. Diese Hypothese müsste durch eine Quantifizierung der NO₂⁻-Produktion überprüft werden. Ebenfalls zu überprüfen wäre eine reduzierte Herstellung von CRAMP in LPLA₂-KO PMΦ, welches bisher als einzig wirksames AMP gegen *S*. Tm in Makrophagen nachgewiesen werden konnte [163].

Ein direkter Einfluss rekombinanter LPLA₂ auf die Vitalität von Salmonellen konnte durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden (nicht veröffentlichte Beobachtung unserer Arbeitsgruppe). Es handelt sich demnach bei der verminderten Fähigkeit der KO PMΦ das Wachstum der Salmonellen einzuschränken womöglich um einen sekundären Effekt aufgrund von Phospholipid-Akkumulation, z.B. der Bakterienmembranen, die die Effektormechanismen der Makrophagen erst zu späteren Zeitpunkten der Infektion behindern. Eine massive Akkumulation an Lipiden innerhalb von 24 Stunden in LPLA₂-KO PMΦ wurde bereits nach Infektion mit *E. coli* nachgewiesen (Schneider et al. in Vorbereitung). Gegen diese Hypothese spricht, dass KO BMMΦ das Salmonellenwachstum genauso effektiv hemmen wie WT BMMΦ und bei der *in vitro* Infektion von PMΦ mit *M. tuberculosis* kein Unterschied zwischen WT- und KO-Zellen beobachtet wurde [219]. Bei BMMΦ handelt es sich jedoch um junge Makrophagen, die nicht wie Gewebsmakrophagen, bereits vor Infektion Lipide akkumuliert haben. Ferner ist *M. tuberculosis* ein anderer Erreger, der einen völlig unterschiedlichen Infektionsverlauf hervorruft, wodurch ein Vergleich schwierig ist.

Eine andere Möglichkeit, wie es zu der Einschränkung der Effektorfunktionen gegen Salmonellen kommen kann, ist eine vermehrte Produktion inhibitorischer Lipid-Mediatoren von LPLA₂-KO PMΦ. Diese könnten nach Ansammlung in den ersten Stunden zu einer Reduktion der Effektormechanismen in LPLA₂-defizienten PMΦ führen. Ein solcher Effekt wurde bereits für PGE2 nachgewiesen. In Makrophagen kann PGE2 sowohl zu einer Inhibierung der NAPDH-Oxidase führen [335], als auch die Produktion von NO unterdrücken [336–338]. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, müsste die Produktion von PGE2 im Zellkulturüberstand gemessen werden.

Die verminderte Fähigkeit LPLA₂-defizienter PM Φ das Wachstum der Salmonellen zu hemmen ging *in vitro* 24 und 48 Stunden nach Infektion mit einer deutlich niedrigeren Expression von KC und einer verringerten TNF- α -Produktion einher. Keinen Unterschied gab es hingegen im Proteinlevel von IL-10 oder MCP-1 zwischen beiden Versuchsgruppen. Diese Beobachtung unterscheidet sich von Literaturangaben über andere lysosomale Speicherkrankheiten. Xu et al. (2011) untersuchten mit Hilfe einer Mircroarray-Analyse, in einem Mausmodell des Gaucher-Syndroms, Lungen- und Lebergewebe, in denen sich zahlreiche Makrophagen mit massiver Akkumulation an Glycosylceramiden befanden. Sie beobachteten in diesen Geweben eine höhere Expression von Genen, die mit der Aktivierung von Makrophagen in Verbindung stehen (MCP-1, MIP-1α, KC, NOS2, TNF, und IL-6) [339]. Zudem wurde in Makrophagen mit akkumulierten LDL eine erhöhte Produktion von TNF- α gezeigt [328]. Eine ähnliche Beobachtung wurde in AM Φ aus ASM^{-/-} Tieren gemacht, die im Vergleich zu WT Zellen eine erhöhte Produktion von MIP-1a zeigten. Nach LPS Stimulation wurde jedoch in ASM^{-/-} und WT AM Φ eine vergleichbare MIP-1 α Expression gemessen [326]. Die CAD-induzierte Akkumulationen von Phospholipiden in Ratten-Makrophagen hatte hingegen auch nach LPS-Stimulation eine vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- α zufolge [340]. Ein generell erhöhter Aktivierungsstatus nicht infizierter LPLA₂-KO PMΦ im Vergleich zu PMΦ aus WT Mäusen wurde bei den hier durchgeführten Untersuchungen anhand der gemessenen Zytokine nicht beobachtet. Vielmehr wurde in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei M. tuberculosis infizierten LPLA₂-KO PM Φ [219], eher eine verminderte TNF- α -Produktion festgestellt. Dies steht genauso im Widerspruch zu Berichten über eine erhöhte Zytokinproduktion in Makrophagen und Monozyten mit Lipidakkumulationen wie die herabgesetzte Produktion von KC in LPLA₂-KO PMΦ nach Salmonellen-Infektion. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf das unterschiedliche, akkumulierte Material sowie die verschiedenen Mechanismen der Speicherung zurückzuführen.

Dass die verminderte Fähigkeit von LPLA₂-KO PMΦ das Bakterienwachstum einzuschränken und KC zu produzieren direkt mit dem Fehlen der LPLA₂ in Verbindung steht, konnten erste Ergebnisse nicht zeigen. Beide Phänomene waren durch die Zugabe von rekombinanter LPLA₂ zu den KO PM Φ 12 Stunden vor Infektion, nicht rekonstituierbar (Abbildung 33). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Defekte, die die LPLA₂-KO PMΦ aufweisen, eher auf die Akkumulation der Phospholipide zurückgehen als direkt auf das Fehlen des Enzyms. Denkbar ist unter anderem, dass durch die Anhäufung von Phospholipiden der Transport von Molekülen in der Zelle eingeschränkt wird, wie es für den Transport von Lipide bereits gezeigt wurde [341, 342]. Dies könnte die Sekretion von einzelnen Zytokine beeinflussen. Zudem ist eine Konkurrenz zwischen Lipidakkumulationen und pathogenen Struktur nicht ausgeschlossen, die eine effektive MAMP-Erkennung durch intrazelluläre Rezeptoren und die Reaktion der Zelle beeinträchtigen könnte. Durch die Akkumulation der Phospholipide könnten auch Signalkaskaden der PRRs gestört sein, wie es für oxidierte LDL gezeigt worden ist [343]. Das Fehlen von monomeren Phospholipiden für die Erneuerung unterschiedlicher Kompartimente könnte ebenfalls die Funktionalität von Zellorganellen beeinflussen [344]. Es wurde gezeigt, dass durch Einlagerung von Phospholipiden die Autophagie beeinträchtigt ist, weswegen unter anderem nicht funktionelle Mitochondrien schlechter abgebaut werden können [344-346]. Die Anreicherung nicht funktioneller Mitochondrien wurde wiederum mit einer verstärkten Aktivierung des Inflammasoms und vermehrter IL-1- und IL18-Sekretion in Verbindung gebracht [347, 348]. Auch die Beeinträchtigung anderer Kompartimente der Zelle durch die Speicherung von Lipiden ist denkbar, es wurden bisher jedoch keine Zusammenhänge zu immunologischen Prozessen beobachtet. Wie es in LPLA₂-defizienten Makrophagen genau zu den funktionellen Beeinträchtigungen kommt, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

Eine generelle Frage, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, ist, inwieweit die Beobachtungen, die in LPLA₂-KO Gewebsmakrophagen gemacht wurden, ebenfalls auf inflammatorische Monozyten übertragbar sind. Denn denkbar ist auch, dass ihr Beitrag zu dem veränderten Infektionsverlauf in KO Mäusen größer ist als der von Gewebsmakrophagen. Trotz vieler unbekannter Faktoren kann zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass Signalwege in den LPLA₂-KO Makrophagen durch eine Akkumulation von Phospholipiden in den Lysosomen verändert werden und es somit zu Abweichungen bei den Effektorfunktionen kommt, wie der hier gezeigten verminderte Produktion von KC. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderten Effektorfunktionen in Makrophagen zu der veränderten mukosalen Immunantwort gegen *S*. Tm in LPLA₂-KO Mäusen beitragen.

4.4 Fazit: Der Verlust der funktionellen LPLA₂ hat Auswirkungen auf die mukosale Immunantwort im Darm gegen *S.* Tm

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die LPLA₂ die mukosale Immunantwort gegen S. Tm im Darm beeinflusst, während das Enzym in der mukosalen Immunantwort der Lunge gegen den extrazelluläre Erreger S. pneumoniae keine Rolle spielt. Die Auswirkungen waren vor allem im Darm LPLA2-defizienter Tiere bei der Salmonellen-induzierten Colitis sichtbar, während dieser Effekt nicht in der systemischen Infektion beobachtet wurde. Drei mögliche Mechanismen, wie der hier gezeigte Phänotyp in LPLA₂-KO Mäusen zustande kommen kann, sind in Abbildung 34 dargestellt. Trotz vieler noch zu klärender Faktoren ist eine Theorie, dass eine möglicherweise verstärkte Produktion an PGE2, IL-1β und/oder IL-23 in LPLA₂-KO Makrophagen zu der vermehrten Produktion von IL-17 im Caecum der KO Tiere führt. Die zweite Theorie bezieht sich auf den Beitrag der Unterschiede im Mikrobiom zwischen beiden Mausgruppen. Es ist möglich, dass bereits vor der Infektion das veränderte Mikrobiom im Darm der LPLA₂-KO Mäuse die Entwicklung von IL-17-produzierenden angeborenen T-Zellen gefördert hat, die im Fall der Infektion für die frühere IL-17-Produktion verantwortlich sein könnten. Inwiefern die Unterschiede im Mikrobiom der beiden Gruppen jedoch auf das Fehlen der LPLA₂ zurückzuführen ist, müsste mit Hilfe von Geschwisterexperimenten geklärt werden. Eine dritte Möglichkeit ist der direkte Einfluss von Stoffwechselprodukten der LPLA₂ im Darm auf die Entwicklung von Immunzellen. Durch eine verminderte Produktion von Fettsäuren durch das Fehlen der LPLA₂ in KO Mäusen könnte sich das Gleichgewicht im Darm in Richtung IL-17-produzierender Zellen verschoben haben, wodurch es zu einer vermehrten IL-17-Produktion kommt.



Abbildung 34: Veränderter Infektionsverlauf der S. Tm-induzierten Colitis in LPLA2-KO Mäusen

Dargestellt sind drei Möglichkeiten wie es zu der erhöhten Produktion von IL-17 im Caecum von LPLA₂-KO Mäusen gekommen sein kann(A-C), sowie eine mögliche Verbindung zwischen der IL-17-Konzentration und dem Bakterienwachstums in KO Tieren(D). A) Eine erhöhte Produktion von PGE2, IL1 und/oder IL-23 in KO PMΦ könnte die höhere IL-17-Konzentration im Darm induzieren. B) Ein verändertes Mikrobiom in KO Mäusen kann die Entwicklung von IL-17-produzierenden Zellen gefördert haben. C) Durch eine verminderte Produktion von Fettsäuren im Darm durch das Fehlen der LPLA₂ in KO Mäusen könnte sich das Gleichgewicht in Richtung IL-17produzierender Zellen verschoben haben. D) Durch eine vermehrte Förderung der Entzündung im Darm von LPLA₂-KO Mäusen durch IL-17 kann es zu einer verstärkten Vermehrung von Salmonellen im Darm gekommen sein, was wiederum für die die vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich sein könnte. Schwarzen Pfeile sowie schwarze Textboxen beschreiben beobachtete Veränderungen in LPLA₂-KO Mäusen im Vergleich zu WT Tieren, währen die roten Pfeile und Textboxen vermutete Hintergründe angeben. AMP: antimikrobielle Peptide, MΦ: Makrophage

Unabhängig von dem jeweiligen Mechanismus, wie es zu der verstärkten IL-17-Produktion im Caecum von LPLA₂-KO Tiere kommt, ist das Ergebnis in allen Modellen gleich. Vermutlich führen höhere IL-17-Konzentrationen im Darm von LPLA₂-KO Tiere zu einer Verstärkung der Entzündung des Caecums. So könnten AMPs und Lipocalin-2 das Wachstum der Salmonellen im Darm von KO Tieren fördern. Die erhöhte Bakterienlast könnte dann für die vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich sein, die wiederum im Darm zu Entzündungen und weiterer Vermehrung der Bakterien beigetragen haben könnte.

4.5 Ausblick

In der *S.* Tm-induzierten Colitis zeigte sich ein Einfluss der LPLA₂-Defizienz auf den Infektionsverlauf. Die Salmonellenlast im Darm und MLK von LPLA₂-KO Tieren war am 4. Tag der Infektion erhöht gegenüber WT Tieren. Eine Erklärung dafür könnten die vermehrte IL-17-Expression im Caecum der KO Tiere sein, die der erhöhten Bakterienlast vorausging. Unklar ist bislang jedoch, welche IL-17-Effektorfunktionen im Einzelnen für das stärkere Bakterienwachstum verantwortlich waren. Die Messung unterschiedlicher AMPs, Lipocalin-2 und der Menge an Mucin im Caecum beider Mausgruppen könnte Aufschluss darüber

geben, ob der erhöhte IL-17 Level eine vermehrte proinflammatorische Reaktion der Epithelzellen zur Folge hat. Lipocalin-2 könnte zudem als Entzündungsmarker verwendet werden, um die pathologische Bewertung des Caecums zu überprüfen. Einhergehend mit der höheren Salmonellenlast konnte auch eine größere Anzahl an Neutrophilen im Caecum der Tiere beobachtet werden.

Ob dies in einem direkten Zusammenhang mit der frühen IL-17 Induktion steht oder eher eine Folge des vermehrten Bakterienwachstums im Darm ist, wäre durch die Quantifizierung von MIP-2 zu klären, welches ebenfalls für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich ist. Die Depletion der Neutrophilen in LPLA₂-KO Tieren durch Antikörper könnte zudem Aufschluss darüber geben, ob das stärkere Salmonellenwachstum im Darm zu der höheren Anzahl an Neutrophilen im Caecum der KO Tier beiträgt oder vice versa.

Für die Überprüfung der Hypothesen über die Ursachen der erhöhten IL-17-Konzentration im Caecum von LPLA₂-KO Tieren gibt es verschiedene Ansätze. Auf der zellulären Ebene wäre eine genauere Untersuchung der Effektorfunktionen von LPLA₂-KO Makrophagen interessant. Neben der Überprüfung der Produktion IL17-induzierender Zytokine wie IL-1 β und IL-23 im *in vitro*-Modell wäre auch die Messung von Lipidmediatoren wie PGE2 sowie die Messung der NO-Produktion in LPLA₂-KO Makrophagen sinnvoll. *In vivo* wäre vor allem eine durchflusszytometrische Charakterisierung der IL-17-produzierenden Zellpopulationen notwendig, die Aufschluss über die Quelle des Zytokins geben und erste Hinweise liefern würde, ob eine größere Population an Zellen verantwortlich ist oder nur die Zytokinproduktion selbst gesteigert wird. In diesem Zusammenhang könnte, wie bei den LPLA₂-KO PM Φ , auch die Messung IL-17-induzierender Zytokine wie IL-23 und IL-1 β im Caecum wichtige Hinweise auf den Mechanismus geben, der für die vermehrte IL-17-Produktion verantwortlich ist. Dabei wäre neben einer Quantifizierung der Zytokine auch die Charakterisierung der Produzenten notwendig.

Um die Frage zu klären, ob die Abwesenheit er LPLA₂ zu einem veränderten Mikrobiom in Mäusen führt oder sogar direkt einen Einfluss auf die IL-17-Produktion im Darm hat, wäre eine Untersuchung von LPLA₂^{-/-} und LPLA₂^{+/+} Geschwistern notwendig. Bei diesen wäre sowohl eine Untersuchung des Mikrobioms interessant als auch die Charakterisierung der IL-17-produzierenden Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie in nicht infizierten Tieren beider Gruppen. Dies würde zeigen, ob eine erhöhte Anzahl IL-17-produzierender Zellen mit dem Fehlen der LPLA₂ oder nur mit einer Veränderung des Mikrobioms assoziiert ist.

Im Hinblick auf die Rolle der LPLA₂ in der Infektion mit dem Gram-positiven Erreger *S. pneumoniae* wäre eine Untersuchung des chronischen Verlaufs einer Besiedelung des Nasenrachenraumes interessant. Hierbei könnten ähnliche mukosale Immunmechanismen wie im Darm zu einer veränderten Resistenz der LPLA₂-KO Tiere beitragen.

5 Zusammenfassung

Bei der LPLA₂ handelt es sich um ein hydrolytisches Enzym, das primär in Gewebsmakrophagen exprimiert wird und am zellulären Abbau von Phospholipidmembranen und des Surfactant der Lunge beteiligt ist. Makrophagen aus LPLA₂-defizienten Mäusen entwickeln durch die Akkumulation von Phospholipiden in Lysosomen charakteristische Einschlusskörperchen, ein wesentliches Merkmal einer Phospholipidose. LPLA₂-defiziente Mäuse, die mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert wurden, zeigten im Gegensatz zu WT Mäusen eine erhöhte Bakterienlast in der Lunge aufgrund einer verringerten Antigen-spezifischen TH1-Aktivierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht inwieweit die LPLA₂ auch in akuten Infektionsmodellen, die vor allem die angeborene Immunantwort abbilden, eine Rolle spielt. Die akuten Infektionsmodelle der Pneumokokken-induzierten Pneumonie, des Salmonelleninduzierten Typhus und der Salmonellen-bedingten Colitis sollten dazu beitragen die Funktion der LPLA₂ in der Immunantwort sowohl gegen einen extra- als auch einen fakultativ intrazellulären Erreger sowie gegen eine lokale bzw. systemische Infektion aufzuklären. Dafür wurden LPLA₂^{-/-} Mäuse mit *Streptococcus pneumoniae* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infiziert und die Konsequenzen der LPLA₂-Defizienz auf Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die LPLA2-Defizienz vor allem die mukosale Immunantwort in der Salmonellen-induzierten Colitis beeinflusst. In der systemischen Salmonellen- und der akuten Pneumokokken-Infektion spielt die LPLA₂ eine untergeordnete Rolle. LPLA₂^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu WT Tieren 4 Tage nach Auslösung der Infektion Salmonella-bedingter Colitis in verschiedenen Darmabschnitten und den mesenterialen Lymphknoten eine erhöhte Salmonellenlast, die mit einer vermehrten Infiltration von neutrophilen Granulozyten einherging. Diesen Beobachtungen gingen am Tag 2 der Infektion höhere IL-17-Konzentrationen in Caecum und Serum von LPLA2^{-/-} Mäusen voraus. Der legt zeitliche Zusammenhang nahe, dass IL-17-assoziierte proinflammatorische Effektormechanismen das Salmonellenwachstum im Darm der Tiere förderten. Die LPLA2-Defizienz verminderte in vitro die antimikrobiellen Effektorfunktionen von Peritonealmakrophagen. Die im Verhältnis zu WT Makrophagen verminderte Fähigkeit des Wachstums der attenuierten Salmonellen-Mutante $\Delta AroA$ zu kontrollieren, ging mit der reduzierten Produktion von TNF- α und KC einher. Daraus kann man schließen, dass durch die LPLA₂-Defizienz Effektorfunktionen der Makrophagen und damit die Kontrolle des Bakterienwachstums beeinträchtigt waren, was zu dem veränderten Infektionsverlauf in LPLA₂^{-/-} Mäusen beigetragen haben kann. Folglich beeinflusst die LPLA₂ die mukosale Immunantwort gegen die nicht-systemische Salmonellen-Infektion, ihre genaue Rolle in der Abwehrfunktion von Makrophagen bleibt jedoch in zukünftigen Untersuchungen zu klären.

Literaturverzeichnis

- 1. **Mims C, Dockrell H, Goering R, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M**. 2004. Medical Microbiology, 3rd ed. Mosby.
- 2. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. 1993. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin. Infect. Dis. **17**:913–24.
- Austrian R. 1981. Pneumococcus: the first one hundred years. Rev. Infect. Dis. 3:183– 9.
- 4. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz T, Sauerbaum S. 2009. Medizinische Mikrobiologie und Infektionlogie, 6th ed. Springer Verlag.
- 5. **Brown JH**. 1919. The use of blood agar for the study of streptococci. The Rockefeller Instute for Medical Reasearch.
- 6. **Watson DA, Musher DM, Verhoef J**. 1995. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **14**:479–90.
- 7. **Mitchell AM, Mitchell TJ**. 2010. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. Clin. Microbiol. Infect. **16**:411–8.
- 8. Jonsson S, Musher DM, Chapman A, Goree A, Lawrence EC. 1985. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. J. Infect. Dis. **152**:4–13.
- 9. **Watson DA, Musher DM**. 1990. Interruption of capsule production in Streptococcus pneumonia serotype 3 by insertion of transposon Tn916. Infect. Immun. **58**:3135–8.
- 10. AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. 1995. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. Microbiol. Rev. **59**:591–603.
- 11. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat. Rev. Microbiol. 6:288–301.
- 12. Park IH, Pritchard DG, Cartee R, Brandao A, Brandileone MCC, Nahm MH. 2007. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of Streptococcus pneumoniae. J. Clin. Microbiol. **45**:1225–33.
- Calix JJ, Dagan R, Pelton SI, Porat N, Nahm MH. 2012. Differential occurrence of Streptococcus pneumoniae serotype 11E between asymptomatic carriage and invasive pneumococcal disease isolates reflects a unique model of pathogen microevolution. Clin. Infect. Dis. 54:794–9.

- Calix JJ, Porambo RJ, Brady AM, Larson TR, Yother J, Abeygunwardana C, Nahm MH. 2012. Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among Streptococcus pneumoniae Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. J. Biol. Chem. 287:27885–94.
- 15. Jin P, Kong F, Xiao M, Oftadeh S, Zhou F, Liu C, Russell F, Gilbert GL. 2009. First report of putative Streptococcus pneumoniae serotype 6D among nasopharyngeal isolates from Fijian children. J. Infect. Dis. **200**:1375–80.
- 16. **Avery OT, Dubos R**. 1931. The protective activation of a specific enzyme against typ III Pneumococcus infection in mice. J. Exp. Med. **54**:73–89.
- 17. **Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R**. 2009. Global serotype distribution among Streptococcus pneumoniae isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. Vaccine **27**:3802–10.
- Song JY, Nahm MH, Moseley MA. 2013. Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. J. Korean Med. Sci. 28:4–15.
- Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Scott JA, Lipsitch M. 2010. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a metaanalysis. Clin. Infect. Dis. 51:692–9.
- Nielsen SV, Henrichsen J. 1996. Incidence of invasive pneumococcal disease and distribution of capsular types of pneumococci in Denmark, 1989-94. Epidemiol. Infect. 117:411–6.
- 21. **Musher DM**. 1992. Infections caused by Streptococcus pneumoniae: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin. Infect. Dis. **14**:801–7.
- 22. Gray BM, Converse GM, Dillon HC. 1979. Serotypes of Streptococcus pneumoniae causing disease. J. Infect. Dis. 140:979–83.
- 23. Lee CJ. 1987. Bacterial capsular polysaccharides--biochemistry, immunity and vaccine. Mol. Immunol. **24**:1005–19.
- 24. Van Dam JE, Fleer A, Snippe H. 1990. Immunogenicity and immunochemistry of Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharides. Antonie Van Leeuwenhoek 58:1–47.
- 25. **Henriques-Normark B, Tuomanen EI**. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Cold Spring Harb. Perspect. Med. **3**:1–15.
- 26. Benton KA, Everson MP, Briles DE. 1995. A pneumolysin-negative mutant of Streptococcus pneumoniae causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. Infect. Immun. 63:448–55.

- Feldman C, Munro NC, Jeffery PK, Mitchell TJ, Andrew PW, Boulnois GJ, Guerreiro D, Rohde JA, Todd HC, Cole PJ. 1991. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 5:416– 23.
- 28. **Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, Janoff EN**. 1992. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. Infect. Immun. **60**:1740–6.
- 29. Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ. 1994. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 62:1501–3.
- 30. **Brugger SD, Frey P, Aebi S, Hinds J, Mühlemann K**. 2010. Multiple colonization with S. pneumoniae before and after introduction of the seven-valent conjugated pneumococcal polysaccharide vaccine. PLoS One **5**:e11638.
- 31. **Turner P, Hinds J, Turner C, Jankhot A, Gould K, Bentley SD, Nosten F, Goldblatt D**. 2011. Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. J. Clin. Microbiol. **49**:1784–9.
- 32. **Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM**. 2004. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. Lancet Infect. Dis. **4**:144–54.
- Lynch JP, Zhanel GG. 2010. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. Curr. Opin. Pulm. Med. 16:217–25.
- Gehanno P, N'Guyen L, Derriennic M, Pichon F, Goehrs JM, Berche P. 1998.
 Pathogens isolated during treatment failures in otitis. Pediatr. Infect. Dis. J. 17:885– 90.
- 35. **Cartwright K**. 2002. Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. Eur. J. Pediatr. **161**:188–95.
- Loda FA, Collier AM, Glezen WP, Strangert K, Clyde WA, Denny FW. 1975. Occurrence of Diplococcus pneumoniae in the upper respiratory tract of children. J. Pediatr. 87:1087–93.
- 37. **Boulnois GJ**. 1992. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. J. Gen. Microbiol. **138**:249–59.
- WHO. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization WHO position paper. Wkly. Epidemiol. Rep. 82:93–104.
- 39. **Austrian R**. 1986. Pneumococcal pneumonia. Diagnostic, epidemiologic, therapeutic and prophylactic considerations. Chest **90**:738–43.
- 40. **Tuomanen El, Austrian R, Masure HR**. 1995. Pathogenesis of pneumococcal infection. N. Engl. J. Med. **332**:1280–4.
- 41. Sankilampi U, Herva E, Haikala R, Liimatainen O, Renkonen O V, Leinonen M. 1997. Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in adults in Finland. Epidemiol. Infect. **118**:7–15.
- 42. **Ekdahl K, Mårtensson A, Kamme C**. 1998. Bacteraemic pneumococcal infections in Southern Sweden 1981-96: trends in incidence, mortality, age-distribution, serogroups and penicillin-resistance. Scand. J. Infect. Dis. **30**:257–62.
- Venetz I, Schopfer K, Mühlemann K. 1998. Paediatric, invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985-1994. Swiss Pneumococcal Study Group. Int. J. Epidemiol. 27:1101–4.
- 44. **Pedersen FK, Henrichsen J.** 1983. Pneumococcal meningitis and bacteraemia in Danish children 1969-1978. Serotypes, incidence and outcome. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B. **91**:129–34.
- 45. **O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T**. 2009. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. Lancet **374**:893–902.
- 46. **Chiavolini D, Pozzi G, Ricci S**. 2008. Animal models of Streptococcus pneumoniae disease. Clin. Microbiol. Rev. **21**:666–85.
- 47. **Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois GJ, Andrew PW, Mitchell TJ**. 1995. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. J. Infect. Dis. **172**:119–23.
- 48. **Nuermberger E, Helke K, Bishai WR**. 2005. Low-dose aerosol model of pneumococcal pneumonia in the mouse: utility for evaluation of antimicrobial efficacy. Int. J. Antimicrob. **26**:497–503.
- Rubins JB, Charboneau D, Fasching C, Berry AM, Paton JC, Alexander JE, Andrew PW, Mitchell TJ, Janoff EN. 1996. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153:1339–46.
- Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin WH. 2003. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with Streptococcus pneumoniae. J. Infect. Dis. 188:339–48.
- Gianfaldoni C, Censini S, Hilleringmann M, Moschioni M, Facciotti C, Pansegrau W, Masignani V, Covacci A, Rappuoli R, Barocchi MA, Ruggiero P. 2007. Streptococcus pneumoniae pilus subunits protect mice against lethal challenge. Infect. Immun. 75:1059–62.

- 52. **Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, Holden DW, Paton JC**. 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic Streptococcus pneumoniae infection. Infect. Immun. **69**:6702–6.
- 53. Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. 2002. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of Streptococcus pneumoniae. Infect. Immun. **70**:2526–34.
- 54. Blue CE, Paterson GK, Kerr AR, Bergé M, Claverys JP, Mitchell TJ. 2003. ZmpB, a novel virulence factor of Streptococcus pneumoniae that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. Infect. Immun. **71**:4925–35.
- 55. **Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W**. 2002. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Lancet Infect. Dis. **2**:721–36.
- 56. **Leib SL, Täuber MG**. 1999. Pathogenesis of bacterial meningitis. Infect. Dis. Clin. North Am. **13**:527–48, v–vi.
- 57. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, van Deventer SJ, Roord JJ, van Furth a M.
 2001. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection.
 J. Infect. Dis. 183:1143–6.
- 58. **Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB**. 2005. Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. Infect. Immun. **73**:3219–27.
- 59. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. 1999. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. Nature **401**:804–8.
- 60. **Coburn B, Grassl GA, Finlay BB**. 2007. Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunol. Cell Biol., 2006/12/06 ed. **85**:112–8.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat. Immunol. 2:361–7.
- Jones BD, Ghori N, Falkow S. 1994. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. J. Exp. Med. 180:15–23.
- 63. **Kraehenbuhl JP, Neutra MR**. 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**:301–32.
- 64. **Broz P, Ohlson MB, Monack DM**. 2012. Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen. Gut Microbes **3**:62–70.

- 65. Salcedo SP, Noursadeghi M, Cohen J, Holden DW. 2001. Intracellular replication of Salmonella typhimurium strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo. Cell. Microbiol. **3**:587–97.
- Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Bäumler AJ. 2001. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect. 3:1335–44.
- Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB. 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. J. Exp. Med. 186:569–80.
- 68. Yrlid U, Svensson M, Håkansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ. 2001. In vivo activation of dendritic cells and T cells during Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Infect. Immun. 69:5726–35.
- 69. **Nakoneczna I, Hsu HS**. 1980. The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis. Br. J. Exp. Pathol. **61**:76–84.
- 70. **Grassl GA, Finlay BB**. 2008. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. Curr. Opin. Gastroenterol. **24**:22–6.
- 71. Srikanth CV, Mercado-Lubo R, Hallstrom K, McCormick BA. 2011. Salmonella effector proteins and host-cell responses. Cell. Mol. Life Sci. **68**:3687–97.
- Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, Khare S, Adams LG, Bäumler AJ. 2005. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype typhimurium invasion of epithelial cells. Infect. Immun. 73:146–54.
- 73. **Boyle EC, Brown NF, Finlay BB**. 2006. Salmonella enterica serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. Cell. Microbiol. **8**:1946–57.
- 74. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. 1999. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**:2396–401.
- 75. **Fink SL, Cookson BT**. 2007. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. Cell. Microbiol., 2007/08/24 ed. **9**:2562–70.
- 76. **Watson KG, Holden DW**. 2010. Dynamics of growth and dissemination of Salmonella in vivo. Cell. Microbiol. **12**:1389–97.
- Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. 2000. Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. J. Exp. Med. 192:249–58.

- Chakravortty D, Hansen-Wester I, Hensel M. 2002. Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. J. Exp. Med. 195:1155–66.
- 79. **Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M**. 2011. Cellular aspects of immunity to intracellular Salmonella enterica. Immunol. Rev. **240**:185–95.
- 80. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Roland KL, Raetz CRH, Curtiss R. 2011. Palmitoylation state impacts induction of innate and acquired immunity by the Salmonella enterica serovar typhimurium msbB mutant. Infect. Immun. **79**:5027–38.
- 81. **Hapfelmeier S, Hardt W-D**. 2005. A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis. Trends Microbiol. **13**:497–503.
- 82. Stecher B, Macpherson AJ, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Hardt W-D. 2005. Comparison of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in germfree mice and mice pretreated with streptomycin. Infect. Immun. **73**:3228–41.
- 83. Wells CL, Maddaus MA, Jechorek RP, Simmons RL. 1988. Role of intestinal anaerobic bacteria in colonization resistance. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **7**:107–13.
- Nardi RM, Silva ME, Vieira EC, Bambirra EA, Nicoli JR. 1989. Intragastric infection of germfree and conventional mice with Salmonella typhimurium. Braz. J. Med. Biol. Res. 22:1389–92.
- 85. **Collins FM, Carter PB**. 1978. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. Infect. Immun. **21**:41–7.
- 86. **Miller CP, Bohnhoff M**. 1963. Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to Salmonella infection following Streptomycin treatment. J. Infect. Dis. **113**:59–66.
- 87. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt W-D. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. Infect. Immun. **71**:2839–58.
- Stecher B, Paesold G, Barthel M, Kremer M, Jantsch J, Stallmach T, Heikenwalder M, Hardt W-D. 2006. Chronic Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced colitis and cholangitis in streptomycin-pretreated Nramp1+/+ mice. Infect. Immun. 74:5047– 57.
- 89. Grassl GA, Valdez Y, Bergstrom KSB, Vallance BA, Finlay BB. 2008. Chronic enteric salmonella infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. Gastroenterology 134:768–80.

- 90. Monack DM, Bouley DM, Falkow S. 2004. Salmonella typhimurium persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1+/+ mice and can be reactivated by IFNgamma neutralization. J. Exp. Med. **199**:231–41.
- 91. **McCormick BA**. 2008. Using Salmonella enterica serotype typhimurium to model intestinal fibrosis. Gastroenterology **134**:872–5.
- 92. Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tükel C, Tsolis RM, Bäumler AJ. 2009. Life in the inflamed intestine, Salmonella style. Trends Microbiol. **17**:498–506.
- 93. **Mastroeni P, Grant A, Restif O, Maskell D**. 2009. A dynamic view of the spread and intracellular distribution of Salmonella enterica. Nat. Rev. Microbiol. **7**:73–80.
- 94. Krone CL, van de Groep K, Trzciński K, Sanders EAM, Bogaert D. 2014. Immunosenescence and pneumococcal disease: an imbalance in host-pathogen interactions. lancet. Respir. Med. 2:141–53.
- 95. McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. Nat. Rev. Microbiol. 9:265–78.
- 96. Martin M, Resch K. 2009. Immunologie. UTB.
- 97. **Janeway CA, Tracers P, Walport M, Shlomchik M**. 2002. Immunologie, 5th ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Plüddemann A, Mukhopadhyay S, Gordon S. 2011. Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry. Immunol. Rev. 240:11–24.
- 99. Smith LM, May RC. 2013. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. Biochem. Soc. Trans. 41:475–90.
- 100. **Chakravortty D, Hensel M**. 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. Microbes Infect. **5**:621–7.
- Stuart LM, Ezekowitz RAB. 2005. Phagocytosis: elegant complexity. Immunity 22:539– 50.
- 102. **Kadioglu A, Andrew PW**. 2004. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. Trends Immunol. **25**:143–9.
- 103. **Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN**. 2009. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. J. Clin. Invest. **119**:1899–909.
- 104. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105:11287–92.

- 105. **Hayday AC**. 2009. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity **31**:184–96.
- 106. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, Murdaca G, Zocchi MR. 2009. Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans. Blood 113:6611–8.
- 107. **Zhao L, Gao X, Peng Y, Joyee AG, Bai H, Wang S, Yang J, Zhao W, Yang X**. 2011. Differential modulating effect of natural killer (NK) T cells on interferon-γ production and cytotoxic function of NK cells and its relationship with NK subsets in Chlamydia muridarum infection. Immunology **134**:172–84.
- 108. **Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA**. 2010. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. J. Immunol. **184**:1776–83.
- 109. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. 2003. Clonal relationships between invasive and carriage Streptococcus pneumoniae and serotypeand clone-specific differences in invasive disease potential. J. Infect. Dis. **187**:1424–32.
- 110. Schröder NWJ, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. J. Biol. Chem. 278:15587–94.
- 111. Draing C, Pfitzenmaier M, Zummo S, Mancuso G, Geyer A, Hartung T, von Aulock S. 2006. Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of Streptococcus pneumoniae. J. Biol. Chem. **281**:33849–59.
- 112. Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:1966–71.
- 113. **Paterson GK, Orihuela CJ**. 2010. Pneumococci: immunology of the innate host response. Respirology **15**:1057–63.
- 114. **Calbo E, Garau J.** 2010. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. Int. J. Antimicrob. Agents **35**:107–13.
- Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, van der Poll T. 2003. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 167:171–9.
- Kirby AC, Raynes JG, Kaye PM. 2005. The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with Streptococcus pneumoniae. J. Infect. Dis. 191:1538–47.

- 117. Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B. 2007. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. **10**:52–6.
- 118. **Goerke J**. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. Biochim. Biophys. Acta **1408**:79–89.
- 119. **Crouch E, Wright JR**. 2001. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. Annu. Rev. Physiol. **63**:521–54.
- 120. Kuronuma K, Sano H, Kato K, Kudo K, Hyakushima N, Yokota S, Takahashi H, Fujii N, Suzuki H, Kodama T, Abe S, Kuroki Y. 2004. Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of Streptococcus pneumoniae by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A. J. Biol. Chem. 279:21421–30.
- Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V, Sastry KN. 1998. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. Am. J. Physiol. 274:L958–69.
- 122. Jounblat R, Kadioglu A, Iannelli F, Pozzi G, Eggleton P, Andrew PW. 2004. Binding and agglutination of Streptococcus pneumoniae by human surfactant protein D (SP-D) vary between strains, but SP-D fails to enhance killing by neutrophils. Infect. Immun. 72:709–16.
- 123. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M. 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:16969–74.
- 124. **Yuste J, Botto M, Bottoms SE, Brown JS**. 2007. Serum amyloid P aids complementmediated immunity to Streptococcus pneumoniae. PLoS Pathog. **3**:1208–19.
- 125. **Mold C, Du Clos TW**. 2006. C-reactive protein increases cytokine responses to Streptococcus pneumoniae through interactions with Fc gamma receptors. J. Immunol. **176**:7598–604.
- 126. Xu Y, Ma M, Ippolito GC, Schroeder HW, Carroll MC, Volanakis JE. 2001. Complement activation in factor D-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**:14577–82.
- 127. **Malley R**. 2010. Antibody and cell-mediated immunity to Streptococcus pneumoniae: implications for vaccine development. J. Mol. Med. (Berl). **88**:135–42.
- Kadioglu A, Coward W, Colston MJ, Hewitt CRA, Andrew PW. 2004. CD4-Tlymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. Infect. Immun. 72:2689–97.

- 129. Malley R, Trzcinski K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. 2005. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **102**:4848–53.
- 130. Lu Y-J, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, Anderson PW, Lipsitch M, Malley R. 2008. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. PLoS Pathog. 4:e1000159.
- 131. Dubin PJ, Kolls JK. 2008. Th17 cytokines and mucosal immunity. Immunol. Rev. 226:160–71.
- 132. **Cua DJ, Tato CM**. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nat. Rev. Immunol. **10**:479–89.
- 133. Crouch M-L, Becker LA, Bang I-S, Tanabe H, Ouellette AJ, Fang FC. 2005. The alternative sigma factor sigma is required for resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium to anti-microbial peptides. Mol. Microbiol. **56**:789–99.
- 134. Dougan G, John V, Palmer S, Mastroeni P. 2011. Immunity to salmonellosis. Immunol. Rev. 240:196–210.
- 135. **Pahl HL**. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene **18**:6853–66.
- 136. **Rosenberger CM, Scott MG, Gold MR, Hancock RE, Finlay BB**. 2000. Salmonella typhimurium infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. J. Immunol. **164**:5894–904.
- Ciacci-Woolwine F, Blomfield IC, Richardson SH, Mizel SB. 1998. Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. Infect. Immun. 66:1127–34.
- 138. Hachicha M, Rathanaswami P, Naccache PH, McColl SR. 1998. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. J. Immunol. **160**:449–54.
- 139. Marriott I, Hammond TG, Thomas EK, Bost KL. 1999. Salmonella efficiently enter and survive within cultured CD11c+ dendritic cells initiating cytokine expression. Eur. J. Immunol. 29:1107–15.
- 140. Arpaia N, Godec J, Lau L, Sivick KE, McLaughlin LM, Jones MB, Dracheva T, Peterson SN, Monack DM, Barton GM. 2011. TLR signaling is required for Salmonella typhimurium virulence. Cell **144**:675–88.
- 141. Broz P, Newton K, Lamkanfi M, Mariathasan S, Dixit VM, Monack DM. 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. J. Exp. Med. **207**:1745–55.

- 142. Eckmann L, Kagnoff MF. 2001. Cytokines in host defense against Salmonella. Microbes Infect. 3:1191–200.
- 143. **Mavris M, Sansonetti P**. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **18**:373–86.
- 144. McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. 1993. Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. J. Cell Biol. **123**:895–907.
- 145. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J. Clin. Invest. **95**:55–65.
- 146. Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. Infect. Immun. **61**:4569–74.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, Bäumler AJ. 2005. The Vi capsular antigen of Salmonella enterica serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. Infect. Immun. 73:3367–74.
- 148. Wall DM, Nadeau WJ, Pazos M a, Shi HN, Galyov EE, McCormick BA. 2007. Identification of the Salmonella enterica serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. Cell. Microbiol. 9:2299–313.
- 149. Köhler H, Sakaguchi T, Hurley BP, Kase BA, Kase BJ, Reinecker H-C, McCormick BA. 2007. Salmonella enterica serovar Typhimurium regulates intercellular junction proteins and facilitates transepithelial neutrophil and bacterial passage. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 293:G178–87.
- 150. **Gulig PA, Doyle TJ, Clare-Salzler MJ, Maiese RL, Matsui H**. 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- Salmonella typhimurium is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. **65**:5191–7.
- Nauciel C, Espinasse-Maes F. 1992. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. Infect. Immun. 60:450–4.
- 152. Bao S, Beagley KW, France MP, Shen J, Husband AJ. 2000. Interferon-gamma plays a critical role in intestinal immunity against Salmonella typhimurium infection. Immunology **99**:464–72.
- 153. Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. 1989. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for Salmonella-killing activity. Infect. Immun., 1989/02/01 ed. 57:609–15.

- 154. Mastroeni P, Harrison JA, Robinson JH, Clare S, Khan S, Maskell DJ, Dougan G, Hormaeche CE. 1998. Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compound-dependent salmonellae in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. Infect. Immun. **66**:4767–76.
- 155. Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H, Kurimoto M, Dougan G. 1999. Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 67:478–83.
- Dybing JK, Walters N, Pascual DW. 1999. Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated Salmonella typhimurium infections. Infect. Immun. 67:6242–8.
- 157. Godinez I, Haneda T, Raffatellu M, George MD, Paixão TA, Rolán HG, Santos RL, Dandekar S, Tsolis RM, Bäumler AJ. 2008. T cells help to amplify inflammatory responses induced by Salmonella enterica serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. Infect. Immun. **76**:2008–17.
- 158. Pie S, Truffa-Bachi P, Pla M, Nauciel C. 1997. Th1 response in Salmonella typhimurium-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. Infect. Immun. 65:4509–14.
- 159. **Bradley LM, Dalton DK, Croft M**. 1996. A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. J. Immunol. **157**:1350–8.
- 160. **Eisenstein TK**. 2001. Implications of Salmonella-induced nitric oxide (NO) for host defense and vaccines: NO, an antimicrobial, antitumor, immunosuppressive and immunoregulatory molecule. Microbes Infect. **3**:1223–31.
- Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, Dougan G. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. J. Exp. Med. 192:237–48.
- Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC. 2000. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. Science 287:1655–8.
- 163. **Rosenberger CM, Gallo RL, Finlay BB**. 2004. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular Salmonella replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **101**:2422–7.
- 164. Nairz M, Fritsche G, Brunner P, Talasz H, Hantke K, Weiss G. 2008. Interferon-gamma limits the availability of iron for intramacrophage Salmonella typhimurium. Eur. J. Immunol. **38**:1923–36.

- Fritsche G, Nairz M, Werner ER, Barton HC, Weiss G. 2008. Nramp1-functionality increases iNOS expression via repression of IL-10 formation. Eur. J. Immunol. 38:3060–7.
- 166. Grant AJ, Restif O, McKinley TJ, Sheppard M, Maskell DJ, Mastroeni P. 2008. Modelling within-host spatiotemporal dynamics of invasive bacterial disease. PLoS Biol. 6:e74.
- Hess J, Ladel C, Miko D, Kaufmann SH. 1996. Salmonella typhimurium aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4+ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. J. Immunol. 156:3321–6.
- 168. **Nauciel C**. 1990. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to Salmonella typhimurium infection. J. Immunol. **145**:1265–9.
- 169. VanCott JL, Chatfield SN, Roberts M, Hone DM, Hohmann EL, Pascual DW, Yamamoto M, Kiyono H, McGhee JR. 1998. Regulation of host immune responses by modification of Salmonella virulence genes. Nat. Med. **4**:1247–52.
- Srinivasan A, Salazar-Gonzalez R-M, Jarcho M, Sandau MM, Lefrancois L, McSorley SJ. 2007. Innate immune activation of CD4 T cells in salmonella-infected mice is dependent on IL-18. J. Immunol. 178:6342–9.
- 171. **Srinivasan A, Foley J, McSorley SJ**. 2004. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated Salmonella causes interclonal competition. J. Immunol. **172**:6884–93.
- 172. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Bäumler AJ. 2008. Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. Nat. Med. 14:421–8.
- 173. Sinha K, Mastroeni P, Harrison J, de Hormaeche RD, Hormaeche CE. 1997. Salmonella typhimurium aroA, htrA, and aroD htrA mutants cause progressive infections in athymic (nu/nu) BALB/c mice. Infect. Immun. **65**:1566–9.
- 174. **Mittrücker HW, Kaufmann SH**. 2000. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. J. Leukoc. Biol. **67**:457–63.
- 175. **Menager N, Foster G, Ugrinovic S, Uppington H, Verbeek S, Mastroeni P**. 2007. Fcgamma receptors are crucial for the expression of acquired resistance to virulent Salmonella enterica serovar Typhimurium in vivo but are not required for the induction of humoral or T-cell-mediated immunity. Immunology **120**:424–32.
- 176. Uppington H, Menager N, Boross P, Wood J, Sheppard M, Verbeek S, Mastroeni P. 2006. Effect of immune serum and role of individual Fcgamma receptors on the

intracellular distribution and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in murine macrophages. Immunology **119**:147–58.

- 177. **Pollard TD, Earnshaw WC**. 2007. Cell Biology Das Oroginal mit Übersetzungshilfe, 2nd ed. Springer-Verlag.
- 178. **Murray PJ, Wynn TA**. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat. Rev. Immunol. **11**:723–37.
- 179. McCubbrey AL, Curtis JL. 2013. Efferocytosis and lung disease. Chest 143:1750–7.
- Cosío G, Grinstein S. 2009. Phagocytosis: Early Events in Particle Recognition and Uptake, p. 37 – 64. In Schaible, UE, Haas, A (eds.), Intracellular Niches of Microbes. WILEY-CHV.
- 181. **Popova NV, Deyev IE, Petrenko AG**. 2013. Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. Acta Naturae **5**:62–73.
- 182. **Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA**. 2009. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. Cell. Signal. **21**:1–6.
- 183. **Saftig P, Klumperman J**. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **10**:623–35.
- 184. **Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E**. 2005. Evolving endosomes: how many varieties and why? Curr. Opin. Cell Biol. **17**:423–34.
- Sheff DR, Daro EA, Hull M, Mellman I. 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. J. Cell Biol. 145:123–39.
- 186. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. 2002. Phagosome maturation: aging gracefully. Biochem. J. **366**:689–704.
- 187. Haas A. 2007. The phagosome: compartment with a license to kill. Traffic 8:311–30.
- 188. **González-Gaitán M**. 2003. Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**:213–24.
- 189. **Eskelinen E-L**. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. Autophagy **1**:1–10.
- 190. De Duve C, Wattiaux R. 1966. Functions of lysosomes. Annu. Rev. Physiol. 28:435–92.
- 191. **Turk B, Turk V**. 2009. Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? J. Biol. Chem. **284**:21783–7.

- 192. **Roberts MF**. 1996. Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. FASEB J. **10**:1159–72.
- 193. Shayman JA, Kelly R, Kollmeyer J, He Y, Abe A. 2011. Group XV phospholipase A₂, a lysosomal phospholipase A₂. Prog. Lipid Res. **50**:1–13.
- 194. Schaloske RH, Dennis EA. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. Biochim. Biophys. Acta **1761**:1246–59.
- Aloulou A, Rodriguez JA, Fernandez S, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carrière F. 2006. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. Biochim. Biophys. Acta 1761:995–1013.
- 196. **Hurley BP, McCormick BA**. 2008. Multiple roles of phospholipase A2 during lung infection and inflammation. Infect. Immun. **76**:2259–72.
- 197. Agard M, Asakrah S, Morici LA. 2013. PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. Front. Cell. Infect. Microbiol. **3**:45.
- 198. Kalinski P. 2012. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. J. Immunol. 188:21–8.
- Abe A, Shayman JA, Radin NS. 1996. A novel enzyme that catalyzes the esterification of N-acetylsphingosine. Metabolism of C2-ceramides. J. Biol. Chem., 1996/06/14 ed. 271:14383–9.
- 200. **Mellors A, Tappel AL**. 1967. Hydrolysis of phospholipids by a lysosomal enzyme. J. Lipid Res. **8**:479–85.
- 201. **Fowler S, De Duve C**. 1969. Digestive activity of lysosomes. 3. The digestion of lipids by extracts of rat liver lysosomes. J. Biol. Chem. **244**:471–81.
- 202. **Stoffel W, Trabert U**. 1969. Studies on the occurrence and properties of lysosomal phospholipases A1 and A2 and the degradation of phosphatidic acid in rat liver lysosomes. Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem. **350**:836–44.
- 203. **Franson R, Waite M, LaVia M**. 1971. Identification of phospholipase A 1 and A 2 in the soluble fraction of rat liver lysosomes. Biochemistry **10**:1942–6.
- 204. **Franson R, Waite M, Weglicki W**. 1972. Phospholipase A activity of lysosomes of rat myocardial tissue. Biochemistry **11**:472–6.
- 205. **Franson RC, Waite M**. 1973. Lysosomal phospholipase A 1 and A 2 of normal and bacillus calmette guerin-induced alveolar macrophages. J. Cell Biol. **56**:621–7.
- 206. Ishikawa Y, Nishide T, Sasaki N, Shirai K, Saito Y, Yoshida S. 1988. Hydrolysis of lowdensity lipoprotein phospholipids in arterial smooth muscle cells. Biochim. Biophys. Acta **961**:170–6.

- 207. Ellis LC, Boccio JR, Cunningham MJ, Groesbeck MD, Cosentino MJ. 1981. Rat testicular phospholipase A2 activity: pH optima, its cellular and subcellular distribution in the gonad, and some factors that may modulate its activity. J. Androl. 2:94–102.
- 208. Hostetler KY, Hall LB. 1982. Inhibition of kidney lysosomal phospholipases A and C by aminoglycoside antibiotics: possible mechanism of aminoglycoside toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **79**:1663–7.
- 209. Abe A, Shayman JA. 1998. Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A2 with transacylase activity. J. Biol. Chem., 1998/05/09 ed. 273:8467–74.
- 210. **Hiraoka M, Abe A, Shayman JA**. 2002. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. J. Biol. Chem., 2002/01/16 ed. **277**:10090–9.
- 211. **BioGPS**. 2014. Gene Portal System. http://biogps.org/#goto=genereport&id=23659. 2014/03/06
- 212. **Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, Shayman JA**. 2006. Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. Mol. Cell. Biol., 2006/08/02 ed. **26**:6139–48.
- 213. Abe A, Hiraoka M, Wild S, Wilcoxen SE, Paine R, Shayman JA. 2004. Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. J. Biol. Chem., 2004/08/06 ed. 279:42605–11.
- 214. **Abe A, Kelly R, Shayman JA**. 2010. The measurement of lysosomal phospholipase A2 activity in plasma. J. Lipid Res. **51**:2464–70.
- 215. **Abe A, Hiraoka M, Inatomi S, Ohguro I, Ohguro H**. 2012. Lysosomal phospholipase A2 activity in pig aqueous humor. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **53**:152–6.
- Abe A, Kelly R, Kollmeyer J, Hiraoka M, Lu Y, Shayman JA. 2008. The secretion and uptake of lysosomal phospholipase A2 by alveolar macrophages. J. Immunol. 181:7873–81.
- 217. **Futerman AH, van Meer G**. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**:554–65.
- 218. Anderson N, Borlak J. 2006. Drug-induced phospholipidosis. FEBS Lett. 580:5533–40.
- 219. Schneider BE, Behrends J, Hagens K, Harmel N, Shayman JA, Schaible UE. 2014. Lysosomal phospholipase A 2 : A novel player in host immunity to Mycobacterium tuberculosis. Eur. J. Immunol. in press.
- 220. **Pearce BJ, Iannelli F, Pozzi G**. 2002. Construction of new unencapsulated (rough) strains of Streptococcus pneumoniae. Res. Microbiol. **153**:243–7.

- 221. Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, Xiao G, Purchio TF, Caparon MG, Lipsitch M, Contag PR. 2001. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent Streptococcus pneumoniae transformed with a novel gram-positive lux transposon. Infect. Immun. **69**:3350–8.
- 222. Hoiseth SK, Stocker BA. 1985. Genes aroA and serC of Salmonella typhimurium constitute an operon. J. Bacteriol. **163**:355–61.
- 223. Hoiseth SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent Salmonella typhimurium are nonvirulent and effective as live vaccines. Nature **291**:238–9.
- 224. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. **73**:5261–7.
- 225. Orihuela CJ, Gao G, McGee M, Yu J, Francis KP, Tuomanen E. 2003. Organ-specific models of Streptococcus pneumoniae disease. Scand. J. Infect. Dis. **35**:647–52.
- 226. Yadav A, Saini V, Arora S. 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin. Chim. Acta. **411**:1570–9.
- 227. Kobayashi Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. Front. Biosci. 13:2400–7.
- 228. Geddes K, Rubino SJ, Magalhaes JG, Streutker C, Le Bourhis L, Cho JH, Robertson SJ, Kim CJ, Kaul R, Philpott DJ, Girardin SE. 2011. Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. Nat. Med. **17**:837–44.
- 229. Keestra AM, Godinez I, Xavier MN, Winter MG, Winter SE, Tsolis RM, Bäumler AJ. 2011. Early MyD88-dependent induction of interleukin-17A expression during Salmonella colitis. Infect. Immun. **79**:3131–40.
- 230. Loetscher Y, Wieser A, Lengefeld J, Kaiser P, Schubert S, Heikenwalder M, Hardt W-D, Stecher B. 2012. Salmonella transiently reside in luminal neutrophils in the inflamed gut. PLoS One 7:e34812.
- 231. **Fields PI, Swanson RV., Haidaris CG, Heffron F**. 1986. Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1986/07/01 ed. **83**:5189–93.
- Qu X-D, Lehrer RI. 1998. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. Infect. Immun. 66:2791–7.
- Koduri RS, Grönroos JO, Laine VJO, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, Gelb MH.
 2002. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). J. Biol. Chem. 277:5849–57.

- 234. Beers SA, Buckland AG, Koduri RS, Cho W, Gelb MH, Wilton DC. 2002. The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. J. Biol. Chem. **277**:1788–93.
- 235. **Golioto A, Wright JR**. 2002. Effects of surfactant lipids and surfactant protein a on host defense functions of rat alveolar macrophages. Pediatr. Res. **51**:220–7.
- Sherman MP, D'Ambola JB, Aeberhard EE, Barrett CT. 1988. Surfactant therapy of newborn rabbits impairs lung macrophage bactericidal activity. J. Appl. Physiol. 65:137–45.
- 237. Hormaeche CE. 1980. The in vivo division and death rates of Salmonella typhimurium in the spleens of naturally resistant and susceptible mice measured by the superinfecting phage technique of Meynell. Immunology **41**:973–9.
- 238. **Maw J, Meynell GG**. 1968. The true division and death rates of Salmonella typhimurium in the mouse spleen determined with superinfecting phage P22. Br. J. Exp. Pathol. **49**:597–613.
- 239. Cheminay C, Chakravortty D, Hensel M. 2004. Role of neutrophils in murine salmonellosis. Infect. Immun. **72**:468–77.
- 240. **Gewirtz AT, Siber AM, Madara JL, McCormick BA**. 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to Salmonella typhimurium can be uncoupled from bacterial internalization. Infect. Immun. **67**:608–17.
- 241. McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by Salmonella typhimurium. J. Immunol. **160**:455–66.
- Mrsny RJ, Gewirtz AT, Siccardi D, Savidge T, Hurley BP, Madara JL, McCormick BA. 2004. Identification of hepoxilin A3 in inflammatory events: a required role in neutrophil migration across intestinal epithelia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:7421–6.
- 243. **Conlan JW**. 1997. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. **65**:630–5.
- 244. Vassiloyanakopoulos AP, Okamoto S, Fierer J. 1998. The crucial role of polymorphonuclear leukocytes in resistance to Salmonella dublin infections in genetically susceptible and resistant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **95**:7676–81.
- 245. **Gulig PA, Doyle TJ, Hughes JA, Matsui H**. 1998. Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of Salmonella typhimurium in mice. Infect. Immun. **66**:2471–85.

- 246. **Spees AM, Kingsbury DD, Wangdi T, Xavier MN, Tsolis RM, Bäumler AJ**. 2014. Neutrophils Are a Source of Gamma Interferon during Acute Salmonella enterica Serovar Typhimurium Colitis. Infect. Immun. **82**:1692–7.
- 247. Stecher B, Hapfelmeier S, Müller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt W-D. 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect. Immun. 72:4138–50.
- 248. Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Müller AJ, Heikenwalder M, Stallmach T, Hensel M, Pfeffer K, Akira S, Hardt W-D. 2005. 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. **174**:1675–85.
- 249. Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Bäumler AJ. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. Nature **467**:426–9.
- 250. Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC. 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in Salmonella typhimurium. Mol. Microbiol. **32**:275–87.
- 251. **Gunn JS**. 2008. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. Trends Microbiol. **16**:284–90.
- 252. Bader MW, Sanowar S, Daley ME, Schneider AR, Cho U, Xu W, Klevit RE, Le Moual H, Miller SI. 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. Cell 122:461–72.
- 253. **Fields PI, Groisman EA, Heffron F**. 1989. A Salmonella locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. Science **243**:1059–62.
- 254. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt W-D. 2007. Salmonella enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. PLoS Biol. 5:2177–89.
- 255. **Sundquist M**. 2004. Immunity to Salmonella from a dendritic point of view. Cell. Microbiol. **6**:1–11.
- 256. **Schafer R, Eisenstein TK**. 1992. Natural killer cells mediate protection induced by a Salmonella aroA mutant. Infect. Immun. **60**:791–7.
- 257. **Griggs ND, Smith RA**. 1991. Adoptive transfer of natural killer cell activity in B6D2F1 mice challenged with Salmonella typhimurium. Cell. Immunol. **135**:88–94.
- 258. **Kirby AC, Yrlid U, Wick MJ**. 2002. The innate immune response differs in primary and secondary Salmonella infection. J. Immunol. **169**:4450–9.

- 259. Ashkar AA, Reid S, Verdu EF, Zhang K, Coombes BK. 2009. Interleukin-15 and NK1.1+ cells provide innate protection against acute Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in the gut and in systemic tissues. Infect. Immun. **77**:214–22.
- 260. Lapaque N, Walzer T, Méresse S, Vivier E, Trowsdale J. 2009. Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection. J. Immunol., 2009/03/21 ed. **182**:4339–48.
- 261. Harrington L, Srikanth CV, Antony R, Shi HN, Cherayil BJ. 2007. A role for natural killer cells in intestinal inflammation caused by infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **51**:372–80.
- 262. Rhee SJ, Walker WA, Cherayil BJ. 2005. Developmentally regulated intestinal expression of IFN-gamma and its target genes and the age-specific response to enteric Salmonella infection. J. Immunol. **175**:1127–36.
- 263. Raffatellu M, Santos RL, Chessa D, Wilson RP, Winter SE, Rossetti CA, Lawhon SD, Chu H, Lau T, Bevins CL, Adams LG, Bäumler AJ. 2007. The capsule encoding the viaB locus reduces interleukin-17 expression and mucosal innate responses in the bovine intestinal mucosa during infection with Salmonella enterica serotype Typhi. Infect. Immun. **75**:4342–50.
- 264. Liu JZ, Pezeshki M, Raffatellu M. 2009. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. Cytokine **48**:156–60.
- 265. **Dubin PJ, Kolls JK**. 2007. IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid Pseudomonas aeruginosa lung infection in mice. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. **292**:L519–28.
- 266. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J. Exp. Med. 183:2593–603.
- 267. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén a. 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. J. Immunol. **162**:2347–52.
- 268. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. 2000. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colonystimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. J. Immunol. **164**:4783–9.
- Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, Nelson S, Bagby GJ, Stoltz D, Mynatt RL, Spriggs M, Kolls JK. 1998. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. J. Immunol. 161:6383–9.

- 270. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J. Exp. Med. **194**:519–27.
- 271. Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. 2005. Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. J. Leukoc. Biol. **77**:388–99.
- 272. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J. Exp. Med. 203:2271–9.
- 273. Kao C-Y, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R. 2004. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. J. Immunol. **173**:3482–91.
- 274. Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio S-P, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick J V, Dandekar S, Bäumler AJ. 2009. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to Salmonella enterica serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed intestine. Cell Host Microbe 5:476–86.
- 275. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y. 2009. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. Immunity **30**:108–19.
- Crouch M-LV, Castor M, Karlinsey JE, Kalhorn T, Fang FC. 2008. Biosynthesis and IroCdependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. 67:971–83.
- 277. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD. 2006. The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:16502–7.
- Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, Fong HEH, Cheung CC, Mak TW. 2006. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:1834–9.
- 279. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron. Nature **432**:917–21.

- 280. **Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK**. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. Mol. Cell **10**:1033–43.
- Stecher B, Barthel M, Schlumberger MC, Haberli L, Rabsch W, Kremer M, Hardt W-D.
 2008. Motility allows S. Typhimurium to benefit from the mucosal defence. Cell. Microbiol. 10:1166–80.
- 282. Songhet P, Barthel M, Röhn TA, Van Maele L, Cayet D, Sirard J-C, Bachmann M, Kopf M, Hardt W-D. 2010. IL-17A/F-signaling does not contribute to the initial phase of mucosal inflammation triggered by S. Typhimurium. PLoS One **5**:e13804.
- Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. 2011. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. Immunology 134:8–16.
- 284. Michel M-L, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong C-H, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. J. Exp. Med. **204**:995–1001.
- 285. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. J. Immunol. **170**:2106–12.
- 286. Godinez I, Raffatellu M, Chu H, Paixão TA, Haneda T, Santos RL, Bevins CL, Tsolis RM, Bäumler AJ. 2009. Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to Salmonella enterica serotype Typhimurium in the intestine. Infect. Immun. **77**:387–98.
- 287. Shibata K, Yamada H, Hara H, Kishihara K, Yoshikai Y. 2007. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production. J. Immunol. **178**:4466–72.
- 288. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. J. Immunol. **178**:3786–96.
- 289. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. J. Immunol. **177**:4662–9.
- 290. Paduraru C, Bezbradica JS, Kunte A, Kelly R, Shayman JA, Veerapen N, Cox LR, Besra GS, Cresswell P. 2013. Role for lysosomal phospholipase A2 in iNKT cell-mediated CD1d recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **110**:5097–102.
- 291. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, de Sauvage FJ, Gurney AL. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J. Biol. Chem. **278**:1910–4.

- 292. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KHG. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. Immunity **31**:331–41.
- Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, Shellito JE, Schurr JR, Bagby GJ, Nelson S, Kolls JK. 2003. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection. J. Immunol. 170:4432–6.
- 294. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity **13**:715–25.
- 295. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Brown GD, Ruland J, Reis e Sousa C. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. Nat. Immunol. **8**:630–8.
- 296. Siegemund S, Schütze N, Freudenberg MA, Lutz MB, Straubinger RK, Alber G. 2007. Production of IL-12, IL-23 and IL-27p28 by bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than macrophages after LPS/TLR4-dependent induction by Salmonella Enteritidis. Immunobiology **212**:739–50.
- 297. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti T-D, Ozören N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Núñez G. 2006. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat. Immunol. **7**:576–82.
- 298. Cavaillon JM. 1994. Cytokines and macrophages. Biomed. Pharmacother. 48:445–53.
- 299. Man SM, Tourlomousis P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald KA, Bryant CE. 2013. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to modulate IL-1β production. J. Immunol. 191:5239–46.
- 300. **Khayrullina T, Yen J-H, Jing H, Ganea D**. 2008. In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. J. Immunol. **181**:721–35.
- 301. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ, de Waal Malefyt R. 2009. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. J. Exp. Med. 206:535–48.
- 302. Esaki Y, Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E, Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S. 2010. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **107**:12233–8.

- 303. Sheibanie AF, Yen J-H, Khayrullina T, Emig F, Zhang M, Tuma R, Ganea D. 2007. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. J. Immunol. **178**:8138–47.
- 304. **Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR**. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell **126**:1121–33.
- 305. **Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR**. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing Thelper cells in the mucosa of the small intestine. Cell Host Microbe **4**:337–49.
- 306. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K. 2008. ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. Nature **455**:808–12.
- 307. Hall JA, Bouladoux N, Sun CM, Wohlfert EA, Blank RB, Zhu Q, Grigg ME, Berzofsky JA, Belkaid Y. 2008. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. Immunity **29**:637–49.
- 308. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell 139:485–98.
- 309. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper L V. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. Science **313**:1126–30.
- 310. **Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ**. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. Science **336**:1268–73.
- 311. Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. Science 336:489–93.
- 312. **Magrone T, Jirillo E**. 2013. The interplay between the gut immune system and microbiota in health and disease: nutraceutical intervention for restoring intestinal homeostasis. Curr. Pharm. Des. **19**:1329–42.
- 313. Ghosh S, Dai C, Brown K, Rajendiran E, Makarenko S, Baker J, Ma C, Halder S, Montero M, Ionescu VA, Klegeris A, Vallance BA, Gibson DL. 2011. Colonic microbiota alters host susceptibility to infectious colitis by modulating inflammation, redox status, and ion transporter gene expression. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 301:G39–49.
- 314. **Sartor RB**. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology **134**:577–94.

- 315. **Martin M, Solnick JV**. 2014. The Gastric Microbial Community, Helicobacter pylori Colonization, and Disease. Gut Microbes **5:** E pub ahead of print.
- 316. Stecher B, Chaffron S, Käppeli R, Hapfelmeier S, Freedrich S, Weber TC, Kirundi J, Suar M, McCoy KD, von Mering C, Macpherson AJ, Hardt W-D. 2010. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. PLoS Pathog. **6**:e1000711.
- 317. **Kaiser P, Diard M, Stecher B, Hardt W-D**. 2012. The streptomycin mouse model for Salmonella diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response. Immunol. Rev. **245**:56–83.
- 318. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffer PJ, Rudensky AY. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature **504**:451–5.
- 319. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature 504:446–50.
- 320. Markle JGM, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. Science 339:1084–8.
- 321. Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, Graham L, Volchkov P, Becker L, Antonopoulos D, Umesaki Y, Chervonsky AV. 2013. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. Immunity **39**:400–12.
- 322. Ballabio A, Gieselmann V. 2009. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. Biochim. Biophys. Acta 1793:684–96.
- 323. **Ozbayraktar FBK, Ulgen KO**. 2009. Molecular facets of sphingolipids: mediators of diseases. Biotechnol. J. **4**:1028–41.
- 324. **Shayman JA, Abe A**. 2013. Drug induced phospholipidosis: an acquired lysosomal storage disorder. Biochim. Biophys. Acta **1831**:602–11.
- 325. Gadola SD, Silk JD, Jeans A, Illarionov PA, Salio M, Besra GS, Dwek R, Butters TD, Platt FM, Cerundolo V. 2006. Impaired selection of invariant natural killer T cells in diverse mouse models of glycosphingolipid lysosomal storage diseases. J. Exp. Med. 203:2293–303.

- 326. **Dhami R, He X, Gordon RE, Schuchman EH**. 2001. Analysis of the lung pathology and alveolar macrophage function in the acid sphingomyelinase--deficient mouse model of Niemann-Pick disease. Lab. Invest. **81**:987–99.
- 327. Liel Y, Rudich A, Nagauker-Shriker O, Yermiyahu T, Levy R. 1994. Monocyte dysfunction in patients with Gaucher disease: evidence for interference of glucocerebroside with superoxide generation. Blood **83**:2646–53.
- 328. Montgomery RR, Cohn ZA. 1989. Endocytic and secretory repertoire of the lipidloaded macrophage. J. Leukoc. Biol. **45**:129–38.
- 329. McNulty MJ, Reasor MJ. 1981. Enhanced phagocytic and bactericidal activities of phospholipidotic rat alveolar macrophages. J. Reticuloendothel. Soc. **30**:539–49.
- 330. **Reasor MJ, Koshut RA, McNulty MJ, Trush MA**. 1980. Chemiluminescence from rat alveolar macrophages following induction of phospholipidosis with chlorphentermine. Toxicol. Appl. Pharmacol. **52**:497–506.
- 331. Dake MD, Madison JM, Montgomery CK, Shellito JE, Hinchcliffe WA, Winkler ML, Bainton DF. 1985. Electron microscopic demonstration of lysosomal inclusion bodies in lung, liver, lymph nodes, and blood leukocytes of patients with amiodarone pulmonary toxicity. Am. J. Med. 78:506–12.
- 332. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. J. Exp. Med., 2000/07/19 ed. **192**:227–36.
- 333. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C. 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity **10**:29–38.
- 334. Eriksson S, Björkman J, Borg S, Syk A, Pettersson S, Andersson DI, Rhen M. 2000. Salmonella typhimurium mutants that downregulate phagocyte nitric oxide production. Cell. Microbiol. **2**:239–50.
- 335. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. 2007. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **37**:562–70.
- 336. Lin WW, Chen BC, Hsu YW, Lee CM, Shyue SK. 1999. Modulation of inducible nitric oxide synthase induction by prostaglandin E2 in macrophages: distinct susceptibility in murine J774 and RAW 264.7 macrophages. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 58:87–101.
- Marotta P, Sautebin L, Di Rosa M. 1992. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. Br. J. Pharmacol. 107:640–1.

- 338. Asakrah S, Nieves W, Mahdi Z, Agard M, Zea AH, Roy CJ, Morici LA. 2013. Postexposure therapeutic efficacy of COX-2 inhibition against Burkholderia pseudomallei. PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2212.
- 339. Xu Y-H, Jia L, Quinn B, Zamzow M, Stringer K, Aronow B, Sun Y, Zhang W, Setchell KDR, Grabowski GA. 2011. Global gene expression profile progression in Gaucher disease mouse models. BMC Genomics **12**:20.
- 340. **Reasor MJ, McCloud CM, DiMatteo M, Schafer R, Ima A, Lemaire I**. 1996. Effects of amiodarone-induced phospholipidosis on pulmonary host defense functions in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **211**:346–52.
- 341. Marks DL, Pagano RE. 2002. Endocytosis and sorting of glycosphingolipids in sphingolipid storage disease. Trends Cell Biol. **12**:605–13.
- 342. **Sillence DJ, Platt FM**. 2003. Storage diseases: new insights into sphingolipid functions. Trends Cell Biol. **13**:195–203.
- 343. Shamshiev AT, Ampenberger F, Ernst B, Rohrer L, Marsland BJ, Kopf M. 2007. Dyslipidemia inhibits Toll-like receptor-induced activation of CD8alpha-negative dendritic cells and protective Th1 type immunity. J. Exp. Med. **204**:441–52.
- 344. Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. 2012. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. J. Cell Biol. **199**:723–34.
- 345. Jennings JJ, Zhu J-H, Rbaibi Y, Luo X, Chu CT, Kiselyov K. 2006. Mitochondrial aberrations in mucolipidosis Type IV. J. Biol. Chem. **281**:39041–50.
- 346. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampanato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. 2008. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. Hum. Mol. Genet. **17**:119–29.
- 347. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. 2011. Mitochondria and the autophagyinflammation-cell death axis in organismal aging. Science **333**:1109–12.
- 348. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AMK. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat. Immunol. 12:222–30.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>S. pneumoniae</i> induzierte Erkrankungen
Abbildung 2: Verlauf einer Salmonellen-induzierten Colitis gegenüber dem systemischen Typhus
Abbildung 3: Die angeborene Immunantwort gegen S. Tm
Abbildung 4: Der Weg ins Lysosom: Endozytose und Autophagie16
Abbildung 5: Angriffspunkte der verschiedenen Phosphlipasen am Phospholipid18
Abbildung 6: Akkumulation von Phospholipiden in Gewebsmakrophagen
Abbildung 7: Intrazelluläres Überleben von <i>S. pneumoniae</i> in Peritonealmakrophagen 42
Abbildung 8: Untersuchung von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen mit einem nicht invasiven bildgebenden Verfahren
Abbildung 9: Streptococcus pneumoniae-Last in infizierten C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen 44
Abbildung 10: Pathologie <i>S. pneumoniae</i> infizierter Lungen von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen
Abbildung 11: Überlebensrate <i>S. pneumoniae</i> infizierter C57BL/6J und LPLA ₂ - ^{/-} Mäusen 46
Abbildung 12: S. Tm Last in infizierten C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen im Typhus-Modell 48
Abbildung 13: Pathologie Salmonellen-infizierter Caeca von C57BL/6J und LPLA ₂ - ^{/-} Mäusen im Typhus-Modell
Abbildung 14: Chemokin und Zytokin Genexpression in infizierten Caeca von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen im Typus-Modell
Abbildung 15: <i>S.</i> Tm-Last in infizierten C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen im Colitis-Modell 53
Abbildung 16: Überlebensrate S. Tm infizierter C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen im Colitis- Modell
Abbildung 17: Pathologie des Colitis-Modells in Caeca von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen nach Salmonellen Infektion
Abbildung 18: Chemokin- und Zytokin-Genexpression in infizierten Caeca von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen im Colitis-Modell
Abbildung 19: Chemokinkonzentrationen in infizierten Caeca und Seren von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen

Abbildung 20: Zytokinkonzentrationen in infizierten Caeca und Seren von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen
Abbildung 21: Lebende Zellen im infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen 61
Abbildung 22: Lymphozytenpopulationen im infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen
Abbildung 23: Myeloide Zellpopulationen im Salmonellen-infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen
Abbildung 24: Quantitative Analyse der MPO-Konzentration im Caecum von C57BL/6J und LPLA2 ^{-/-} Mäusen im Colitis-Modell
Abbildung 25: MPO-positive Zellpopulationen im Lumen und der Mukosa infizierter Caeca von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen im Colitis-Modell
Abbildung 26: MPO.positive Zellpopulationen in der Submukosa des infizierten Caecum von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen im Colitis-Modell
Abbildung 27: Quantitative Analyse der Großgruppen im Mikrobiom von C57BL/6J (WT) und LPLA ₂ -/- Mäusen
Abbildung 28: Qualitative Analyse der α -Diversität im Mikrobiom von C57BL/6J (WT) und LPLA ₂ ^{-/-} Mäusen
Abbildung 29: Koordinaten-Analyse in der β-Diversität der Mikrobiota von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- Mäusen
Abbildung 30: Intrazelluläres Überleben von S. Tm in BMMO71
Abbildung 31: Intrazelluläres Überleben von <i>S.</i> Tm Δ <i>aroA</i> in PMΦ
Abbildung 32: Chemokin- und Zytokinproduktion von C57BL/6J und LPLA ₂ -/- PM Φ nach S. Tm $\Delta Aroa$ -Infektion
Abbildung 33: Versuch der Rekonstitution des Bakterienwachstums sowie der KC-Produktion in LPLA ₂ -/- PM Φ nach <i>S.</i> Tm Δ <i>aroA</i> infektion
Abbildung 34: Veränderter Infektionsverlauf der S. Tm-induzierten Colitis in LPLA ₂ -KO Mäusen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	. 27
Tabelle 2: Antikörper für die Verwendung in der Durchflusszytometrie	. 34
Tabelle 3: Pathologisches Bewertungssystem des Salmonella-infizierten Caecum	. 37
Tabelle 4: Antikörper für Immunhistologie und Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen	. 38
Tabelle 5: Primer-Kombinationen für die quantitativer Real-Time-PCR	. 40

Anhang

Anhang 1: Bewertungssystem des Wohlergehens der Tiere in Infektionsversuchen

Score	Aktivität	Körpergewicht	Allgemeinzustand	Spontanes Verhalten
1	sehr aktiv	unbeeinflusst oder Anstieg	Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)
2	aktiv	Änderung < 10 %	Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege)	geringe Abweichungen vom Normalverhalten
3	weniger aktiv	Gewichtsreduktion 10-20 %	Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen; erhöhter Muskeltonus	ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik
4	Kaum aktiv	Gewichtsreduktion 20-30 %	Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik, Verhaltensstereotypien, Koordinationsstörungen
5	lethargisch	Gewichtsreduktion > 30%	Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten); Atemgeräusche; Tier fühlt sich kalt an	Schmerzlaute beim Er- greifen, Selbstamputation (Autoaggression)

Anhang 2: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für myeloide Zellpopulationen

Ausschluss von Dubletten, CD45- und toten Zellen für die Charakterisierung myeloider Zellen:





Selektion dendritischer Zellen, Makrophagen und inflammatorischer Monozyten aus CD45⁺ lebenden Zellen:



Selektion neutrophiler Granulozyten aus CD45⁺ lebenden Zellen:

Anhang 3: Auswertungsstrategie der durchflusszytometrischen Analysen für lymphoide Zellpopulationen



Ausschluss toter Zellen und Dubletten für die Charakterisierung lymphoider Zellen:



Selektion von NK-Zellen und $\gamma\delta T$ -Zellen aus lebenden Zellen

Selektion CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus lebenden Zellen



Anhang 4: Überprüfung der unterschiedlichen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in LPLA₂^{-/-} und C57BL/6J Mäusen mit der Redundanz Analyse (RDA) und der *Cononical Correspondenc*-Analyse



Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Dr. Ulrich Schaible** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung während der letzten drei Jahre danken. Vielen herzlichen Dank für das Vertrauen, was Du mir entgegen gebracht hast, die vielen Freiheiten im Labor und Deinen unerschütterlichen Optimismus.

Prof. Dr. Tamás Laskay möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und **Prof. Dr. Jürgen Rohwedel** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Meinem Zweitbetreuer **Prof. Dr. Guntram Grassl** danke ich für die zahlreichen konstruktiven Gespräche und neuen Ideen.

Dr. Philipp Rausch möchte ich nicht nur für die Analyse des Mikrobioms meiner Mäuse danken, sondern auch für die Engelsgeduld mit der er mir versucht hat die statistischen Analysen näher zu bringen.

Für die tolle Tag- und Nacht-Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung aller durchflusszytometrischen-Experimente möchte ich mich ganz herzlich bei **Dr. Jochen Behrends** bedanken. Ohne Deine Hilfe wäre ich bei dieser Aufgabe verzweifelt.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Dr. Bianca Schneider**. Vielen Dank, dass Du so viel Zeit in mich investiert, und mit Deinem "*Know-how*" so sehr unterstützt hast. Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und in den dunkelsten Stunden meiner Arbeit dafür gesorgt, dass ich nicht aufgegeben habe. Ohne Dich wäre ich jetzt nicht an diesem Punkt. Danke!

Vielen Dank an Kristine Hagens, Nadine Harme, Jaqueline Eich und Dagmar Meyer. Ihr habt mir immer mit all Eurer Erfahrung unterstützt und mir sehr viel beigebracht. Kristine, einen riesigen Dank an Dich für die Hilfe bei allem rund um die Maus und vielen gemeinsamen Stunden im S2-Keller. Nadine möchte ich speziell für die Hilfe bei der Darm-Aufarbeitung fürs FACS und Jaqueline für die Hilfe in Sachen Mikroskop und Histo danken. Dagmar, vielen Dank für Deinen technischen-Support bei der Histo und den ELISA-Tests. Danke auch an Tinka, der weltbesten Auszubildenden. Vielen herzlichen Dank an Euch alle auch für viele lustige und lehrreiche Mittagsstunden.

Bei der **gesamten Arbeitsgruppe "Zelluläre Mikrobiologie"** möchte ich mich für die unglaubliche Hilfsbereitschaft, die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen bedanken.
Neben tollen Arbeitskollegen habe ich hier in den letzten Jahren Freunde gefunden, die das wichtigste sind, dass ich von hier mitnehme:

Vielen Dank **Carlotta**, dass Du mir so eine große Hilfe bei den nächtlichen 8-Stunden Zeitpunkten warst. Die langen Abende mit Dir im Labor waren nur halb so schlimm und die vielen Stunden die wir gemeinsam im Auto zwischen Borstel und Hamburg verbracht haben waren immer eine Bereicherung. Danke, dass Du mich zum Joggen animiert hast ⁽²⁾ Dieser Dank geht auch an meine **Lauf-Gruppe: Mahin, Anna, Nicole, Franziska und Christian**. Danke **Seppel** für das Lauftraining, das leckere Essen und die "Käffchen"-Treffen. **Anna**, Dein herzliches Wesen fasziniert mich immer wieder. Danke für die vielen Kleinigkeiten. Dich muss man einfach ins Herz schließen. **Mahin**, in Dir habe ich hier eine tolle Freundin gefunden. Ohne unsere "Strick"-Abende hätte ich den letzten Winter nicht überstanden. Danke, dass Du mich immer wieder aufgebaut und nie zugelassen hast, dass ich mich verkrieche. Unsere Zeit auf Kos bleibt mir für immer in Erinnerung.

Schließlich geht der letzte und größte Dank an meine Familie, meinen Freund und meine beste Freundin, die mich in den letzten Jahren so sehr unterstützt haben:

Jenny, ich möchte Dir für Deine bedingungslose Freundschaft danken und dass ich mich immer 100 %ig auf Dich verlassen kann. Du bist die beste Freundin, die man sich wünschen kann.

Nico, Du stehst seit sechs Jahren an meiner Seite und warst mir eine riesen Stütze vor allem in der Zeit der Doktorarbeit. Du hast die schönen Momente doppelt so schön und die schweren Zeiten nur halb so schwer gemacht. Danke für all Deine Unterstützung, Geduld und Liebe.

Danke **Mama**, dass Du mich immer unterstützt hast, egal ob Du mich verstehen konntest oder nicht. Du warst immer für mich da, hast so viel in mich investiert und immer an mich geglaubt. Du bist die beste Mutti der Welt und ohne Dich wäre ich nicht das geworden was ich bin.

Papa und Alex, ihr fehlt mir sehr.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Hamburg, den 20.05.2014

Steffi, Renk