

Aus dem Institut für Immunologie
der Medizinischen Hochschule Hannover



angefertigt im Rahmen des Programms
zur Strukturierten Doktorandenausbildung



Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry for *Salmonella*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Stephan Gunter Florian Halle
aus Hannover

Hannover, 2008

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 10.12.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Professor Dr. Reinhold Förster

Professor Dr. Oliver Pabst

Co-Betreuer der Arbeit: Professor Dr. Jan Buer

Referent: Prof. Dr. Franz Bange

Korreferent: Prof. Dr. Dirk Berens von Rautenfeld

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2008

Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. Hans Dieter Tröger

Prof. Dr. Klaus Resch

Prof. Dr. Reinhard Schwitzer

Diese Dissertationsschrift basiert gemäß § 3 Absatz 3 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover auf folgender Publikation:

Infection and Immunity

April 2007; Volume 75 No. 4: page 1577-85.

Published online ahead of print: 5th February 2007.

doi:10.1128/IAI.01392-06. Print ISSN: 0019-9567. Online ISSN: 1098-5522

**Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry
for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium**

Inhalt

- I Ausführliche Zusammenfassung
- II Publikation
- III Anhang

I Ausführliche Zusammenfassung

Einleitung	Seite 1
Ergebnisse und Diskussion	Seite 7
Kurzzusammenfassung	Seite 17
Literatur	Seite 18

II Publikation

Infection and Immunity, April 2007

Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry
for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Publikation	Seite 25
-------------	----------

III Anhang

Dissertationsanzeige bzgl. Tierschutz und Versuchen mit gentechnisch veränderten Organismen	Seite 35
Lebenslauf	Seite 37
Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 der Promotionsordnung	Seite 38

I Ausführliche Zusammenfassung

Einleitung

In der immunologischen Grundlagenforschung spielen tierexperimentelle Infektionsmodelle eine große Rolle. Die Infektion verschiedener Mausstämmen mit Bakterien der Spezies *Salmonella enterica* ist seit vielen Jahren etabliert, um die komplexen Wechselwirkungen des Immunsystems eines vertebraten Wirts mit einem pathogenen Prokaryoten zu untersuchen (26, 83, 84). So zählen Salmonellen zwar zu den am besten untersuchten pathogenen Bakterien, dennoch sind viele grundlegende Fragen zu den *in vivo* entscheidenden Mechanismen der Pathogenese ungeklärt (6, 87).

Weltweit sind durch *Salmonella enterica* bedingte Erkrankungen des Menschen von großer Bedeutung. Millionen von Krankheitsfällen und hunderttausende Todesfälle, besonders in den Entwicklungsländern, werden jährlich durch Salmonellen verursacht (21, 34). Ziel der Grundlagenforschung ist es, die Pathogenese der durch Salmonellen verursachten Krankheitsbilder zu verstehen, um die Entwicklung wirksamer Impfstoffe und neuartiger Therapieoptionen zu ermöglichen. Noch fehlen spezifische Therapiemöglichkeiten und antibiotische Behandlungsansätze werden auf lange Sicht mit kaum überwindbaren Problemen durch Resistenzentwicklungen konfrontiert sein (5). Außerdem besteht großes Interesse an der Aufklärung der Pathogenese der *Salmonella enterica* Infektion, da genetisch manipulierte Salmonellen als Träger von Antigenen zur oralen Vakzinierung des Menschen eingesetzt werden (11, 55, 79).

***Salmonella enterica* als Humanpathogen**

Die beim Menschen ausgelösten Erkrankungen durch Infektion mit Bakterien der Spezies *Salmonella enterica* sind Infektionen über den oralen Weg. Die Infektionen des Menschen mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium oder Serovar Enteritidis führt meist zu einer selbstlimitierenden Enterokolitis. Nur sehr selten kann es zu einer Dissemination der Salmonellen weiter als in die mesenterialen Lymphknoten kommen (7).

Im Gegensatz dazu steht die Infektion mit einer anderen Subklasse der Spezies *Salmonella enterica*: Orale Inokulation von nur einigen hundert Organismen des Serovar Typhi kann beim Menschen ein schweres generalisiertes Krankheitsbild auslösen, welches als *Typhus abdominalis* bezeichnet wird. Eine tödliche Sepsis mit sehr hohen Koloniezahlen in infizierten Organen wie Leber und Milz kann sich entwickeln (7).

Eine weitere schwere Komplikation ist die intestinale Perforation, die mit einer diffusen Peritonitis, Sepsis und hohen Mortalität assoziiert ist (73). Dabei kommt es zum Durchbruch eines schwer geschädigten Areals der Darmwand. Die Lokalisation dieser Perforation ist bedingt durch die schweren inflammatorischen Reaktionen in den lymphatischen Organen der Darmwand. So wird in der Literatur beschrieben, dass die meisten Perforationen an Stellen gefunden werden, an denen sich Peyersche Platten befunden haben (73, 84, 17).

Nur durch das genaue Verständnis der Pathogenese *in vivo* kann die Anfälligkeit des Menschen für die Infektion mit *S. typhi* aufgeklärt, Impfstoffe verbessert und neue Möglichkeiten der antimikrobiologischen Therapie gefunden werden. Darum wird versucht mit Hilfe von tierexperimentellen Infektionsmodellen das Infektionsgeschehen zu analysieren.

***Salmonella enterica* als Modellpathogen**

Salmonella enterica Serovar Typhi löst bei allen weit verbreiteten und gut charakterisierten Versuchstieren keine Erkrankungen aus (15). Die oft verwendeten Inzuchtmausstämme BALB/c und C57BL/6 sind auch gegen extrem hohe Infektionsdosen über den oralen Weg resistent. So wurde vorgeschlagen, den mausadaptierten Stamm *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zur Infektion der Mäuse zu verwenden (15). Das murine *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infektionsmodell wird als gutes Modellsystem für den menschlichen *Typhus abdominalis* und für enteroinvasive Erkrankungen im Allgemeinen angesehen (34, 84)

Zahlreiche genetisch definierte Eigenschaften von *S. typhimurium* spielen eine Rolle für den Verlauf der Infektion. Diese Pathogenitätsfaktoren der Salmonellen wurden mit Hilfe des murinen Infektionsmodells intensiv erforscht (34, 84).

Von großer Bedeutung ist zum Beispiel die Expression der Typ-3 Sekretionssysteme (type three secretion systems, TTSS). Durch den Nadelkomplex der TTSS können Salmonellen Effektorproteine direkt in Wirtszellen hinein injizieren (31, 85) . Zahlreiche weitere in den

Salmonella pathogenicity islands (SPI) kodierte Gene und zahlreiche genetische Regulationsmechanismen sind wichtig für die volle Virulenz der Salmonellen (2, 49).

Auf Seiten des murinen Wirts wurden in den letzten Jahren zahlreiche Vulnerabilitätsfaktoren beschrieben. Zum Beispiel den *Nramp1*-Genotyp (14) und viele andere Faktoren, welche die intrazelluläre Replikation der Salmonellen beeinflussen können. Große Bedeutung für die Resistenz gegen die invasive *Salmonella*-Infektion hat die Fähigkeit des Wirts zur Expression von induzierbarer NO-Synthetase, NADPH-Oxidase (62), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interferon-alpha (68) sowie zahlreicher weiterer Zyto- und Chemokine (27, 28, 78).

Salmonella typhimurium kann das Lumen des murinen Dünndarms nicht effektiv kolonisieren. Hierfür sind wahrscheinlich die kommensale Flora des murinen Darms und die antibakteriellen Substanzen im Darmlumen von großer Bedeutung (4, 88). Im Verlauf der murinen *S. typhimurium*-Infektion ist die Überwindung der Darmschleimhaut-Barriere entscheidend für das Überleben der Salmonellen in diesem Wirt. So können diese fakultativ intrazellulären Bakterien die günstige Replikationsnische im Inneren von Wirtszellen erreichen (77).

Die Peyerschen Platten

Die Invasion über M-Zellen des Follikel assoziierten Epithels (follicle associated epithelium, FAE) der Peyerschen Platten wird allgemein als Hauptweg der *Salmonella enterica* Infektion der Darmschleimhaut angesehen (44, 65). Die Peyerschen Platten (PP) der Maus liegen an der antimesenterialen Seite des Dünndarms. In den häufig eingesetzten Inzuchtmausstämmen BALB/c und C57BL/6 finden sich meist 6 bis 12 solcher Aggregate aus jeweils 6 bis 10 einzelnen Follikeln. Die PP ragen über das Niveau der Serosa nach außen hervor und sind mit bloßem Auge leicht identifizierbar. Sie bestehen aus großen B-Zell Follikeln mit Keimzentren sowie dazwischen liegenden interfollikulären T-Zell Zonen (32, 72). Zur kontrollierten Aufnahme von antigenem Material dienen die M-Zellen des FAE der so genannten Dom-Region der PP (siehe Abbildung 1) (40). Über zum Teil noch nicht aufgeklärte Mechanismen können M-Zellen Bakterien aus dem Lumen des Darms aufnehmen und über einen Transzytose-Mechanismus in das darunter liegende lymphatische Gewebe leiten. Ein M-Zell vermittelter Transport von Bakterien, Proteinen, Viren und anderen partikulären Antigenen ist bei zahlreichen Spezies demonstriert worden (46, 49, 56).

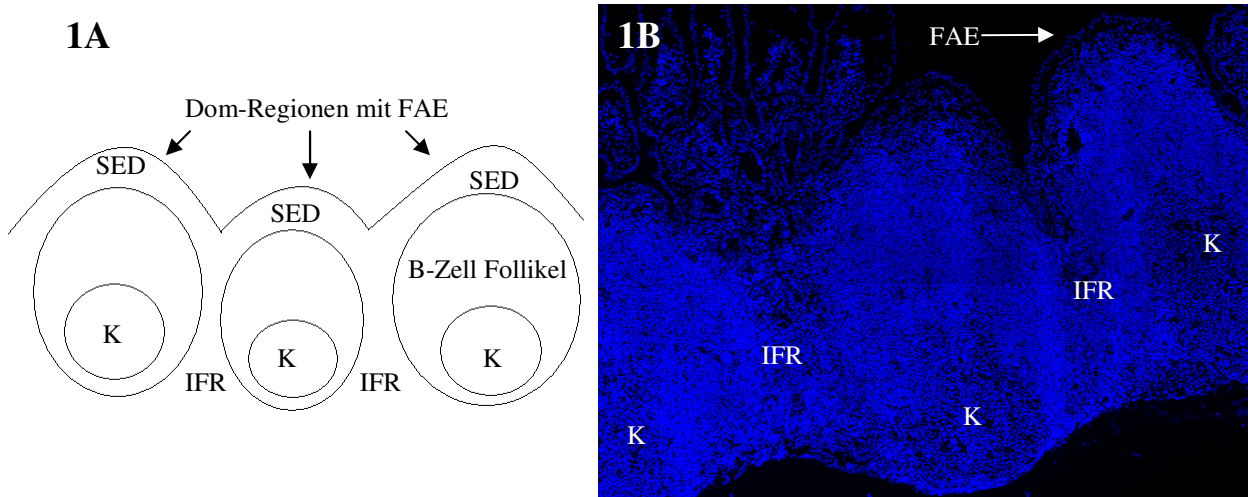


Abbildung 1. 1A Schematische Darstellung einer Peyerschen Platte. Zu erkennen sind B-Zell Follikel, Keimzentren (K), die interfollikulären Regionen (IFR) und die subepithelialen Dom-Regionen (SED). Die M-Zellen befinden sich im Follikel assoziierten Epithels (FAE). 1B Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer BALB/c PP, Dapi Kernfärbung, Zusammengesetzte Aufnahme aus mehreren Einzelbilder, 20x Objektiv.

Das durch die M-Zellen transportierte antigene Material kann so direkt in Kontakt mit den in der subepithelialen Dom-Region lokalisierten Antigen-präsentierenden Zellen kommen (66). Die dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) der PP können daraufhin eine spezifische Immunantwort gerichtet auf das entsprechende Antigen initiieren. Zum Beispiel kann die lokale Aktivierung von Antigen-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen durch die $CCR6^+$ DC in den PP schon wenige Stunden nach Infektion mit Salmonellen nachgewiesen werden (76, 82).

Die DCs der PP können auch die Entwicklung von Immunglobulin-A (Ig-A) produzierenden Plasmazellen regulieren, was bedeutend für die Abwehr von Pathogenen sowie für die Regulation der kommensalen Darmflora ist (48, 61). Es sind zahlreiche verschiedene Populationen von DCs beschrieben worden, deren relativer Beitrag zu den Immunreaktionen im Intestinaltrakt zurzeit intensiv erforscht wird (20, 53, 54).

Solitary Intestinal Lymphoid Tissue

Obwohl schon lange bekannt ist, dass vereinzelt liegende lymphatische Follikel im Intestinaltrakt des Menschen existieren (*Noduli lymphatici solitarii*), wurden einzeln liegende lymphatische Strukturen im Dünndarm der Maus erst im Laufe der letzten 10 Jahren beschrieben. So entdeckten Kanamori *et al.* 1996 einzeln liegende kleine lymphatische Strukturen in der murinen Dünndarmschleimhaut (52). Aufgrund der Lokalisation zwischen den Dünndarmkrypten wurden diese kleinen ~1000 Zellen enthaltenden Strukturen

„*cryptopatches*“ (CP) genannt. Die CP wurden funktionell in Zusammenhang mit der extrathymischen T-Zell Entwicklung gebracht, da in den kleinen Zellaggregationen ein hoher Anteil *lineage*⁻-Marker negativer Zellen (*lineage*⁻ Zellen) gefunden wurden.

Von Hamada *et al.* wurden 2002 zum erst Mal so genannte isolierte lymphatische Follikel (*isolated lymphoid follicles*, ILF) im Dünndarm der weit verbreiteten Inzuchtmausstämme beschrieben (52). Die murinen ILF wurden definiert als einzeln, an der antimesenterialen Seite des Dün- und Dickdarms liegende, eine „tonnenförmige“ Zotte ausfüllende Ansammlung lymphatischer Zellen. Sie besitzen einen charakteristischem B220⁺ B-Zell Anteil, ein FAE mit M-Zellen und gelegentlich Keimzentren. Murine ILF wurden, aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu einzelnen Follikeln der PP, auch funktionell mit mukosalen Immunreaktionen in Verbindung gebracht (59). CP und ILF wurden als zwei unterschiedliche lymphatische Organe mit individuellen Funktionen angesehen.

ILF lassen sich erst einige Tage postnatal nachweisen. Es wird vermutet, dass ILF induzierbare „tertiäre lymphatische Gewebe“ darstellen (59, 63).

Eine detaillierte Studie der einzeln liegenden lymphatischen Strukturen des murinen Dünndarms wurde von Pabst *et al.* 2005 veröffentlicht (71). Es konnte gezeigt werden, dass die meisten einzeln liegenden lymphatischen Organe im Dünndarm der am häufigsten verwendeten Inzuchtmausstämme nicht die Definition von CP oder ILF erfüllen. Vielmehr ergab sich bei der Analyse der Morphologie einer großen Anzahl individueller Strukturen ein Kontinuum von Phänotypen, in dem nur ein kleiner Teil aller Strukturen als CP oder ILF klassifiziert werden können.

So besaßen die meisten der gefundenen Strukturen einen variablen Anteil von B-Zellen und *lineage*⁻ Zellen; es dominiert also ein Phänotyp „zwischen“ CP und ILF (vgl. Halle *et al.*, figure 2E). Zudem wurden große Variationen im Spektrum der Ausprägung der einzelnen Strukturen gefunden: Abhängig vom Mausstamm, Alter und Haltungsbedingungen änderte sich das Größenspektrum der gefundenen Strukturen. Die absolute Anzahl der Strukturen war jedoch charakteristisch für jeweils einen Mausstamm und änderte sich auch mit zunehmendem Alter der Mäuse nicht.

Zusammenfassend wurde von Pabst *et al.* vorgeschlagen, die einzeln liegenden lymphatischen Zellcluster des murinen Dünndarms als Solitary Intestinal Lymphoid Tissue (SILT) zu bezeichnen. Der Dünndarm der Maus enthält also die lymphatischen Organe PP und SILT.

Die Anzahl der SILT-Strukturen pro Quadratzentimeter der Dünndarmschleimhaut ist bei keimfrei gehaltenen Mäusen identisch mit der Anzahl der Strukturen in konventionell

gehaltenen Tieren (70). Bei den keimfrei gehaltenen Tieren finden sich nur sehr kleine SILT-Strukturen. Nach Etablierung einer konventionellen intestinalen Flora zeigt sich bei diesen Tieren eine für konventionell gehaltene Mäuse typische Größenverteilung des SILT. Der Phänotyp des SILT ist also abhängig von mikrobiologischen Stimuli, wobei die (Anlagenbedingte) Anzahl der Strukturen konstant bleibt.

Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit (37) konnte erstmals gezeigt werden, dass zahlreiche einzeln liegende lymphatische Strukturen im Dünndarm der Maus an der Pathogenese der intestinalen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-Infektion beteiligt sind. Zuvor war nur die Infektion und Entzündung der Peyerschen Platten durch *S. typhimurium* in der Literatur ausführlich beschrieben worden. Inwieweit alternative Invasionsrouten bei unmanipulierten Wildtyp Versuchstieren *in vivo* eine Rolle für die Entwicklung der mukosalen Pathologie spielen, war unbekannt (45, 50, 82).

Die bakterielle Kolonisation in- und außerhalb der Peyerschen Platten

In den Arbeiten von Carter und Collins wurde beschrieben, dass sich nach oraler Infektion anfälliger Mausstämmen mit Wildtyp *S. enteritidis* Stämmen die Bakterien auch nach intensiver Spülung aus der nicht-PP Schleimhaut kultivieren lassen (16). Analog hierzu haben auch Hohmann *et al.* gezeigt, dass sich in *S. typhimurium* infizierten Mäusen eine signifikante Infektion der gesamten Dünndarmschleimhaut außerhalb der PP finden lässt (43). Eine Hypothese zum Mechanismus dieser deutlichen bakteriellen Kolonisation der nicht-PP Mukosa wurde in diesen Studien nicht aufgestellt. Es wurde auf die zuvor durchgeführte Studie von Takeuchi (90) verwiesen, die eine direkte Invasion normaler Epithelzellen der Dünndarmschleimhaut durch *S. typhimurium* demonstriert hatte. In diesen oft zitierten Experimenten wurden mit Morphin vorbehandelte und vier Tage ohne Nahrung gehaltene Meerschweinchen oral infiziert (90). So konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, dass Salmonellen direkt in intestinale Epithelzellen eindringen können, genauso wie es *in vitro* zur Invasion verschiedener epithelialer Zelllinien kommt. Ob diese Mechanismen aber im Rahmen der Infektionen unmanipulierter Tiere eine Rolle spielen ist unbekannt (29, 33).

Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir ebenfalls Salmonellen aus der nicht-PP Schleimhaut des murinen Dünndarms von infizierten unmanipulierten Wildtyp Tieren kultivieren. In grober Übereinstimmung mit den zuvor erwähnten Studien haben wir eine bakterielle Kolonisation der nicht-PP Mukosa am Tag 2 nach der Infektion im Bereich von 10-30 % der Koloniezahlen der gesamten PP gefunden (siehe Halle *et al.*, figure 1A). Die Kinetik der

bakteriellen Kolonisation von PP und mesenterialen Lymphknoten stimmte in unseren Experimenten mit vergleichbaren Studien vollkommen überein (9-12).

Die mukosale Entzündung in- und außerhalb der Peyerschen Platten

Die orale Infektion von Mäusen mit *S. typhimurium* führt zu einer bakteriellen Kolonisation und akuten Entzündung der PP, wobei es zur massiven Rekrutierung inflammatorischer Zellen kommt (siehe figure 1 A-C). Mehrere Arbeitsgruppen haben die Infiltration der murinen PP mit neutrophilen Granulozyten, zahlreiche Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie sowie Veränderungen in den Populationen der PP DCs nach Infektion mit Salmonellen beschrieben (18, 81, 89). Neutrophile Granulozyten sind in diesen Studien durchflusszytometrisch gekennzeichnet durch einen Gr1^{high} Ly6C^{int} Ly6G^{high} CD11b⁺ CD68^{low} CD11c⁻ B220⁻ Phänotyp (81, 93).

Wir konnten zeigen, dass in der gesamten Dünndarmschleimhaut nach der Infektion mit *S. typhimurium* ähnliche inflammatorische Zellen nachweisbar sind, wie sie sich in den PP finden lassen. Die absolute Anzahl dieser *post infectionem* neu rekrutierten Ly6G^{high} Ly6C^{int} CD11b⁺ Zellen in der gesamten Dünndarmschleimhaut und allen PP lag in einer vergleichbaren Größenordnung (siehe figure 1B und 1C).

Uns interessierte nun, inwieweit sich diese *S. typhimurium* bedingte mukosale Entzündung anatomisch lokalisieren lässt. Durch die genaue Analyse der inflammatorischen Veränderungen in der Mukosa hofften wir, Hinweise auf die *in vivo* entscheidenden Invasionsmechanismen zu finden.

Im murinen *Typhus abdominalis* Infektionsmodell wurde dieser Möglichkeit zuvor nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Einzelne Berichte über eine diffuse Enteritis im Dünndarm nach Infektion mit *Salmonella Typhimurium* lagen vor (84, 86).

Wir haben eine große Anzahl histologischer Präparate des Dünndarms mit Hilfe der computergestützten 4-Farben Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die histologischen Untersuchungen wurde ein PE-konjugierter anti-Gr1 (anti-granulocyte receptor-1) Antikörper verwendet, da dieser Antikörper an das Ly6C- und das Ly6G-Antigen bindet (22). So konnten wir die zuvor in der Durchflusszytometrie beobachteten inflammatorischen Zellen auch histologisch nachweisen (siehe Abbildung 2).

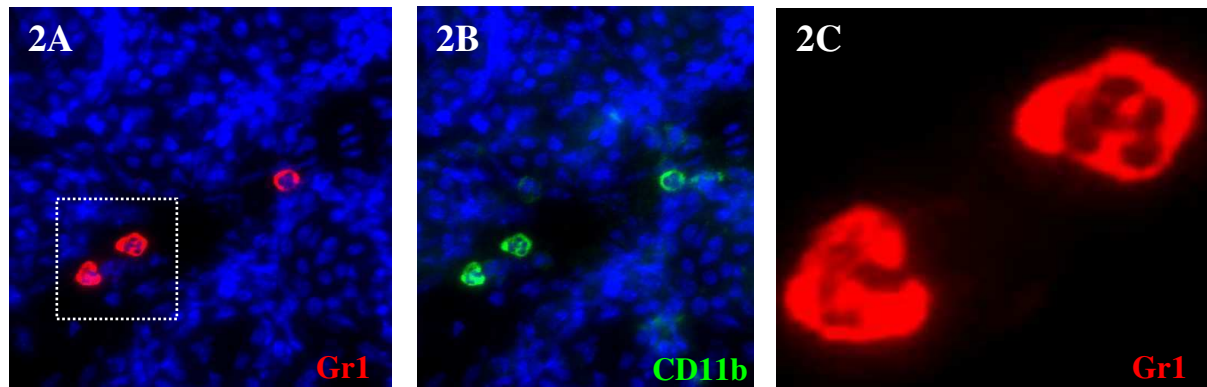


Abbildung 2. Histologische Identifikation von murinen neutrophilen Granulozyten. Die gefärbten Zellen befinden sich in einem kleinen Gefäß im Bereich einer entzündeten *Salmonella*-infizierten PP. Gut zu erkennen ist der gelappte Kern der GR1⁺ CD11b⁺ Zellen. 2A Aufnahme mit anti-Gr1 (rot) und Dapi-Kernfärbung (blau). 2B Dargestellt ist nur die anti-CD11b (grün) und die Dapi-Kernfärbung (blau), 2C Detail aus A, nur anti-Gr1 (rot). BALB/c Maus. Infiziert mit *S. typhimurium*., Originalaufnahmen mit 20x Objektiv.

Bei der Analyse großer zusammenhängender Abschnitte des Dünndarms fanden wir zahlreiche fokale Ansammlungen von Gr1⁺ Zellen auch weit entfernt von PP. Diese lokalen Ansammlungen von Gr1⁺ Zellen außerhalb der PP waren fast ausschließlich mit Strukturen des Solitary Intestinal Lymphoid Tissue kolokalisiert (siehe figure 2A bis 2D und Abbildung 3). Nur gelegentlich konnte einem entzündlich veränderten Areal keine SILT-Struktur oder eine angrenzende PP zugeordnet werden.

Eine zuverlässige Identifikation der SILT-Strukturen gelang mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Dapi-Kernfärbung, bestätigt durch die Analyse anti-CD11c und anti-B220-Antikörper gefärbter Präparate (vergleiche figure 2B und 2C-D). Die typische Ansammlung von CD11c⁺ Zellen im äußeren Bereich der kleinen runden Strukturen ist geeignet zur Identifikation von SILT, da alle SILT-Strukturen solche CD11c⁺ Zellen besitzen, auch die kleinsten Strukturen bei nicht infizierten Kontrolltieren (S. Halle, nicht publizierte Beobachtungen).

So konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die mukosale Entzündung im murinen *Salmonella typhimurium* Infektionsmodell nicht nur auf die Peyerschen Platten beschränkt ist, sondern auch große Teile des Solitary Intestinal Lymphoid Tissue betrifft (vgl. Abbildung 3). Zuvor war schon vermutet worden, dass die kleinen GALT-Strukturen (gut associated lymphoid tissue) bei enteroinvasiven Infektionen eine Rolle spielen. Murinen ILF können an der Antigen-spezifischen Ig-A Antwort und somit an der Abwehr einer Infektion mit Salmonellen teilnehmen (60). Wir sind im Rahmen dieser Arbeit den Effektorfunktionen des

SILT nicht weiter nachgegangen und haben uns darauf beschränkt, die Interaktion der Salmonellen mit den SILT-Strukturen zu untersuchen.

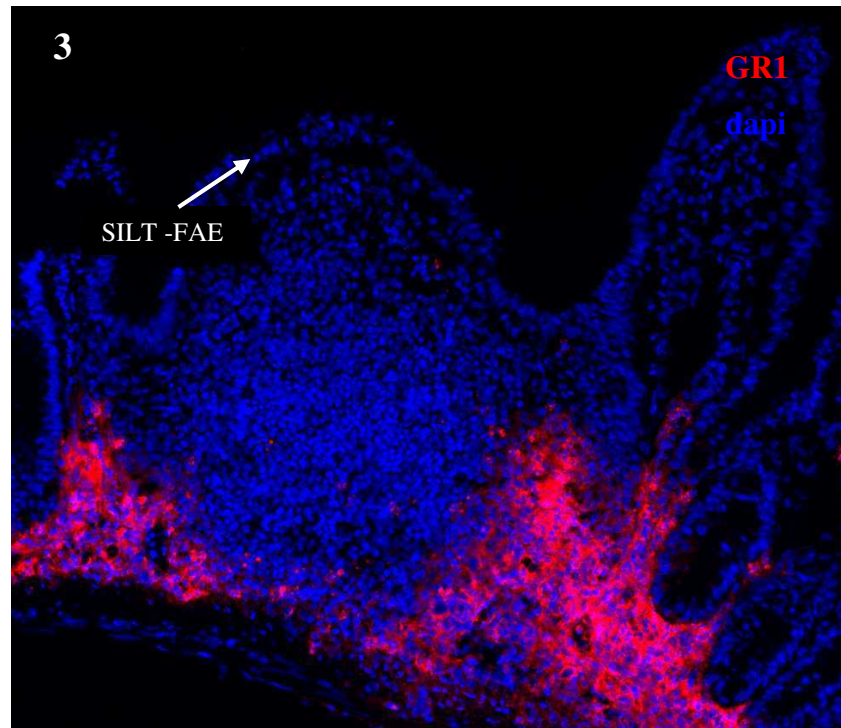


Abbildung 3. SILT-Struktur mit deutlichem Gr1⁺ Zell Infiltrat in der Lamina Propria um den einzeln liegenden Follikel herum. Tag 7 nach Infektion mit 10⁹ *S. typhimurium*. Der Bereich des SILT-Follikels ist, genauso wie die PP-Follikel, meist nicht mit Gr1⁺ Zellen infiltriert. Ausschnitt aus figure 2A. Dapi-Kernfärbung (blau) und anti-Gr1 (rot). Originalaufnahme mit 20x Objektiv.

Der direkte Nachweis von Salmonellen in- und außerhalb der Peyerschen Platten

Wenn SILT-Strukturen im Dünndarm infizierter Mäuse eine deutliche zelluläre Entzündungsreaktion zeigen, und dies durch die direkte Infektion dieser Strukturen über M-Zellen im FAE bedingt ist (38, 50), so müssten sich auch in den frühen Stadien der Infektion Salmonellen im SILT finden lassen.

Durch Analyse einer sehr großen Anzahl histologischer Präparate und dem Einsatz eines spezifischen anti-*Salmonella* Antikörpers konnten wir die Kolonisation von PP und SILT nach der Infektion mit *S. typhimurium* beobachten. An den Tagen 2, 5 und 7 nach Infektion mit *S. typhimurium* waren cirka 40% der SILT-Strukturen nachweisbar infiziert worden (siehe figure 3A).

Dies traf auch auf Salmonellen zu, die zusätzlich genetische Defekte verschiedener Pathogenitätsfaktoren trugen. Wir haben *Salmonella*-Mutanten eingesetzt die defizient für die Gene *sipB* oder *ssrB* sind. Das *sipB*-Gen (*Salmonella* invasion protein B) ist Teil des SPI-1 Genlocus und kodiert ein Protein des SPI-1 TTSS. Die *sipB*-Deletion führt zum Verlust der SPI-1 TTSS-Aktivität, was einen Einfluss auf die frühen Stadien der Infektion hat, da es zu einer Reduktion der Invasionsfähigkeit *in vitro* kommt. Die M-Zell abhängige Invasion von GALT-Strukturen bleibt aber erhalten (31, 41).

Das *ssrB*-Gen ist als essentieller Bestandteil der SPI-2 für die Regulation zahlreicher Virulenzfaktoren (*ssrB*-Regulon) im intrazellulären Milieu notwendig und somit vermutlich von größerer Bedeutung in den späteren Phasen der Infektion (23, 95).

Durch die Infektion von Mäusen mit DsRed-exprimierenden Salmonellen konnten wir weiter die Hypothese unterstützen, dass SILT von *S. typhimurium* infiziert werden kann. Der Nachweis von Salmonellen im Dünndarmgewebe gelang sehr zuverlässig durch die Visualisierung der hell fluoreszierenden DsRed⁺ Bakterien (3, 35). Das Signal des DsRed-Proteins war sehr resistent gegen Ausbleichung und immer kolokalisiert mit dem Signal, das durch die anti-*Salmonella*-Antikörperfärbung generiert wurde. (siehe figure 3C).

Die Lokalisation eines enteroinvasiven Pathogens in einzeln liegenden lymphatischen Strukturen der Maus war zuvor nur für *Yersinia enterocolica* gezeigt worden, wobei aber keinerlei Quantifizierung oder genauere Untersuchung der entzündlichen Reaktion vorgenommen worden war (60).

Die initiale Invasion der Salmonellen durch die M-Zellen des FAE von SILT-Strukturen konnten wir nicht direkt zeigen. Eine quantitative Auswertung von 15 Minuten infizierten Dünndarmabschnitten im Hinblick auf die Invasion des SILT-FAE war nicht erfolgreich, da es nicht gelang, eine signifikante Anzahl von *Salmonella*-SILT und *Salmonella*-PP Interaktionen zu dokumentieren (S. Halle, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Die Reaktion des SILT auf *Salmonella enterica*

Zum Verhalten des SILT nach Infektion mit *S. typhimurium* konnten wir zeigen, dass nach der Infektion SILT-Strukturen zu finden waren, die um ein Vielfaches größer waren als in nicht infizierten Tieren und als die SILT-Strukturen, in denen kein Hinweis auf eine Infektion

zu finden war (siehe figure 3B). Genauso wie die SILT-Strukturen von keimfrei gehaltenen Mäusen nach der Kolonisation mit normaler mikrobiologischer Flora ihr Größenspektrum massiv ändern (70) vergrößern sich auch einzelne infizierte SILT-Strukturen von konventionell gehaltenen Mäusen als Reaktion auf eine Infektion mit Salmonellen.

Auch die PP der Maus und des Menschen zeigen nach der Infektion mit Salmonellen (und anderen Pathogenen) eine deutliche Hypertrophie (64). Welche Mechanismen für diese Zunahme der absoluten Zellzahl der PP verantwortlich sind wurde in weiteren Experimenten untersucht (O. Pabst, S. Halle, Manuskript in Vorbereitung).

Die PP und das SILT reagieren auf Veränderungen der luminalen Flora, wobei vermutlich M-Zell vermittelte Mechanismen eine Rolle spielen (24, 25). Eine genaue Untersuchung des gesamten SILT-Spektrums im Hinblick auf Anzahl und Aktivitätszustand der M-Zellen ist noch nicht durchgeführt worden. Interessant wäre die Untersuchung der Faktoren, welche die M-Zell Entwicklung und Funktion in den kleinen SILT-Strukturen bestimmen.

SILT und lymphatische Neogenese

Es ist umstritten, inwieweit SILT-Strukturen durch inflammatorische Stimuli nach Abschluss der postnatalen Entwicklungsphase induzierbar sind (70, 72, 24, 25). Wir haben die Entwicklung des murinen SILT nach der Infektion mit *S. typhimurium* verfolgt um herauszufinden, ob es zur *de novo* Entwicklung von „tertiärem lymphatischem Gewebe“ kommt. Hierzu wurde die Anzahl der SILT-Strukturen pro Quadratzentimeter bei Kontrolltieren und infizierten Tieren verglichen. Es wurden zahlreiche horizontale Dünndarmabschnitte je Tier in „zellulärer Auflösung“ untersucht, um auch alle kleinen SILT-Strukturen zuverlässig nachweisen zu können (vgl. figure 2A bis 2E).

Im Rahmen der akuten Infektion mit *Salmonella typhimurium* sowie im Zeitraum bis zu 2 Wochen nach Infektion war die Anzahl der SILT-Strukturen pro Quadratzentimeter konstant (figure 4A). Die Anzahl der inflammatorischen Foki spät nach der Infektion entspricht der Häufigkeit von am Tag 2 und 7 infizierten SILT-Strukturen (siehe figure 4B). Trotz der entzündlichen Veränderungen der infizierten SILT-Strukturen konnten wir deren Anzahl pro Quadratzentimeter ausreichend genau verfolgen. Wir konnten in diesem Infektionsmodell also keinen Hinweis auf „lymphatische Neogenese“ finden.

Es wurde vermutet, dass es im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen beim Menschen zur lymphatischen Neogenese kommen kann. Diese „ektopen lymphatischen Gewebe“ in der Mukosa sollen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der pathologischen Immunreaktion spielen (1). Es gibt Berichte über das Auftreten einer „follikulären Hyperplasie“ in der Darmmukosa des Menschen im Rahmen von entzündlichen Darmerkrankungen (13, 51, 67). Eine genaue Analyse der SILT-Strukturen der menschlichen Dün- und Dickdarmschleimhaut wurde aber noch nicht durchgeführt. Somit fehlen zuverlässige Vergleichswerte, um eine Zunahme der Anzahl lymphatischer Strukturen im Darm nachzuweisen. Von Duker wurde 1926 eine Studie zur Anzahl einzelner lymphatischer Follikel des Dickdarms veröffentlicht (Duker und Bussey, 1926). Neuere Studien demonstrieren eine sehr viel höhere Anzahl lymphatischer Strukturen in Dün- und Dickdarm des Menschen (30, 58).

Bezüglich der Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen wurde vermutet, dass das FAE und die M-Zellen der PP und der Solitärfollikel des Menschen die Orte der initialen Läsionen beim Morbus Crohn darstellen (36). Die lymphatischen Strukturen können Interaktionen der luminalen Flora mit dem Wirtsgewebe ermöglichen und so unter Umständen zu pathologischen Reaktionen auf kommensale Bakterien beitragen.

Die alternativen Invasionswege und die Dissemination der Salmonellen

Nachdem wir gezeigt hatten, dass die mukosale Entzündung nach der oralen Infektion mit Salmonellen auf die organisierten lymphatische Strukturen konzentriert ist, wollten wir abschließend wissen, ob Salmonellen trotzdem in der umgebenden Lamina propria zu finden sind.

Auch durch intensive Analyse sehr großer Bereiche der Lamina Propria von Mäusen, die mit DsRed-exprimierenden Salmonellen infiziert worden waren, konnten wir nur sehr wenige Salmonellen außerhalb der organisierten GALT-Strukturen finden. Obwohl über 99% der Oberfläche des murinen Dünndarms aus normaler Schleimhaut und nur ein sehr kleiner Teil der gesamten Epitheloberfläche aus FAE von PP und SILT besteht (71), fanden wir DsRed-exprimierende Salmonellen fast ausschließlich in PP und SILT. Bei der Auswertung von zahlreichen histologischen Präparaten des Dünndarms konnten wir über 500 DsRed⁺ Salmonellen in PP, 100 in SILT und nur 13 DsRed⁺ Salmonellen in der Lamina Propria finden, ohne Hinweis auf eine nahe gelegene GALT-Struktur (S. Halle, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Wir haben also kaum Hinweise auf eine „nicht M-Zell“ vermittelte Infektion der murinen Dünndarmschleimhaut gefunden. Die Salmonellen waren in der nicht-PP nicht-SILT Schleimhaut kaum vorhanden und dort fand sich ebenfalls keine entzündliche Reaktion.

In zahlreichen Mausstämmen, die bedingt durch verschiedene genetische Manipulationen keine organisierten GALT-Organen besitzen, und also auch nach der klassischen Sichtweise keine M-Zellen besitzen sollten, lösen Salmonellen, Yersinien und andere Pathogene eine ebenso schwere systemische Erkrankung aus (39). Diese Studien haben Anlass zur Erforschung der alternativen, „nicht M-Zell abhängigen“ Invasionswege gegeben (siehe Abbildung 4A).

Die direkte Invasion von Epithelzellen durch *S. typhimurium* wurde vielfach beschrieben (8, 90). An der Spitze von Darmzotten, wo apoptotische Epithelzellen abgestoßen werden, konnte die Invasion von Listerien demonstriert werden (74). Die Verbreitung der Salmonellen mit Hilfe CD18⁺ Zellen direkt aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf wurde von Vazquez-Torres *et al.* vorgeschlagen (92, 96). Den Eintritt von Salmonellen, Yersinien und Konidien von *Aspergillus fumigatus* in das Wirtsgewebe sollen außerdem „intestinal villous“ M-Zellen vermitteln können (39, 47, 91). CX3CR1⁺ DCs können mit Hilfe der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie dabei beobachtet werden, wie sie Zytoplasmaausläufer durch das intakte Dünndarmepithel stecken und auf diese Weise sogar mit Salmonellen im Darmlumen interagieren (19, 69, 91).

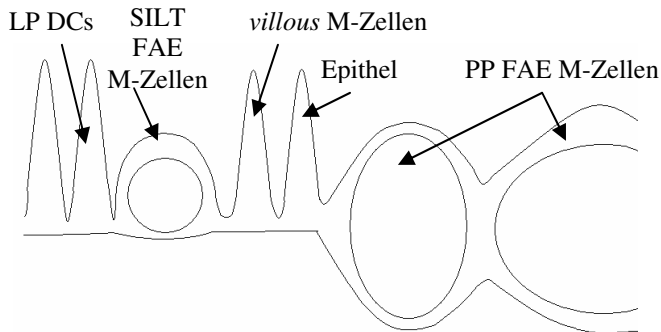
Es ist noch unklar, ob diese Vorgänge auch *in vivo* im unmanipulierten Dünndarm vorkommen und wie relevant diese Prozesse für die Entzündung der Schleimhaut oder die Dissemination der Salmonellen letztendlich sind. Unsere Arbeit legt die Vermutung nahe, dass diese Mechanismen bei unmanipulierten Wildtyp Mäusen für die Invasion und Entzündung der intestinalen Schleimhaut durch *S. typhimurium* nur eine untergeordnete Bedeutung haben.

Unbekannt ist, wie die weitere Dissemination der Salmonellen nach Überwindung des intestinalen Epithels abläuft (92). Gelangen die Salmonellen über die Blut- oder die Lymphbahn aus dem Darm in den gesamten Organismus? Sind sie dabei von Wirtszellen phagozytiert, an Zellen adhären oder extrazellulär (siehe Abbildung 4B)?

Von Pullinger *et al.* konnte 2007 im bovinen *Salmonella enterica* Infektionsmodell durch Kanülierung der efferenten Blut- und Lymphbahnen des infizierten Darms gezeigt werden, dass Salmonellen in diesem Modell überwiegend frei über die intestinalen Lymphbahnen

disseminieren (75). Noch fehlen vergleichbare Studien der *Salmonella*-Dissemination im Mausmodell.

4 A



4 B

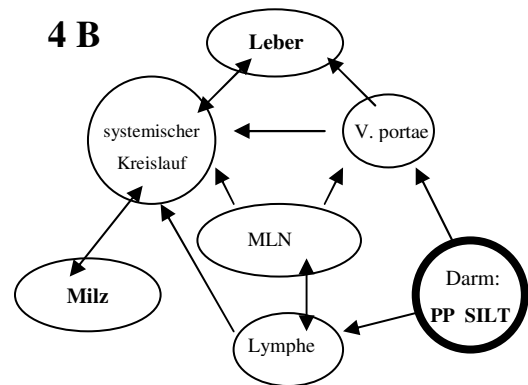


Abbildung 4. 4A Schematische Darstellung der verschiedenen hypothetischen *Salmonella*-Invasionswege aus dem Darmlumen in die Dünndarmmukosa. 4B Schematische Darstellung der möglichen Disseminationswege der Salmonellen nach Infektion von PP und SILT im Dünndarm. Mesenteriale Lymphknoten (MLN, mesenteric lymph node). Das gesamte Blut des Intestinaltraktes wird über das Pfortadersystem (Vena portae) durch die Leber geleitet. Leber und Milz von anfälligen Mausstämmen werden massiv besiedelt und die hohen Koloniezahlen in diesen Organen sind eine wichtiger Faktor für die Letalität nach *Salmonella*-Infektion.

Ob die massive Entzündung von SILT und PP als lokale Quelle für die Streuung der Salmonellen fungieren kann, haben wir in dieser Arbeit nicht untersucht. Es erscheint jedoch sehr plausibel, dass die infizierten GALT-Strukturen *in vivo* ein Reservoir von Salmonellen beherbergen, die aufgrund der lokalen Entzündungsreaktion leicht in geschädigte Kapillaren der Blut- oder Lymphbahn gelangen können. Wahrscheinlich spielt die Entzündung von hunderten SILT-Strukturen im Dünndarm auch eine Rolle für die Dissemination der Salmonellen in den gesamten Organismus.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass *in vivo* die Peyerschen Platten und das Solitary Intestinal Lymphoid Tissue besonders geeignet zur Aufnahme luminaler Pathogene und andere Antigene sind. Somit sind diese lymphatischen Organe wahrscheinlich besonders effektiv bei der Initiierung immunologische Reaktionen. Wie man therapeutisch in diese verschiedenen Prozesse eingreifen kann und wie orale *Salmonella*-Vakzine weiter optimiert werden können, so dass in PP und SILT eine effektive und lang anhaltende Immunreaktion ausgelöst werden kann, muss in zukünftigen Arbeiten weiter erforscht werden.

Ausblick

Beim menschlichen *Typhus abdominalis* gibt es vereinzelte Berichte über die Entzündung der solitären Lymphfollikel (57). Vergleichbar hierzu konnten wir zeigen, dass auch im murinen *Typhus*-Infektionsmodell das Solitary Intestinal Lymphoid Tissue betroffen ist. So haben wir die Entzündung von hunderten SILT-Strukturen im murinen Dünndarm in diesem Infektionsmodell neu beschreiben können.

Wenn man von einer zwischen den Spezies vergleichbaren Häufigkeit lymphatischer Strukturen im Darm ausgeht, besitzt der Mensch wahrscheinlich um die 45000 SILT-Strukturen alleine im Dünndarm (80). Somit kann vermutet werden, dass ein großer Teil der M-Zellen im Intestinaltrakt des Menschen im Follikel assoziierten Epithel von solitären lymphatischen Strukturen zu finden sind.

Es wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein, inwieweit die SILT-Strukturen der Maus und des Menschen an anderen enteroinvasiven Erkrankungen, an der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen, an der Regulation der intestinalen IgA-Produktion, der Toleranzentwicklung und den anderen Funktionen des gastrointestinalen Immunsystems teilnehmen.

Zum Verständnis des Verhaltens der Salmonellen in den PP, den SILT-Strukturen und den drainierenden Lymphknoten könnte in zukünftigen Studien die direkte Beobachtung *in vivo* mit Hilfe der 2-Photonen Mikroskopie hilfreich sein (42, 94).

Von besonderer Bedeutung für die Aufklärung der Funktionen des SILT wäre eine ausführliche Studie über die Eigenschaften der SILT-Strukturen im Rahmen von chronischen intestinalen Entzündungsvorgängen. Eine Analyse verschiedener Mausmodelle für entzündliche Darmerkrankungen mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten Methoden könnte aufklären, ob es tatsächlich in diesem Zusammenhang zu „lymphatischer Neogenese“ im Darm kommt und wie sich das SILT im Rahmen chronischer Entzündungsreaktionen verändert. Eine detaillierte Studie der menschlichen SILT-Strukturen sollte durchgeführt werden, um die Anzahl und den Phänotyp der Strukturen bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und gesunden Kontrollpersonen zu vergleichen. Im Endeffekt gilt es herauszufinden, welche Rolle das Solitary Intestinal Lymphoid Tissue im Rahmen dieser Krankheiten spielt und ob eine therapeutische Beeinflussung dieser kleinen lymphatischen Strukturen des Darms medizinisch sinnvoll sein könnte.

Kurzzusammenfassung

Zur Infektion des Wirtsgewebes nutzen Salmonellen, Listerien, Yersinien und verschiedene Viren die M-Zellen der Peyerschen Platten im Dünndarm von Menschen und Mäusen.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben den Peyerschen Platten auch das Solitary Intestinal Lymphoid Tissue (SILT) an der Pathogenese der oralen *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-Infektion der Maus beteiligt ist. SILT-Strukturen sind einzeln liegende lymphatische Strukturen, ähnlich einem Follikel der Peyerschen Platten, doch heterogen in Bezug auf ihre individuelle Größe und zelluläre Zusammensetzung. Nach oraler Infektion unmanipulierter Wildtyp Mäuse konnten wir durchflusszytometrisch eine inflammatorische Reaktion in den Peyerschen Platten sowie in der umgebenden Dünndarmschleimhaut feststellen. Durch umfassende histologische Untersuchungen mit Hilfe der 4-Farben Fluoreszenzmikroskopie konnten wir die inflammatorischen Zellinfiltrationen außerhalb der Peyerschen Platten genau lokalisieren. Es zeigte sich, dass zahlreiche Strukturen des SILT eine massive Entzündungsreaktion aufwiesen. Außerdem ließen sich immunhistologisch *Salmonella*-Antigene in einem großen Anteil des SILT dokumentieren. Infizierte SILT-Strukturen waren im Durchschnitt signifikant größer als nicht infizierte Strukturen. Im Verlauf der Infektion entstanden auch nach zwei Wochen keine zusätzlichen lymphatischen Strukturen in der Dünndarmschleimhaut. Nach Infektion mit Salmonellen, die nur im intrazellulären Milieu *in vivo* ein fluoreszierendes Protein exprimieren, konnten wir diese in Peyerschen Platten und SILT nachweisen, jedoch nur äußerst selten in der umgebenden Mukosa. Die Konzentration des pathologischen Geschehens auf M-Zell-kompetente Strukturen im Dünndarm verdeutlicht die Bedeutung dieser organisierten lymphatischen Organe im Rahmen von Reaktionen des intestinalen Schleimhautimmunsystems.

Bis vor einigen Jahren waren die zahlreichen murinen SILT-Strukturen unbekannt. Die Funktion des SILT für die Entwicklung von mukosaler Immunität und Toleranz sowie die Rolle des SILT im Rahmen der Pathogenese enteroinvasiver Erkrankungen und entzündlicher Darmerkrankungen wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Literatur

1. **Aloisi, F., and R. Pujol-Borrell.** 2006. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **6**:205-217.
2. **Altier, C.** 2005. Genetic and environmental control of salmonella invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**:85-92.
3. **Baird, G. S., D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien.** 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:11984-11989.
4. **Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Russmann, and W. D. Hardt.** 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**:2839-2858.
5. **Becker, D., M. Selbach, C. Rollenhagen, M. Ballmaier, T. F. Meyer, M. Mann, and D. Bumann.** 2006. Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* **440**:303-307.
6. **Biedzka-Sarek, M., and M. El Skurnik.** 2006. How to outwit the enemy: dendritic cells face *Salmonella*. *APMIS* **114**:589-600.
7. **Braunwald, E.** 2001. *Harrison's principles of internal medicine*, 15th ed. McGraw-Hill, New York.
8. **Brown, N. F., B. A. Vallance, B. K. Coombes, Y. Valdez, B. A. Coburn, and B. B. Finlay.** 2005. *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**:e32.
9. **Bumann, D.** 2002. Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Molecular microbiology* **43**:1269-1283.
10. **Bumann, D.** 2001. In vivo visualization of bacterial colonization, antigen expression, and specific T-cell induction following oral administration of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **69**:4618-4626.
11. **Bumann, D.** 2001. Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect Immun* **69**:7493-7500.
12. **Bumann, D., W. G. Metzger, E. Mansouri, O. Palme, M. Wendland, R. Hurwitz, G. Haas, T. Aebischer, B. U. von Specht, and T. F. Meyer.** 2001. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* **20**:845-852.
13. **Carlsen, H. S., E. S. Baekkevold, F. E. Johansen, G. Haraldsen, and P. Brandtzaeg.** 2002. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut* **51**:364-371.
14. **Caron, J., J. C. Loredó-Osti, L. Laroche, E. Skamene, K. Morgan, and D. Malo.** 2002. Identification of genetic loci controlling bacterial clearance in experimental *Salmonella enteritidis* infection: an unexpected role of Nramp1 (Slc11a1) in the persistence of infection in mice. *Genes Immun* **3**:196-204.
15. **Carter, P. B., and F. M. Collins.** 1974. Growth of typhoid and paratyphoid bacilli in intravenously infected mice. *Infect Immun* **10**:816-822.
16. **Carter, P. B., and F. M. Collins.** 1974. The route of enteric infection in normal mice. *The Journal of experimental medicine* **139**:1189-1203.
17. **Chang, Y. T., and J. Y. Lin.** 2007. Red umbilicus as a clinical manifestation in a 19-month-old girl with typhoid colonic perforation. *Kaohsiung J Med Sci* **23**:80-83.

18. **Cheminay, C., D. Chakravorty, and M. Hensel.** 2004. Role of neutrophils in murine salmonellosis. *Infect Immun* **72**:468-477.
19. **Chieppa, M., M. Rescigno, A. Y. Huang, and R. N. Germain.** 2006. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine* **203**:2841-2852.
20. **Contractor, N., J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall.** 2007. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* **179**:2690-2694.
21. **Crump, J. A., S. P. Luby, and E. D. Mintz.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization* **82**:346-353.
22. **Daley, J. M., A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina.** 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* **83**:64-70.
23. **Dieye, Y., J. L. Dyszel, R. Kader, and B. M. Ahmer.** 2007. Systematic analysis of the regulation of type three secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* **7**:3.
24. **Eberl, G.** 2007. Development and function of secondary and tertiary lymphoid tissues. *European journal of immunology* **37**:300-301.
25. **Eberl, G.** 2007. From induced to programmed lymphoid tissues: the long road to preempt pathogens. *Trends Immunol* **28**:423-428.
26. **Everest, P., J. Wain, M. Roberts, G. Rook, and G. Dougan.** 2001. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends in microbiology* **9**:316-320.
27. **Fahy, O. L., S. L. Townley, N. J. Coates, I. Clark-Lewis, and S. R. McColl.** 2004. Control of *Salmonella* dissemination in vivo by macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha/CCL20. *Lab Invest* **84**:1501-1511.
28. **Fahy, O. L., S. L. Townley, and S. R. McColl.** 2006. CXCL16 regulates cell-mediated immunity to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis via promotion of gamma interferon production. *Infect Immun* **74**:6885-6894.
29. **Finlay, B. B., and J. H. Brumell.** 2000. *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**:623-631.
30. **Fujimura, Y., M. Hosobe, and T. Kihara.** 1992. Ultrastructural study of M cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonoscopic biopsy. *Dig Dis Sci* **37**:1089-1098.
31. **Galan, J. E.** 2001. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:53-86.
32. **Gebert, A., H. J. Rothkotter, and R. Pabst.** 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int Rev Cytol* **167**:91-159.
33. **Ginocchio, C., J. Pace, and J. E. Galan.** 1992. Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:5976-5980.
34. **Grassl, G. A., and B. B. Finlay.** 2008. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current opinion in gastroenterology* **24**:22-26.
35. **Gross, L. A., G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige, and R. Y. Tsien.** 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:11990-11995.
36. **Gullberg, E., and J. D. Soderholm.** 2006. Peyer's patches and M cells as potential sites of the inflammatory onset in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1072**:218-232.

37. **Halle, S., D. Bumann, H. Herbrand, Y. Willer, S. Dahne, R. Forster, and O. Pabst.** 2007. Solitary intestinal lymphoid tissue provides a productive port of entry for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **75**:1577-1585.
38. **Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, H. Yamamoto, and H. Ishikawa.** 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* **168**:57-64.
39. **Handley, S. A., R. D. Newberry, and V. L. Miller.** 2005. *Yersinia enterocolitica* invasin-dependent and invasin-independent mechanisms of systemic dissemination. *Infect Immun* **73**:8453-8455.
40. **Hase, K., T. Murakami, H. Takatsu, T. Shimaoka, M. Iimura, K. Hamura, K. Kawano, S. Ohshima, R. Chihara, K. Itoh, S. Yonehara, and H. Ohno.** 2006. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol* **176**:43-51.
41. **Hayward, R. D., P. J. Hume, E. J. McGhie, and V. Koronakis.** 2002. A *Salmonella* SipB-derived polypeptide blocks the 'trigger' mechanism of bacterial entry into eukaryotic cells. *Molecular microbiology* **45**:1715-1727.
42. **Helmchen, F., and W. Denk.** 2005. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* **2**:932-940.
43. **Hohmann, A. W., G. Schmidt, and D. Rowley.** 1978. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. *Infect Immun* **22**:763-770.
44. **Hopkins, S. A., F. Niedergang, I. E. Corthesy-Theulaz, and J. P. Kraehenbuhl.** 2000. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol* **2**:59-68.
45. **Hughes, E. A., and J. E. Galan.** 2002. Immune response to *Salmonella*: location, location, location? *Immunity* **16**:325-328.
46. **Hutchings, A. B., A. Helander, K. J. Silvey, K. Chandran, W. T. Lucas, M. L. Nibert, and M. R. Neutra.** 2004. Secretory immunoglobulin A antibodies against the sigma1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches. *J Virol* **78**:947-957.
47. **Jang, M. H., M. N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasakawa, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, and H. Kiyono.** 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:6110-6115.
48. **Johansson-Lindbom, B., and W. W. Agace.** 2007. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological reviews* **215**:226-242.
49. **Jones, B. D.** 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43 Spec No**:110-117.
50. **Jones, B. D., N. Ghorri, and S. Falkow.** 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine* **180**:15-23.
51. **Kaiserling, E.** 2001. Newly-formed lymph nodes in the submucosa in chronic inflammatory bowel disease. *Lymphology* **34**:22-29.
52. **Kanamori, Y., K. Ishimaru, M. Nanno, K. Maki, K. Ikuta, H. Nariuchi, and H. Ishikawa.** 1996. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *The Journal of experimental medicine* **184**:1449-1459.

53. **Kelsall, B. L., and W. Strober.** 1996. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *The Journal of experimental medicine* **183**:237-247.
54. **Kelsall, B. L., and W. Strober.** 1996. The role of dendritic cells in antigen processing in the Peyer's patch. *Ann N Y Acad Sci* **778**:47-54.
55. **Kotton, C. N., A. J. Lankowski, N. Scott, D. Sisul, L. M. Chen, K. Raschke, G. Borders, M. Boaz, A. Spentzou, J. E. Galan, and E. L. Hohmann.** 2006. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine* **24**:6216-6224.
56. **Kraehenbuhl, J. P., and M. R. Neutra.** 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**:301-332.
57. **Kraus, M. D., B. Amatya, and Y. Kimula.** 1999. Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. *Mod Pathol* **12**:949-955.
58. **Langman, J. M., and R. Rowland.** 1986. The number and distribution of lymphoid follicles in the human large intestine. *J Anat* **149**:189-194.
59. **Lorenz, R. G., D. D. Chaplin, K. G. McDonald, J. S. McDonough, and R. D. Newberry.** 2003. Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *J Immunol* **170**:5475-5482.
60. **Lorenz, R. G., and R. D. Newberry.** 2004. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **1029**:44-57.
61. **Macpherson, A. J., and T. Uhr.** 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303**:1662-1665.
62. **Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 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. *The Journal of experimental medicine* **192**:237-248.
63. **McDonald, K. G., J. S. McDonough, and R. D. Newberry.** 2005. Adaptive immune responses are dispensable for isolated lymphoid follicle formation: antigen-naive, lymphotoxin-sufficient B lymphocytes drive the formation of mature isolated lymphoid follicles. *J Immunol* **174**:5720-5728.
64. **McLachlan, J. B., J. P. Hart, S. V. Pizzo, C. P. Shelburne, H. F. Staats, M. D. Gunn, and S. N. Abraham.** 2003. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol* **4**:1199-1205.
65. **Monack, D. M., D. Hersh, N. Ghorri, D. Bouley, A. Zychlinsky, and S. Falkow.** 2000. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *The Journal of experimental medicine* **192**:249-258.
66. **Mora, J. R., M. R. Bono, N. Manjunath, W. Weninger, L. L. Cavanagh, M. Roseblatt, and U. H. Von Andrian.** 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* **424**:88-93.
67. **Nascimbeni, R., F. Di Fabio, E. Di Betta, P. Mariani, S. Fisogni, and V. Villanacci.** 2005. Morphology of colorectal lymphoid aggregates in cancer, diverticular and inflammatory bowel diseases. *Mod Pathol* **18**:681-685.
68. **Nauciel, C., and F. Espinasse-Maes.** 1992. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* **60**:450-454.
69. **Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H. C. Reinecker.** 2005.

- CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**:254-258.
70. **Pabst, O., H. Herbrand, M. Friedrichsen, S. Velaga, M. Dorsch, G. Berhardt, T. Worbs, A. J. Macpherson, and R. Forster.** 2006. Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J Immunol* **177**:6824-6832.
 71. **Pabst, O., H. Herbrand, T. Worbs, M. Friedrichsen, S. Yan, M. W. Hoffmann, H. Korner, G. Bernhardt, R. Pabst, and R. Forster.** 2005. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *European journal of immunology* **35**:98-107.
 72. **Pabst, R.** 2007. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett* **112**:1-8.
 73. **Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar.** 2002. Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**:1770-1782.
 74. **Pentecost, M., G. Otto, J. A. Theriot, and M. R. Amieva.** 2006. *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. *PLoS Pathog* **2**:e3.
 75. **Pullinger, G. D., S. M. Paulin, B. Charleston, P. R. Watson, A. J. Bowen, F. Dziva, E. Morgan, B. Villarreal-Ramos, T. S. Wallis, and M. P. Stevens.** 2007. Systemic translocation of *Salmonella enterica* serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2. *Infect Immun* **75**:5191-5199.
 76. **Ravindran, R., L. Rusch, A. Itano, M. K. Jenkins, and S. J. McSorley.** 2007. CCR6-dependent recruitment of blood phagocytes is necessary for rapid CD4 T cell responses to local bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:12075-12080.
 77. **Richter-Dahlfors, A., A. M. Buchan, and B. B. Finlay.** 1997. Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine* **186**:569-580.
 78. **Rodenburg, W., I. M. Bovee-Oudenhoven, E. Kramer, R. van der Meer, and J. Keijer.** 2007. Gene expression response of the rat small intestine following oral *Salmonella* infection. *Physiol Genomics* **30**:123-133.
 79. **Rollenhagen, C., M. Sorensen, K. Rizos, R. Hurvitz, and D. Bumann.** 2004. Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8739-8744.
 80. **Rosner, A. J., and D. F. Keren.** 1984. Demonstration of M cells in the specialized follicle-associated epithelium overlying isolated lymphoid follicles in the gut. *J Leukoc Biol* **35**:397-404.
 81. **Rydstrom, A., and M. J. Wick.** 2007. Monocyte recruitment, activation, and function in the gut-associated lymphoid tissue during oral *Salmonella* infection. *J Immunol* **178**:5789-5801.
 82. **Salazar-Gonzalez, R. M., J. H. Niess, D. J. Zammit, R. Ravindran, A. Srinivasan, J. R. Maxwell, T. Stoklasek, R. Yadav, I. R. Williams, X. Gu, B. A. McCormick, M. A. Pazos, A. T. Vella, L. Lefrancois, H. C. Reinecker, and S. J. McSorley.** 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* **24**:623-632.
 83. **Sansonetti, P.** 2002. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* **50 Suppl 3**:III2-8.

84. **Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsois, R. A. Kingsley, L. G. Adams, and A. J. Baumler.** 2001. Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**:1335-1344.
85. **Schlumberger, M. C., A. J. Muller, K. Ehrbar, B. Winnen, I. Duss, B. Stecher, and W. D. Hardt.** 2005. Real-time imaging of type III secretion: Salmonella SipA injection into host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:12548-12553.
86. **Shirai, Y., K. Sunakawa, Y. Ichihashi, and H. Yamaguchi.** 1979. A morphological study in germfree mice (Salmonella infection). *Exp Pathol (Jena)* **17**:158-166.
87. **Skov, M. N., J. S. Andersen, S. Aabo, S. Ethelberg, F. M. Aarestrup, A. H. Sorensen, G. Sorensen, K. Pedersen, S. Nordentoft, K. E. Olsen, P. Gerner-Smidt, and D. L. Baggesen.** 2007. Antimicrobial drug resistance of Salmonella isolates from meat and humans, Denmark. *Emerg Infect Dis* **13**:638-641.
88. **Suar, M., J. Jantsch, S. Hapfelmeier, M. Kremer, T. Stallmach, P. A. Barrow, and W. D. Hardt.** 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range Salmonella enterica serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infect Immun* **74**:632-644.
89. **Sundquist, M., and M. J. Wick.** 2005. TNF-alpha-dependent and -independent maturation of dendritic cells and recruited CD11c(int)CD11b+ Cells during oral Salmonella infection. *J Immunol* **175**:3287-3298.
90. **Takeuchi, A.** 1967. Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am J Pathol* **50**:109-136.
91. **Vallon-Eberhard, A., L. Landsman, N. Yogev, B. Verrier, and S. Jung.** 2006. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J Immunol* **176**:2465-2469.
92. **Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang.** 1999. Extraintestinal dissemination of Salmonella by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-808.
93. **Wick, M. J.** 2007. Monocyte and dendritic cell recruitment and activation during oral Salmonella infection. *Immunol Lett* **112**:68-74.
94. **Worbs, T., T. R. Mempel, J. Bolter, U. H. von Andrian, and R. Forster.** 2007. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine* **204**:489-495.
95. **Worley, M. J., K. H. Ching, and F. Heffron.** 2000. Salmonella SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular microbiology* **36**:749-761.
96. **Worley, M. J., G. S. Nieman, K. Geddes, and F. Heffron.** 2006. Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:17915-17920.

II Publikation

Infection and Immunity

April 2007; Volume 75 No. 4: page 1577-85.

Published online ahead of print 5 February 2007.

doi:10.1128/IAI.01392-06. Print ISSN: 0019-9567. Online ISSN: 1098-5522

Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Diese Publikation bildet die Grundlage dieser Dissertationsschrift gemäß § 3 Absatz 3 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover vom 9.11.2005.

Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium[∇]

Stephan Halle,¹ Dirk Bumann,² Heike Herbrand,¹ Yvonne Willer,² Sabrina Dähne,¹ Reinhold Förster,¹ and Oliver Pabst^{1*}

Institute of Immunology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany,¹ and Junior Research Group “Mucosal Infections,” Institute of Immunology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany²

Received 30 August 2006/Returned for modification 20 November 2006/Accepted 22 January 2007

Oral infection of mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in the colonization of Peyer’s patches, triggering a vigorous inflammatory response and immunopathology at these sites. Here we demonstrate that in parallel to Peyer’s patches a strong inflammatory response occurs in the intestine, resulting in the appearance of numerous inflammatory foci in the intestinal mucosa. These foci surround small lymphoid cell clusters termed solitary intestinal lymphoid tissue (SILT). *Salmonella* can be observed inside SILT at early stages of infection, and the number of infected structures matches the number of inflammatory foci arising at later time points. Infection leads to enlargement and morphological destruction of SILT but does not trigger de novo formation of lymphoid tissue. In conclusion, SILT, a lymphoid compartment mostly neglected in earlier studies, represents a major site for *Salmonella* invasion and ensuing mucosal pathology.

Although the epithelia lining the intestine provide a tight barrier against potentially harmful antigens and microbes, homeostasis of intestinal immune functions requires monitoring of the intestinal microflora. This is achieved by a controlled uptake of luminal microbiota into mucosal tissues by specialized microfold (M) cells and lamina propria dendritic cells (11, 20). This gateway into the host is exploited by various enteropathogens such as *Salmonella*, *Yersinia*, and *Shigella* spp. These bacteria express genes that allow them to adhere to and invade M cells and thereby infect host tissues (7, 14, 26). It is well known that M cells are present in the follicle-associated epithelium (FAE) overlying Peyer’s patches (PP) (19), and consequently PP are considered to represent important mediators of mucosal pathogenicity displayed by these bacteria.

However, M cells are also sporadically present in morphologically inconspicuous villi (intravillus M cells) (12). Although the frequency of M-cell-containing villi is low, their number might increase upon stimulation, and intravillus M cells have been suggested to support *Salmonella* invasion in lymphotoxin α mutants which lack any organized lymphoid tissue in the intestine (12). Another gateway into the organism might be provided by dendritic cells residing in the intestinal lamina propria. These cells have been shown to extend dendrites through the epithelial lining into the intestinal lumen, which might allow such cells to directly sample antigens as well as pathogens (21, 27, 28). Indeed, there is solid evidence showing that the ability to target M cells and colonize PP is not mandatory for the development of systemic disease caused by *Salmonella enterica*. Vasquez-Torrez et al. demonstrated that salmonellae that are unable to target M cells can penetrate the intestinal barrier and disseminate in a β 2-integrin-dependent

mechanism (34). Similarly, *Yersinia enterocolitica* utilizes invasin-dependent and invasin-independent routes for systemic dissemination (9). Furthermore, hepatosplenic infection by *Yersinia pseudotuberculosis* has been suggested to be independent of prior colonization of lymphoid organs, but to result from direct dissemination of bacteria replicating in the intestinal lumen into the circulation (2).

Despite these alternative infection pathways that appear to contribute to the systemic dissemination of *Salmonella*, M-cell penetration, along with the subsequent infection of the underlying lymphoid tissue, is considered the main route of *Salmonella* infection of the intestinal mucosa (29). Besides PP, M cells have been described in the FAE of small lymphoid aggregations, termed isolated lymphoid follicles (ILF), that exist in the small intestine of numerous species, including mice and humans (8, 18, 24). ILF share many architectural features with PP, including a compact B-cell rich follicle covered by the subepithelial dome region consisting of dendritic cells and an overlying FAE including M cells. Consistent with such architectural features, ILF are capable of supporting immunoglobulin production in response to *Salmonella* infection (16), as well as to oral immunization (35). We have recently suggested that ILF do not constitute a separate type of lymphoid organ but merely represent a particularly well-organized manifestation of a common lymphoid structure that we termed solitary intestinal lymphoid tissue (SILT) (24). The entire spectrum of SILTs ranges from small lymphoid aggregations mostly filled with stem cell-like cells, also referred to as cryptopatches (CP), to larger ILF that resemble a single dome of PP. SILT structures are interconvertible; thus, CP can develop into ILF, and ILF might revert into CP (see Fig. 2E). Conversion of small SILT into fully developed SILT can be triggered by external influences, including microbial stimulation (23). Consequently, the spectrum of SILTs observed in germfree mice is predominated by particularly small structures resembling CP, whereas ILF are absent in such mice. In response to microbial colonization of germfree mice, the spectrum of SILTs adapts to

* Corresponding author. Mailing address: Institute of Immunology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg Strasse 1, 30625 Hannover, Germany. Phone: 49-511-5329725. Fax: 49-511-5329722. E-mail: Pabst.Oliver@mh-hannover.de.

[∇] Published ahead of print on 5 February 2007.

encompass a broad spectrum of differently sized structures, now including ILF (23). Thus, the entire array of differently organized SILT structures is subject to environmental influences and will frequently contain numerous SILTs that display intermediate phenotypes between CP and ILF. In contrast to its dynamic phenotype, the frequency of SILTs invariably ranges from 40 to 60 structures per square centimeter throughout the murine small intestine, resulting in more than 1,000 SILT structures in the intestine (24). Thus, usually the overall number of SILTs by far exceeds that of ILF. Consequently, SILT provides a prominent source of M cells and might substantially contribute to invasion of pathogens with M-cell tropism.

We report here that SILT can be targeted by *Salmonella* for tissue entry, causing a local inflammation and immunopathology in these structures. Quantification of inflammatory foci in the intestinal mucosa suggests that, in addition to PP, SILT substantially contributes to *Salmonella*-induced mucosal pathology.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of sections and microscopy. C57BL/6 and BALB/c mice were bred at the central animal facility of Hannover Medical School under specific-pathogen-free conditions or purchased from Charles River (Germany). Adult mice were sacrificed by CO₂ inhalation. The small intestine was excised, flushed with phosphate-buffered saline (PBS), and opened along the mesenteric side. For horizontal sections fragments about 20 mm in length were flattened with the mucosal side downward on filter paper, embedded in OCT compound, and frozen on dry ice. For vertical sections gut fragments approximately 5 cm in length were washed in PBS, followed by a 50% mixture of OCT and PBS, and transferred to OCT before Swiss rolls with the luminal side facing outward and the proximal end located at the center of the roll were prepared. Cryosections (8 μ m) were air dried and fixed for 10 min in ice-cold acetone.

Salmonella infections. All *Salmonella* strains used in the present study were derivatives of *S. enterica* serovar Typhimurium strain SL1344 (10). Mutations were introduced by using red recombinase-mediated homologous recombination (5) with the primers described at <http://falkow.stanford.edu/whatwedo/wanner/>. First, we exchanged the *aroA* gene against a kanamycin resistance cassette that was subsequently cured by recombination using plasmid pCP20 as described previously (5). Unless indicated otherwise, all experiments were performed with this strain. For the experiments shown in Fig. 3A the double mutants SL1344 *aroA sipB* and SL1344 *aroA srrB* were also used. The kanamycin resistance cassette in *sipB* was again cured to avoid polar effects on the expression of downstream genes. For detection of live *Salmonella* in tissues (see Fig. 3C), a red fluorescent variant was generated. SL1344 *aroA* was engineered to carry plasmid pDsRed in which a bright DsRed variant (32), which was destabilized by fusing a recognition site for the tail-specific protease to its C terminus (1), was expressed from the *P*_{pagC} promoter. *Salmonella* strains were grown in LB broth containing 90 μ g of streptomycin/ml and either 100 μ g of ampicillin/ml or 30 μ g of kanamycin/ml when appropriate. For oral infection *Salmonella* strains were grown to a density of 10⁸ bacteria/ml. Bacteria were washed twice with LB broth and resuspended at 10⁸ bacteria in 200 μ l of LB broth containing 3% NaHCO₃. Mice had free access to water and food and were inoculated orally with 200 μ l of suspension with a feeding needle. The number of inoculated bacteria and of salmonellae present in tissues was determined by plating. The PP and mesenteric lymph nodes were disrupted as described for flow cytometry. In order to determine the number of salmonellae in non-PP-bearing intestines, intestinal tubes were vigorously washed with PBS containing 50 μ g of gentamicin/ml, followed by PBS alone, and homogenized by using an Ultra Turrax. Triton X-100 was added to a final concentration of 0.1%, and tissue suspensions were vortexed for 30 s before plating serial dilutions.

Antibodies. The following antibodies and conjugates were used in the present study: anti-CD11b-fluorescein isothiocyanate (FITC; Caltag), anti-CD11c-bio, anti-GR1-phycoerythrin, anti-L6G-FITC, anti-Ly6G-bio (BD Biosciences), anti-CD117 (cKit, clone ACK2; Natutec) and anti-B220 (clone TIB146, provided by Elisabeth Kremmer, GSF München). Cy5 conjugate of anti-B220 was prepared as recommended by the manufacturer (Amersham). Biotinylated antibodies were recognized by streptavidin-coupled to Alexa488, Cy3, or Cy5 (Molecular

Probes). Unconjugated anti-cKit was recognized by mouse anti-rat-Cy3 conjugate (Jackson Laboratories). Salmonellae were detected using a polyclonal anti-*Salmonella* serum raised in rabbits (SIFIN, Germany), followed by goat anti-rabbit-FITC conjugate (Jackson Laboratories).

Immunohistochemistry. Sections were rehydrated in TBS (0.1 M Tris [pH 7.5], 0.15 M NaCl) supplemented with 0.1% Tween 20 (TBST) and transferred into a vertical flow staining chamber (Thermo Life Sciences). Sections were preincubated twice with TBST containing 5% rat or mouse serum, depending on the antibodies to be used. Sections were incubated with a mixture of appropriately diluted biotinylated or fluorescent dye-coupled antibodies in 2.5% serum-TBST for 1.5 h and washed three times with TBST. If required sections were subsequently incubated with a streptavidin conjugate in 2.5% serum in TBST for 1 h. Sections were washed three times with TBST and stained twice for 2 min with 1 μ g of DAPI-TBST/ml to visualize nuclei. Sections were washed three times with TBST and mounted with Mowiol. Staining with unconjugated antibodies (anti-*Salmonella* and anti-cKit) was performed for 45 min in TBST containing 2.5% mouse serum, followed by detection with Cy3- or FITC-conjugated secondary reagents (mouse anti-rat-Cy3 or goat anti-rabbit-FITC). For analysis of the distribution and cellular composition of lymphoid aggregations, composite images were automatically assembled by using a motorized Axiovert 200M microscope (Carl Zeiss) with autofocus module Axiovision 4.0 software (Carl Zeiss).

Flow cytometry. To obtain single cell suspensions of mesenteric lymph nodes and PP, organs were minced between two rough glass slides and washed with PBS supplemented with 2% fetal calf serum (FCS). For isolation of cells from the lamina propria, gut content and PP were removed before the intestines were opened longitudinally. Intestines were washed twice in cold PBS and incubated for 10 min in 10 ml of Hanks balanced salt solution supplemented with 10% FCS and 2 mM EDTA at 37°C in a water bath. Subsequently, the tubes were shaken vigorously for 10 s, and the supernatant containing epithelial cells was discarded. This incubation was repeated twice, the remaining tissue washed in PBS and incubated at 37°C for 45 min in RPMI with 20% FCS and 0.5 mg of collagenase A (Roche)/ml. Cells were liberated from the digested tissue by shaking the tubes for 10 s, and the supernatants were filtered through a nylon mesh. After centrifugation the cell pellet was resuspended in isotonic 40% Percoll (Amersham) in RPMI with 5% FCS. This cell suspension was overlaid onto 70% Percoll in RPMI with 5% FCS and centrifuged at 800 \times g for 20 min. Cells were recovered from the interphase, washed twice in PBS with 2% FCS, and stained using the antibodies described above.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 4.0 software and applying an nonparametric two-tailed Mann-Whitney test. Statistical differences are indicated as follows: ns, not significant; ***, $P < 0.001$.

RESULTS

Salmonella infection results in mucosal inflammation in and outside PP. M cells present in the epithelium overlying PP are well known to be targeted by different enteropathogens, thereby enabling their uptake into the intestinal mucosa (7, 14, 26). In addition, alternative routes of entry via M cells outside of PP (12, 16), via lamina propria dendritic cells (21, 27), or by direct invasion of absorptive enterocytes have been proposed. However, the relevance of these different mechanisms for *Salmonella* mucosal pathogenicity has not yet been explored. In order to quantitatively compare PP-dependent and -independent routes of mucosal infection, BALB/c and C57BL/6 mice were infected orally with an attenuated *aroA*-deficient *S. enterica* serotype Typhimurium strain (see Materials and Methods). This strain does not cause fatal disease and thus allows analysis at late stages of infection. Mice were sacrificed 2, 5, 7, and 13 days postinfection, and the bacterial load in mesenteric lymph nodes and individual PP was determined (Fig. 1A and data not shown). *Salmonella* could be detected in all individual PP and in the mesenteric lymph nodes of both mouse strains. In agreement with previous observations, the number of salmonellae present in the PP increased until 7 days postinfection. Subsequently, it decreased until 13 days postinfection to roughly the bacterial load observed at day 2 postinfection,

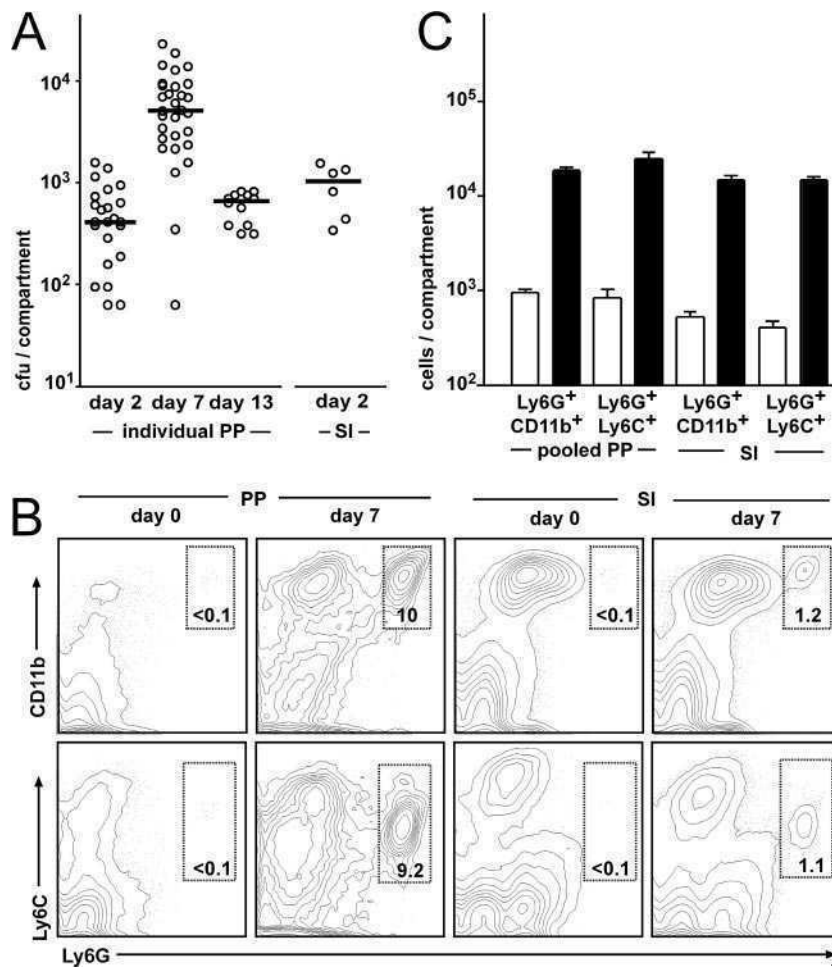


FIG. 1. Oral *Salmonella* infection results in inflammatory responses in PP and in non-PP-bearing intestines. BALB/c mice were inoculated orally with 10^8 live salmonellae. (A) On days 2, 7, and 13 postinfection the bacterial load in individual PP was determined by plating serial dilutions of disintegrated PP cell suspensions. In addition, the bacterial load in non-PP-bearing small intestinal tissue (SI) was determined on day 2 postinfection. The open circles represent the numbers of salmonellae cultivated from individual PP and the small intestine after all PP had been removed. The median is indicated by horizontal bars. (B) On day 7 postinfection the cells were isolated from pooled PP and the entire small intestinal lamina propria and analyzed by flow cytometry. Contour plots display live (DAPI⁻) immune cells (Ly5.2⁺) analyzed for Ly6G, CD11b, and Ly6C expression. The numbers indicate the percentages of cells in the boxed regions that display a Ly6G^{hi} Ly6C^{intermediate} CD11b^{hi} phenotype, which is indicative for activated neutrophils. (C) Absolute cell numbers of inflammatory cells present in pooled PP and entire small intestinal lamina propria of uninfected mice (□) and 7 days postinfection (■). The results for one representative experiment of three experiments performed with four animals per group each is depicted. Bars represent the medians, and error bars indicate the standard deviations.

indicating the efficient clearance of most bacteria from the tissue. Similarly, the number of salmonellae present in the mesenteric lymph nodes increased until 7 days postinfection but, compared to the PP, declined more slowly and at day 13 postinfection the number of salmonellae was still similar to the bacterial load observed at 5 days postinfection (data not shown). Moreover, we determined the number of salmonellae present in the entire small intestine outside the PP at 2 days after infection. We observed that *Salmonella* could be cultivated from small intestinal tissue even after all the PP had been carefully removed (Fig. 1A). The number of bacteria recovered from the small intestines without PP was higher compared to the number of salmonellae cultivated from individual PP but did not reach the number of bacteria cultivated from pooled PP (Fig. 1A and data not shown). However, the recovery efficacy of *Salmonella* might depend on the amount of tissue used.

In particular, plating of tissue homogenates derived from large amounts of tissue, such as the non-PP-bearing intestines, might underestimate the actual number of salmonellae.

In order to determine the degree of inflammation in the intestinal mucosa, we quantified the number of inflammatory cells present in PP and in the PP-free small intestine at the peak of infection, i.e., at 7 days postinfection, by flow cytometry. The markers used included CD45.2, which allows the identification of all immune cells in combination with Ly6C⁺, Ly6G⁺, and CD11b⁺ cells, allowing the detection of neutrophils and macrophages. We observed that the number of inflammatory cells present in both the PP and the intestinal mucosa outside the PP increased dramatically after infection (Fig. 1B), thus indicating the existence of inflammatory infiltrates outside PP. Infiltrating cells were mostly Ly6C⁺ Ly6G⁺ CD11b⁺ and displayed a high side-scatter profile, suggesting

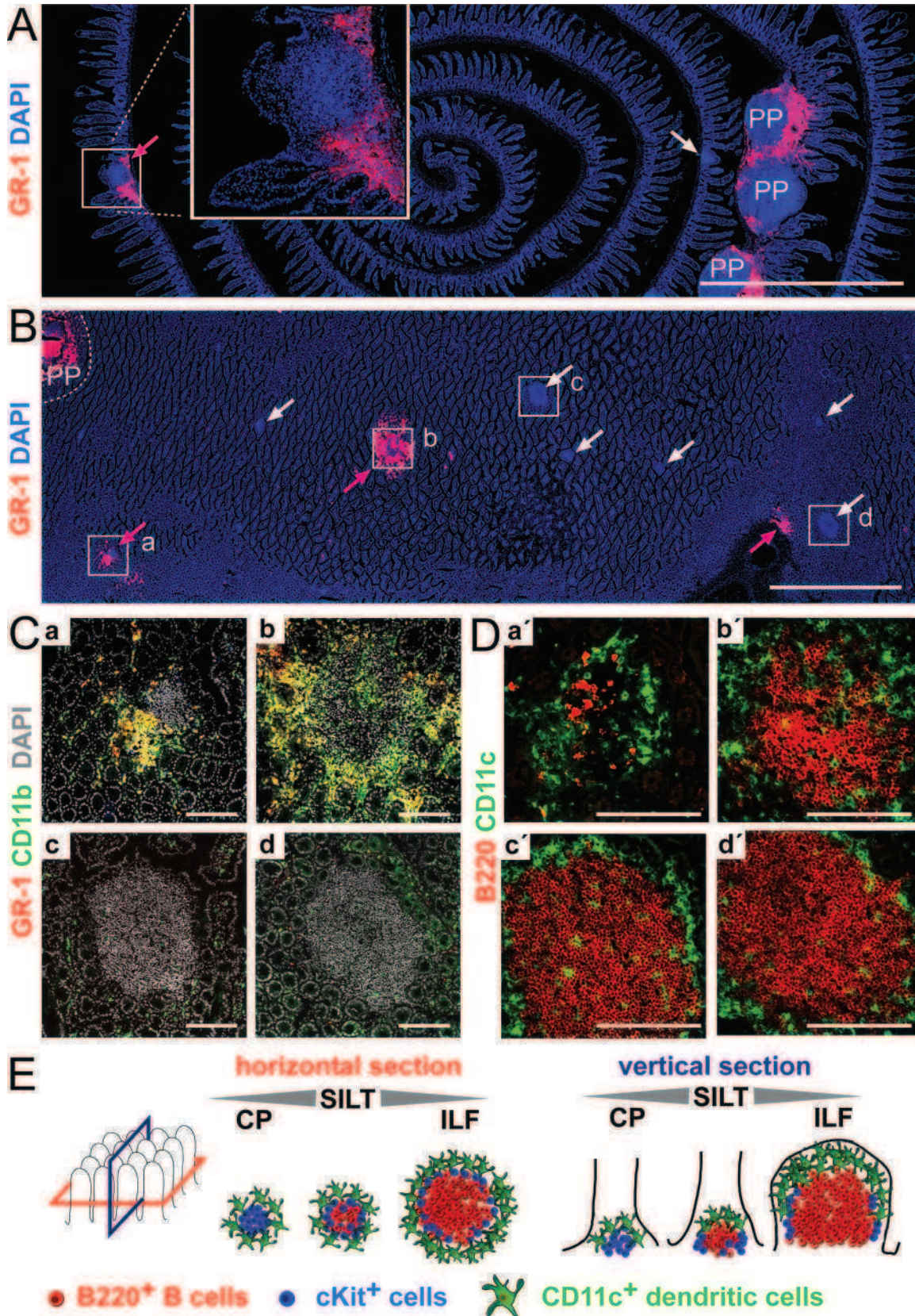


FIG. 2. Inflammatory cell infiltrates localize to PP and SILT in the intestinal mucosa. At 7 days after *Salmonella* infection the localization of inflammatory cells in the intestinal mucosa was analyzed. (A) Vertical sections through small intestinal rolls were stained for nuclei (blue) and with anti-GR-1 antibody (red), which is indicative for inflammatory cells. Overview images that allow the assessment of large coherent areas of the

that the majority of these cells were neutrophils (Fig. 1B). CD11b⁺ cells that are constitutively present in the lamina propria (Fig. 1B) were almost exclusively CD11c⁺, indicating that these cells are lamina propria dendritic cells (data not shown). Quantification of the absolute cell numbers of Ly6G⁺ CD11b⁺ and Ly6G⁺ Ly6C⁺ cells in uninfected BALB/c mice compared to animals at 7 days postinfection revealed that the overall number of inflammatory cells present in the infected, PP-free lamina propria was similar to that identified in all pooled PP (Fig. 1C). No major differences were observed in the frequency of inflammatory cells or the number of cultivatable *Salmonella* organisms between proximal and distal segments of the small intestine (data not shown). In conclusion, these observations indicate that a major part of the overall inflammatory response occurs outside PP.

Mucosal inflammatory foci are invariantly associated with SILT. In order to localize the inflammatory cells outside PP, we analyzed vertical and horizontal sections through the intestine 7 days after *Salmonella* infection by automated multicolor fluorescence microscopy. Vertical sections were cut along the crypt villus axis, whereas horizontal sections were cut through the “crypt zone” (see Fig. 2E for a schematic illustration of cutting planes). Sections were stained for nuclei and with an anti-GR-1 antibody, detecting the epitopes recognized by anti-Ly6C and anti-Ly6G antibodies and thereby highlighting inflammatory infiltrates. As expected, we observed massive infiltration of GR-1⁺ cells within the PP (Fig. 2A and B). Whereas both vertical and horizontal sections (Fig. 2A and B) may be helpful in detecting inflammatory foci outside PP, the use of horizontal sections through the “crypt zone” was especially suited to systematically identify all inflammatory foci present in a given area of the intestine. By this means multiple additional foci of GR1⁺ inflammatory cells were identified outside the PP (Fig. 2A, B, and C). This finding confirms our results obtained by flow cytometry that *Salmonella* infection results in considerable inflammation outside the PP. Such sites were scattered throughout the intestinal wall in both the proximal and the distal small intestine, and their localization was independent of the distance to the nearest-neighbor PP. No additional sites of inflammation could be detected on serial horizontal sections at the level of the villi compared to “crypt zone” sections, indicating that the method of using these horizontal sections was appropriate to record all inflammatory foci. We never observed inflammatory foci in uninfected wild-type mice, confirming that the detected mucosal inflammation is caused by *Salmonella* infection.

Inflammatory cells generally accumulated in close proximity to dense aggregations of lymphoid cells (Fig. 2A, B, and C). In order to characterize such sites in more detail, we stained serial sections with anti-B220, anti-CD11c (Fig. 2D), anti-CD3, and anti-cKit antibodies (data not shown). We observed that these structures are distinguished by a typical spatial arrangement of CD11c⁺ cells fringing a core composed of cKit⁺ and B220⁺ cells and some interspersed CD3⁺ T cells (Fig. 2D and E and data not shown). The spatial distribution, as well as the cellular composition and architecture of the accompanying aggregates, identifies these sites as SILT (see above and Fig. 2E). Notably, inflammatory infiltrates could be observed in SILTs displaying a broad spectrum of phenotypes (see also Fig. 2E). We observed both small SILTs that did not contain a prominent B-cell follicle and large SILTs with a dense B-cell follicle that were associated with inflammatory infiltrates (e.g., compare the SILTs designated “a” and “b” in Fig. 2C and D). Accordingly, the presence of B-cell follicles in SILT did not closely correlate with the presence of infiltrates in these structures (e.g., the SILTs designated “c” and “d” in Fig. 2C and D). Despite this finding, the strict physical association of inflammatory foci with SILT suggests that, similar to PP, SILT supports productive *Salmonella* infection.

***Salmonella* efficiently utilizes large SILTs for mucosal infection.** To show that *Salmonella* efficiently uses large SILTs for mucosal infection, we applied anti-*Salmonella* antibody staining in order to detect *Salmonella* in SILT at different time points after infection. Such analysis revealed that in BALB/c mice *Salmonella* could be detected in roughly 40% of all SILTs at days 2, 5, and 7 postinfection (Fig. 3A and data not shown). At 13 days postinfection, similar to the situation observed in PP, the frequency of *Salmonella*-bearing SILTs dropped, indicating a clearance of bacteria (Fig. 3A). Thus, the percentage of *Salmonella*-bearing SILTs observed 13 days postinfection is not representative for the frequency of SILTs originally infected. Even though the frequency of *Salmonella*-bearing SILTs was generally lower in C57BL/6 mice, salmonellae could be detected in 17% ± 8% of all SILTs at day 7 postinfection ($n = 4$ mice, 138 SILTs were analyzed), demonstrating that in both strains SILT constitutes a site of *Salmonella* infection.

In order to delineate the molecular requirements of *Salmonella* to infect SILT, *Salmonella* strains carrying mutations in either *sipB* or *ssrB*, in addition to *aroA*, were used (see Materials and Methods). Mutation of *sipB* functionally disrupts the type 3 secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), whereas a mutation of *ssrB* inactivates the

section were automatically assembled. PP infiltrated by GR-1⁺ cells are designated PP, lymphoid aggregations devoid of GR-1-expressing infiltrating cells are indicated by white arrows, and lymphoid aggregation infiltrated by GR-1⁺ cells are indicated by red arrows. The boxed area is shown in a magnification in the inset image in panel A. (B) Horizontal sections through the intestinal wall were stained, analyzed, and annotated as described for panel A. Magnifications of the boxed regions illustrating two infiltrated lymphoid aggregations (a and b) and two structures that do not show signs of inflammation (c and d) are shown in panel C. Nuclei are white, GR1⁺ cells are red, and CD11b⁺ cells are green. Double-positive cells expressing GR-1 and CD11b appear yellow. (D) On serial sections the area corresponding to the boxed regions was analyzed for CD11c⁺ dendritic cells (green) and B220⁺ B cells (red). (E) Schematic illustration of SILT as seen in vertical and horizontal sections. B220⁺ B cells, cKit⁺ cells, and CD11c⁺ dendritic cells constitute the major cellular components of such aggregates and localize in typical patterns. Small structures dominated by cKit⁺ cells are also designated CP. CP can develop into ILF in which a distinct B-cell follicle is predominant. However, the majority of all lymphoid structures display intermediate phenotypes that represent transitional phenotypes between CP and ILF. The entire spectrum of small lymphoid aggregation is referred to as SILT encompassing CP, ILF, and structures of intermediate phenotypes. Scale bars: 2 mm in panels A and B and 100 μm in panels C and D.

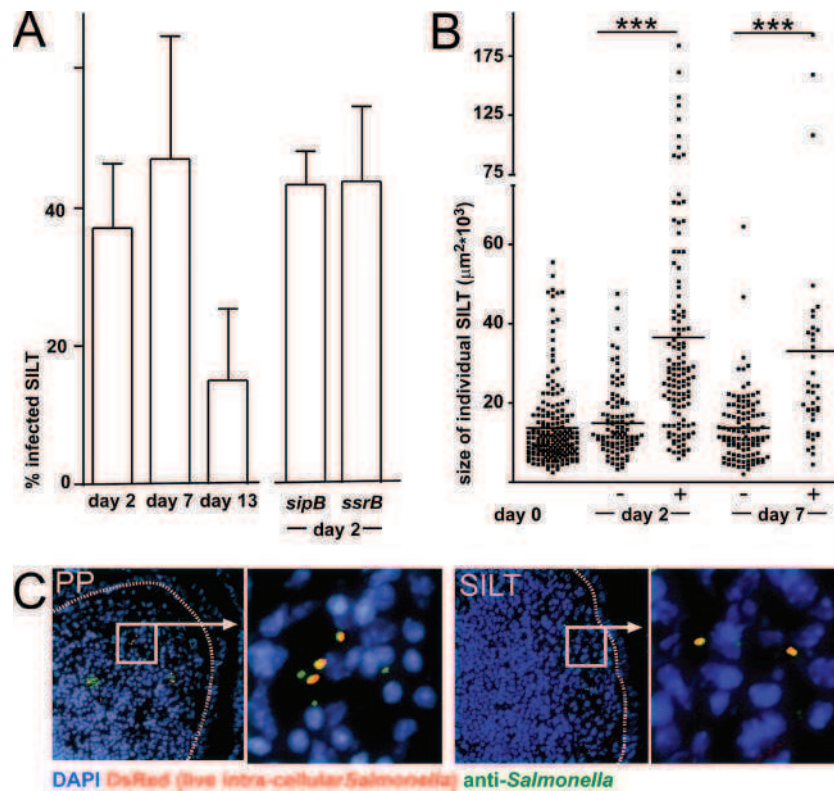


FIG. 3. The presence of *Salmonella* in SILT was analyzed by immunofluorescence microscopy. (A) The percentage of infected SILT was determined by anti-*Salmonella* antibody staining at days 2, 7, and 13 postinfection in BALB/c mice. In addition, the percentage of infected SILTs was determined 2 days after infection by SL1344 *aroA sipB* and SL1344 *aroA ssrB* double-deficient *Salmonella* strains. Columns and error bars depict the means and standard deviations of the fraction of *Salmonella*-positive SILTs observed in individual mice. (B) The sizes of *Salmonella*-positive (+) and negative (-) SILTs before (day 0) and after *Salmonella* infection (day 2 and day 7) are displayed. Dots depict individual SILTs, and horizontal bars depict the mean. *Salmonella*-positive SILTs were significantly larger than *Salmonella*-negative SILTs. ***, $P < 0.001$. (C) Representative fluorescence microscopy images illustrating the presence of *Salmonella* in PP and SILT at 7 days after infection. The nuclei have been stained with DAPI (blue). Anti-*Salmonella* antibody staining is indicated in green, and live intracellular *Salmonella* expressing the red fluorescent protein DsRed are shown in red. Note that all salmonellae expressing the DsRed protein are detected by anti-*Salmonella* antibody staining and thus appear yellow. The dashed line delineates the follicle associated epithelium. Boxed areas are shown at a higher magnification as indicated.

secretion system encoded by SPI-2. We observed, in line with published observations, that 2 days after oral infection both of these *Salmonella* mutant strains were reduced in number in PP compared to the parental strain expressing intact SPI-1 and SPI-2 genes (data not shown). However, the capacity of both mutant strains to infect SILT was comparable to the parental strain. These observations argue that infection of SILT in a high-dose infection model does not essentially depend on these SPI-1- or SPI-2-encoded factors (Fig. 3A).

Subsequently, we compared the sizes of infected and uninfected individual SILTs 2 and 7 days postinfection. SILTs were scored on consecutive vertical sections along the crypt villus axis for the presence of *Salmonella* by antibody staining, and the sizes of all individual SILTs were measured at their maximum dilatation as the SILT area given in square micrometers. At both time points infected SILTs were on average significantly larger than uninfected SILT in BALB/c (Fig. 3B) and C57BL/6 (data not shown) mice. Furthermore, we noted that the size spectrum of infected SILTs encompassed structures occupying more than 60,000 μm^2 in the section area, an order of magnitude which we had never observed in uninfected mice,

suggesting that SILTs increase in size as a result of infection. Despite this observation, salmonellae could also be detected in some small SILTs that did not contain a distinct B-cell follicle (Fig. 2B and 3B). No major difference could be detected between the sizes of infected SILTs at days 2 and 7 postinfection. Thus, the increase in SILT size occurs before there is a significant influx of inflammatory cells into infected structures, indicating that additional factors contribute to the overall phenomenon.

Anti-*Salmonella* antibody staining reliably identified *Salmonella* in virtually all SILTs that showed signs of inflammation as judged by the presence of GR-1⁺ cells in these structures (data not shown). Conversely, very few uninfamed GR-1⁻ SILTs displayed anti-*Salmonella* antibody-positive signals, and such signals were virtually absent in uninfected intestines (data not shown). In order to extend our analysis of salmonellae present in intestinal tissues to the normal mucosa, we used a *Salmonella* mutant expressing the red fluorescent protein DsRed (see Materials and Methods). This method only detects live intracellular bacteria and thus provides a more restrictive tool that avoids even the low level of nonspecific signals obtained by

antibody staining. Importantly, all live *Salmonella* strains identified by their red fluorescence also stained with the anti-*Salmonella* antibody, whereas only a fraction of all *Salmonella* strains identified by the antibody also showed a red fluorescent DsRed signal (Fig. 3C). Corroborating our results obtained by antibody staining (Fig. 3A), red fluorescent *Salmonella* strains were readily detectable in both PP and SILT 2 and 7 days after infection.

In evaluating more than 250 cryosections of intestinal rolls obtained from 10 individual infected mice, we detected a total of 13 single red fluorescent salmonellae inside normal villi (data not shown). In each of these sections roughly 4 cm of intestinal tissue was examined. Based on a section thickness of 8 μm and a circumference of roughly 8 mm for the intestinal tubes, we estimated that the 250 sections examined are equivalent to a complete set of serial sections through a 10-cm-long fragment of the murine intestine. This indicates that in the entire small intestines of *Salmonella*-infected mice fewer than 50 live intracellular salmonellae are present in the non-PP non-SILT mucosa. In contrast, we detected a total of 460 SILTs in this set of sections, which allows estimating that 1,000 to 1,500 SILTs are present in the entire small intestine, which is in good agreement with previous observations (24). This indicates that the number of salmonellae present in SILT is much higher than in normal villi. This demonstrates that, although salmonellae might enter intestinal tissue outside the PP and the SILT, this process is very inefficient compared to salmonellae entering the PP and SILT.

In order to link the presence of *Salmonella* in SILT in the early stages of infection with the appearance of inflammatory sites at late stages of infection, the next step was to determine the frequency of SILTs in the small intestine of infected and uninfected mice. We found, in agreement with our previously reported observations, that in uninfected BALB/c mice SILTs are present at a frequency of 42 ± 6 SILTs/cm² of intestinal wall. This frequency of SILTs remained unchanged in *Salmonella*-infected mice (Fig. 4A), demonstrating that *Salmonella* infection neither induces the de novo formation of SILT nor diminishes its presence significantly. However, we noted a non-significant trend toward less SILT at day 13 postinfection, which might result from severe tissue destruction of infected SILT, thereby complicating proper assessment of these structures. We finally determined the frequency of GR1⁺ inflammatory foci using horizontal sections. Counting the number of inflammatory foci and measuring the total area analyzed, we estimated that at day 13 postinfection such foci occur at a mean frequency of 18 ± 6 foci/cm² of the intestinal wall in BALB/c mice ($n = 8$, 1 to 3 cm² of the intestinal wall was analyzed for each animal). Collectively, a total of several hundred inflammatory foci are present in the entire intestinal mucosa of *Salmonella*-infected mice outside the PP. Notably, the percentage of infected SILTs determined early after infection by anti-*Salmonella* antibody staining (40% of all SILTs bear *Salmonella* by 2 days postinfection, Fig. 3A) and the frequency of SILTs (42 SILTs/cm² of intestinal wall, Fig. 4A) allowed us to estimate that *Salmonella* invasion of SILT occurs at a frequency of 18 foci/cm², thereby strikingly matching the number of inflammatory sites observed during late stages of infection (13 days postinfection, Fig. 4B).

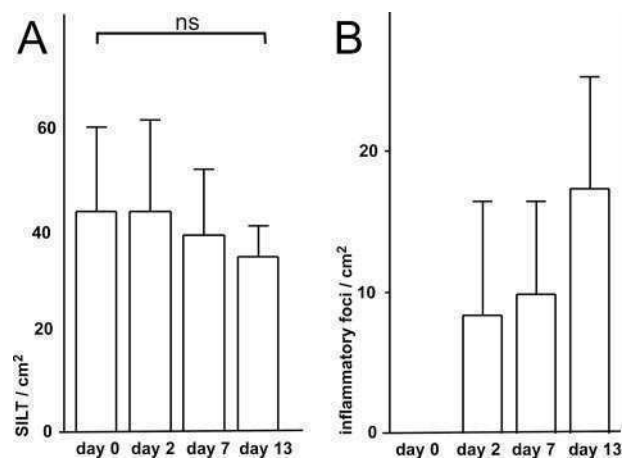


FIG. 4. *Salmonella* infection does not affect the frequency of SILTs but results in the appearance of inflammatory foci in the intestinal mucosa. Before and 2, 7, and 13 days after *Salmonella* infection the frequency of SILTs (A) and the frequency of GR1⁺ inflammatory foci (B) were determined by immunofluorescence microscopy of horizontal sections through the crypt zone. Bars and error bars depict the means and standard deviations of ≥ 4 mice analyzed. ns, not significant.

DISCUSSION

Many enteropathogens are able to actively invade host tissues, where they proliferate locally and/or disseminate to distant body sites (4). It is well known that in susceptible mouse strains *S. enterica* serovar Typhimurium can penetrate the intestinal barrier and colonize the spleen and liver, resulting in a typhoid fever-like lethal disease (30). Important virulence determinants of *Salmonella* are encoded by two major chromosomal regions known as SPI-1 and SPI-2 (6, 22), mediating predominantly the uptake of bacteria and intracellular propagation, respectively. In particular, the type 3 secretion system encoded by SPI-1 genes facilitates the entry of *Salmonella* via M cells and contributes to its invasiveness (13). Invasion of PP by *Salmonella* results in a massive inflammatory response, including the recruitment of neutrophils and macrophages into the infected organ. However, several PP-independent mechanisms of *Salmonella* entry into the host have been suggested, most importantly via M cells in the FAE of isolated lymphoid follicles, by intravillus M cells, by lamina propria dendritic cells, and via uptake by enterocytes (see above). Notably, despite the evidence that these mechanisms are able to support *Salmonella* uptake into mucosal tissue the biological significance of these mechanisms has not yet been evaluated.

In the present study we investigated the concept that productive infection of host tissue would manifest itself by local inflammation at the sites of primary invasion. We observed, in line with this idea, that *Salmonella* is present in all PP at 2 days postinfection and that in all PP an ensuing inflammatory response occurs. Consequently, additional sites of *Salmonella* invasion might also induce a local inflammation. Indeed, we observed numerous inflammatory foci in the intestinal mucosa outside PP in infected mice but not in uninfected mice. Since such foci are found scattered throughout the intestinal wall in a pattern independent of PP localization, this finding clearly indicates that *Salmonella* entry into the tissue does not strictly depend on the PP. A detailed analysis of these inflammatory

sites revealed that such foci are infiltrated SILTs, as judged by morphological criteria and antibody immunostaining of all major cellular constituents of SILT. SILT constitutes a heterogeneous spectrum of lymphoid aggregations that frequently possess M cells that might mediate invasion by *Salmonella*.

Salmonella could be detected 2 days after infection in roughly 40% of all SILTs in BALB/c mice. Strikingly, in BALB/c mice the number of *Salmonella*-positive SILTs observed at day 2 postinfection matches the number of inflammatory foci at 7 and 13 days postinfection, suggesting that all infected SILTs develop immunopathology. Similarly, a lower frequency of *Salmonella*-bearing SILTs in C57BL/6 mice correlates with a lower frequency of inflammatory foci in these mice (data not shown), further emphasizing that local influx of inflammatory cells is a general hallmark of productive *Salmonella* invasion. Importantly, such a view would exclude that the overall number of initial sites of *Salmonella* invasion would considerably exceed the number of inflammatory foci observed later during infection. In line with this, we observed that live DsRed-expressing salmonellae were readily identified in PP and SILT but extremely rare outside organized lymphoid tissues. Thus, the uptake of bacteria via intravillus M cells (12) and lamina propria dendritic cells (21) might represent a rare event. In line with this observation, direct evidence for efficient pathogen uptake by lamina propria dendritic cells has not been provided thus far and might be restricted to the terminal ileum in some mouse strains (17, 33). Interestingly, targeting of SILT by *Salmonella* did not depend on functional SPI-1- or SPI-2-encoded type 3 secretion systems. This supports the idea that infection of SILT by *Salmonella* is an M-cell-mediated event and might not strictly depend on *Salmonella*-expressed virulence factors. M cells are specialized cells that transport particulate antigens including pathogens but also innocuous particles such as latex beads from the gut lumen into the PP and SILT (19, 31). Thus, although SPI-1 facilitates M-cell targeting it is not essential for *Salmonella* targeting PP and SILT.

Although it is evident that systemic dissemination of enteropathogens does not strictly depend on their ability to colonize local lymphoid tissue at their site of entry (2, 3, 9), we demonstrate here that local mucosal inflammation is mostly restricted to M-cell-containing structures, i.e., PP and SILT. Notably, the presence of SILT is a general feature of many species, including mice, rats, and humans (24), and in human typhoid fever inflammation it is observed in PP and solitary lymphoid follicles (15). This suggests that the prominent role of SILT during *Salmonella* infection described here is not restricted to the mouse model.

Uncoupling the processes of *Salmonella*-induced pathogenesis at systemic and mucosal sites allows us to reconcile various studies discussing different mechanisms for the uptake of enteropathogens into mucosal tissues and the apparent lack of protection against fatal systemic bacteremia once such mechanisms are disrupted. This does not rule out after all that local tissue injury caused by mucosal inflammation could propagate subsequent systemic spreading of enteropathogens or more dramatically result in intestinal perforation, one of the most serious complications of severe human typhoid fever (25).

In conclusion, we suggest that in mice SILT and PP support infection by *Salmonella*, resulting in severe immunopathology at both sites. Infection of SILT leads to enlargement of in-

fectured structures and to local tissue destruction but does not trigger neogenesis of intestinal lymphoid tissue.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grants SFB621-A11 and SFB621-A9 to O.P. and D.B.

We thank A. Misslitz and G. Bernhardt for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov, and S. Molin. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2240–2246.
- Barnes, P. D., M. A. Bergman, J. Meccas, and R. R. Isberg. 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *J. Exp. Med.* **203**:1591–1601.
- Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Russmann, and W. D. Hardt. 2003. Pre-treatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* **71**:2839–2858.
- Cossart, P., and P. J. Sansonetti. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**:242–248.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
- Galan, J. E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**:263–271.
- Grutzkau, A., C. Hanski, H. Hahn, and E. O. Riecken. 1990. Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* **31**:1011–1015.
- Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, H. Yamamoto, and H. Ishikawa. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* **168**:57–64.
- Handley, S. A., R. D. Newberry, and V. L. Miller. 2005. *Yersinia enterocolitica* invasin-dependent and invasin-independent mechanisms of systemic dissemination. *Infect. Immun.* **73**:8453–8455.
- Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**:238–239.
- Hooper, L. V., and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**:1115–1118.
- Jang, M. H., M. N. Kweon, K. Iwatani, M. Yamamoto, K. Terahara, C. Sasaki, T. Suzuki, T. Nochi, Y. Yokota, P. D. Rennert, T. Hiroi, H. Tamagawa, H. Iijima, J. Kunisawa, Y. Yuki, and H. Kiyono. 2004. Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:6110–6115.
- Jones, B. D., and S. Falkow. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:533–561.
- Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow. 1994. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J. Exp. Med.* **180**:15–23.
- Kraus, M. D., B. Amatya, and Y. Kimula. 1999. Histopathology of typhoid enteritis: morphologic and immunophenotypic findings. *Mod. Pathol.* **12**:949–955.
- Lorenz, R. G., and R. D. Newberry. 2004. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1029**:44–57.
- Milling, S. W., L. Cousins, and G. G. MacPherson. 2005. How do DCs interact with intestinal antigens? *Trends Immunol.* **26**:349–352.
- Moghaddami, M., A. Cummins, and G. Mayrhofer. 1998. Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology* **115**:1414–1425.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, and J. P. Kraehenbuhl. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **2**:1004–1009.
- Niedergang, F., and M. N. Kweon. 2005. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol.* **13**:485–490.
- Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, D. R. Littman, and H. C. Reinecker. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**:254–258.
- Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon, and E. A. Groisman. 1996. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7800–7804.

23. Pabst, O., H. Herbrand, M. Friedrichsen, S. Velaga, M. Dorsch, G. Berhardt, T. Worbs, A. J. Macpherson, and R. Forster. 2006. Adaptation of solitary intestinal lymphoid tissue in response to microbiota and chemokine receptor CCR7 signaling. *J. Immunol.* **177**:6824–6832.
24. Pabst, O., H. Herbrand, T. Worbs, M. Friedrichsen, S. Yan, M. W. Hoffmann, H. Korner, G. Bernhardt, R. Pabst, and R. Forster. 2005. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **35**:98–107.
25. Parry, C. M., T. T. Hien, G. Dougan, N. J. White, and J. J. Farrar. 2002. Typhoid fever. *N. Engl. J. Med.* **347**:1770–1782.
26. Perdomo, O. J., J. M. Cavaillon, M. Huerre, H. Ohayon, P. Gounon, and P. J. Sansonetti. 1994. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* **180**:1307–1319.
27. Rescigno, M. 2003. Identification of a new mechanism for bacterial uptake at mucosal surfaces, which is mediated by dendritic cells. *Pathol. Biol.* **51**:69–70.
28. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**:361–367.
29. Santos, R. L., and A. J. Baumler. 2004. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**:225–233.
30. Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsois, R. A. Kingsley, L. G. Adams, and A. J. Baumler. 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* **3**:1335–1344.
31. Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall, and M. R. Neutra. 2003. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect. Immun.* **71**:504–509.
32. Sorensen, M., C. Lippuner, T. Kaiser, A. Misslitz, T. Aebischer, and D. Bumann. 2003. Rapidly maturing red fluorescent protein variants with strongly enhanced brightness in bacteria. *FEBS Lett.* **552**:110–114.
33. Vallon-Eberhard, A., L. Landsman, N. Yolgev, B. Verrier, and S. Jung. 2006. Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J. Immunol.* **176**:2465–2469.
34. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang. 1999. Extra-intestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804–808.
35. Yamamoto, M., M. N. Kweon, P. D. Rennert, T. Hiroi, K. Fujihashi, J. R. McGhee, and H. Kiyono. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* **173**:762–769.

Editor: F. C. Fang

III Anhang

Dissertationsanzeige bzgl. Tierschutz und Versuchen mit gentechnisch veränderten Organismen	Seite 35
Lebenslauf	Seite 37
Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 der Promotionsordnung	Seite 38

Obligatorische Dissertationsanzeige bzgl. Tierschutzes, Untersuchungen am Menschen und Versuche mit gentechnisch veränderten Organismen

Name: **Halle**
Vorname: **Stephan Gunter Florian**
Name des Betreuers: **Privatdozent Dr. Oliver Pabst**
Abteilung: **Institut für Immunologie, Leitung: Prof. Reinhold Förster**

angestrebter Grad: Dr. med. Dr. med. dent. Dr. rer. biol. hum.
 MD/PhD / Dr. rer. nat. Dr. PH

a) Tierversuche wurden durchgeführt <input checked="" type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein
Arbeit, die einen oder mehrere Tierversuche gem. § 7 TSchG (z.B. Verhaltensstudien ohne Behandlung und Beeinträchtigung der Tiere; Fütterungsstudien mit physiologischen Futterbestandteilen, Betäubung und Tötung von Tieren) gem. § 4 TSchG beinhaltet. Bei anzeigepflichtigen Versuchen gem. § 8 TSchG (Versuche an Wirbeltieren): Angezeigt bei: Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Tierschutzdienst Aktenzeichen der Behörde: 05/987 Bei genehmigungspflichtigen Versuchen (gem. § 8 TSchG): Genehmigung beantragt Wann: 12.07.2005 Wo: Hannover Genehmigung erteilt (fügen Sie bitte eine Fotokopie der Genehmigung bei – ansonsten geben Sie Datum und Aktenzeichen der Behörde an): Az. 05/987 <input checked="" type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein
Arbeit, in der tote Tiere oder Teile toter Tiere verwendet wurden (z.B. Schlachtkörper oder deren Teile, Sektionsmaterial; Organe oder Teile von im Zusammenhang mit dieser Untersuchung getöteten Tieren) <input type="radio"/> ja <input checked="" type="radio"/> nein
Arbeit, in der lebende Tiere benutzt werden, die aber keinen Tierversuch i.S. des § 7 TSchG beinhaltet (z.B. Verhaltensstudien ohne Behandlung und Beeinträchtigung der Tiere; Fütterungsstudien mit physiologischen Futterbestandteilen, Betäubung und Tötung von Tieren gem. § 4 TSchG) <input type="radio"/> ja <input checked="" type="radio"/> nein

b) Untersuchungen am Menschen

wurden durchgeführt ja **nein**
wenn ja, bitte ausfüllen

Genehmigungsnummer der Ethikkommission der MHH: _____

Name des bei der Ethikkommission gemeldeten Projektleiters: _____

c) Versuche gemäß Gentechnikgesetz

wurden durchgeführt **ja** nein

Name des verantwortlichen und bei der Bezirksregierung
gemeldeten Projektleiters: **Prof. Dirk Bumann**

Sicherheitsstufe S1: Sicherheitsstufe **S2:** Sicherheitsstufe **S3:**

Az 40654/3/115 vom 24.11.2004

Az 40654/3/83/3 vom 24.11.2004

Hannover, den

.....
Unterschrift Doktorand / Doktorandin
(Stephan Halle)

.....
Unterschrift Betreuer / Betreuerin
(PD Dr. Oliver Pabst)

.....
Stempel Klinik / Institut / Abteilung

Erklärung nach § 2 Absatz 2 Nummern 5 und 6 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Solitary Intestinal Lymphoid Tissue provides a productive port of entry for *Salmonella*“ am Institut für Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Reinhold Förster und der Betreuung durch PD Dr. Oliver Pabst und in Zusammenarbeit mit Prof. Dirk Bumann, Dr. Heike Herbrand, Yvonne Willer und Sabrina Dähne ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:
Infection and Immunity, Vol. 75, No. 4, Seite 1577-1585, April 2007.

Hannover, den

.....

Stephan Gunter Florian Halle