



**Interaction of *Salmonella typhimurium* and
Listeria monocytogenes with the Murine
Host**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg**

vorgelegt von

Justin John Douglas Daniels

aus

Pembury, England

Würzburg, 1999

For Lara,
without whom I would never have embarked
on this most interesting of projects.

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

This work was completed independently by myself using the described literature and materials.

Justin JD Daniels

Eingereicht am:

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Herrn Prof. Dr. Werner Goebel
2. Gutachter: Herrn Prof. Dr. Georg Krohne

Doktorurkunde ausgehändigt am:

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Justin John Douglas Daniels
Geburtsdatum: 3. April 1966
Geburtsort: Pembury, England
Familienstand: verheiratet seit 24. Mai 1997 mit Larissa Daniels, geb. Laub
Staatsangehörigkeit: englisch
Eltern: John Victor Daniels
Janice Ella Rollings Daniels, geb. Lee
Geschwister: fünf

Schulbildung

1971-1973 Stanley Park Infants School, Carshalton Beeches, UK.
1973-1977 Stanley Park Junior School, Carshalton Beeches, UK.
1977-1984 Wilson's School, Wallington, UK.

Hochschulbildung

1985-1993 North East Surrey College of Technology
1989 HNC in Science (Medical Laboratory)
1990 Primary Examination of the Institute for Medical Laboratory
Sciences (=Vordiplom)
1993 Fellowship Examination of the Institute for Medical Laboratory
Sciences (=Diplom)

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank.....

Prof. Werner Goebel for the opportunity to study for my PhD, his help, enthusiasm and ideas

Prof. Ingo Autenrieth and Prof. Jürgen Heesemann , and their lab staff, for teaching me many of the methods described herein

my colleagues in lab C206 for a relaxed and fun working environment and their help in teaching me German

all the staff of the Lehrstuhl für Mikrobiologie for their help and a friendly atmosphere

Albrecht Ludwig, Claudia Neumeister and Fredi Engelbrecht for providing some of the bacterial strains

Michael Kuhn and my Father for critical reading of the manuscript, and being kind in their comments!

Albert Haas, Ina Laub, Marcus Rauch and Simone Spreng for help with translating the abstract into understandable German

my parents, and my parents-in-law, for encouragement and financial support

and last, but most of all, Lara for her presence.

CONTENTS

ABSTRACT	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
1. INTRODUCTION	6
1.1. The Intestinal Mucosa and Local Immune System	6
1.2. Lymphoid Follicles and Follicle Associated Epithelium	6
1.3. Interaction of Antigens at the M Cell Surface and Induction of an Immune Response	10
1.4. Bacterial Interaction with M Cells	11
1.5. The Gram Negative Pathogen <i>Salmonella typhimurium</i>	12
1.5.1. Invasion of Cultured Epithelial Cells by <i>S. typhimurium</i>	13
1.5.2. Invasion of Epithelial Cells by <i>S. typhimurium</i> In Vivo	15
1.5.3. Survival of <i>S. typhimurium</i> in Deeper Tissues	16
1.6. The Gram Positive Pathogen <i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.6.1. Survival and Replication of <i>Listeria monocytogenes</i> in Host Cells	20
1.6.2. Adhesins and Invasins of <i>Listeria monocytogenes</i>	21
1.6.2.1. The Internalin Family of Proteins	21
1.6.2.2. The p60 Protein	24
1.6.2.3. ActA	24
1.6.3. Entry of <i>Listeria monocytogenes</i> into Professional Phagocytes	25
1.7. The Aims of this Work	26
2. MATERIALS & METHODS	27
2.1. Bacterial Strains Used and Growth Conditions	27
2.1.1. Gram Negative Bacterial Strains Used	27
2.1.2. Gram Positive Bacterial Strains Used	28

2.2. Protein Studies of <i>Salmonella typhimurium</i>	29
2.2.1. Isolation of Cytoplasmic Proteins	29
2.2.2. Isoelectric Focusing of Proteins (First Dimension)	29
2.2.3. SDS-PAGE Analysis of Proteins (Second Dimension)	30
2.2.4. Coomassie Blue Staining	30
2.2.5. Silver Staining	31
2.2.6. Western Blot Analysis	31
2.3. Animal Experimental Methods	31
2.3.1. Ligated Ileal Loop Test	32
2.3.2. Ileal Loop Invasion Assay	33
2.3.3. Orogastric Inoculation	33
2.3.4. Intravenous Inoculation	33
2.3.5. Intraperitoneal Inoculation	33
2.3.6. Obtaining Blood Via Heart Puncture	33
2.3.7. Removing Organs for Further Analysis	34
2.3.8. Estimating Bacterial Loads in Organs	34
2.4. Tissue Culture	34
2.4.1. Conversion of Human Enterocytes into M Cells by Peyer's Patch Lymphocytes	34
2.4.2. Cell Invasion Assays	36
2.5. Electron Microscopy	36
2.5.1. Transmission Electron Microscopy	36
2.5.2. Scanning Electron Microscopy	37
2.6. Confocal Laser Scanning Microscopy	37
2.6.1. Fluorescent staining techniques	37

2.7. Statistical and Graphical Methods	39
2.8. Chemicals and Media	40
2.8.1. General Chemicals and Solutions	40
Phosphate Buffered Saline (10x stock solution)	40
2.8.2. Electrophoresis Chemicals and Solutions	40
Laemmli Sample Buffer	40
Iso-Urea Solution E	40
Detergent Solution	40
First Dimension IEF Gel	40
SDS-Transfer Solution	41
Second Dimension SDS-PAGE Separating Gel (12 %)	41
2.8.3. Growth Media	41
Mueller Hinton Agar	41
Salmonella-Shigella Agar	41
Listeria Selective Agar	41
MacConkey Agar	42
Luria Bertani (LB) Broth/Agar	42
Brain Heart Infusion (BHI) Broth/Agar	42
3. RESULTS	43
3.1. Microscopical Analysis of Murine Peyer's Patches and M Cells	43
3.2. SlyA of <i>S. typhimurium</i>	45
3.2.1. Production of SlyA by <i>S. typhimurium</i> 14028s and Isogenic Derivatives of this Strain Affected in <i>slyA</i>	45
3.2.2. Kinetic of SlyA Expression Using Western Blot Analysis	46
3.2.3. Two Dimensional Electrophoretic Gel Analysis of Proteins Affected in <i>slyA</i>	46
3.2.4. Colonisation and Invasion of the Small Intestine by the <i>S. typhimurium</i> Strains	47
3.2.5. Invasion and Survival in Peyer's Patch Tissue by the <i>S. typhimurium</i> Strains	49

3.2.6. Electron Microscopy Analysis of the Infected Peyer's Patch Tissue from Intestinal Loops.	50
3.2.7. Electron microscopy analysis of the infected Peyer's patch tissue after orogastric infection.	55
3.3. Interaction of <i>L. monocytogenes</i> with the Murine Host	55
3.3.1. Invasion of the Small Intestine by <i>L. monocytogenes</i> and Subsequent Dissemination to Deeper Organs	56
3.3.2. Translocation of <i>L. monocytogenes</i> from the intestinal lumen to the blood and deeper organs	57
3.3.3. Microscopical Analysis of <i>L. monocytogenes</i> Interaction with Intestinal Tissue	58
3.3.4. Infection of M cells Grown in Culture by <i>L. monocytogenes</i>	61
3.3.5. InlC of <i>L. monocytogenes</i> and its Effect on Virulence	63
3.3.5.1. Infection Kinetics of WT and <i>inlC L. monocytogenes</i>	63
3.3.5.2. Histological Analysis of Livers and Spleens After Infection with WT and <i>inlC L. monocytogenes</i>	64
4. DISCUSSION	66
4.1. The Role of SlyA of <i>Salmonella typhimurium</i> in Virulence	66
4.1.1. Future Research	71
4.2. Interaction of <i>Listeria monocytogenes</i> with the Murine Host	72
4.2.1. The Role of InlC of <i>Listeria monocytogenes</i> in Virulence	77
4.2.2. Future Research	79
4.3. Why Study Bacterial Interaction with the Host?	80
4.3.1. New Treatments	80
4.3.2. Live Antigen Carriers	81
5. REFERENCES	83

ABSTRACT

Food borne pathogens that cause systemic disease must cross the intestinal barrier. Many of these pathogens, eg *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*, use M cells, found only within the follicle associated epithelium (FAE) that overlies Peyer's patches and other lymphoid follicles, to enter the host. This study is primarily an investigation into the interaction of *S. typhimurium* and *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium, representing the early stage of an infection.

The *slyA* gene of *S. typhimurium* has recently been reported to affect virulence of this pathogen in mice and survival in macrophages. Therefore, the effect of four strains of *S. typhimurium* on Peyer's patch FAE was compared: a wild type strain, two *slyA* insertion mutants, and a recombinant *S. typhimurium* derivative over expressing SlyA. Two and seven days post orogastric infection significantly lower numbers of bacteria of the *slyA* mutants and of the SlyA-over producing strain were found in Peyer's patches when compared to the wild type, however, similar numbers of bacteria of all strains were found colonising the lumen of the small intestine. Invasion assays of Peyer's patch tissue after 90 min ileal loop infection yielded comparable numbers of bacteria for all strains in Peyer's patches. Electron microscopy of Peyer's patch tissue after ileal loop infection demonstrated that the two *slyA* mutants and the SlyA-over producing strain were able to attach to, induce membrane ruffling of, and invade M cells in a morphologically and quantitatively similar way to the wild type. In contrast to the wild type both *slyA* mutants and, to a lesser extent, the SlyA-over producing strain were significantly impaired in their ability to destroy M cells and adjacent enterocytes. Taken together, these data suggest that *slyA* is involved in intracellular survival and cytotoxicity for M cells, but not in the invasion process, and that the amount of SlyA needs to be precisely balanced for virulence.

The second part of this work was to determine the route taken by *Listeria monocytogenes* after an oral infection. Whether *L. monocytogenes* uses M cells, of Peyer's patches, to cross the intestine is not yet clear. This has been investigated using an experimental mouse model and an in vitro coculture (epithelial cells

and lymphocytes) system that mimics the FAE. The data demonstrate that *L. monocytogenes* does not require, nor specifically use, M cells of the FAE to cross the intestinal barrier. Furthermore, the FAE and the upper parts of the villi seem better suited for attachment of *L. monocytogenes* than the lower parts of the villi and the crypts. It is also shown that listerial translocation of the intestine is extremely rapid, but the closely related bacteria *Bacillus subtilis* could not translocate, suggesting that the genes required for translocation are present in both *L. monocytogenes* and *L. innocua*, but not in *B. subtilis*. Interestingly, *L. monocytogenes* can attach to exposed basal lamina of the small intestine much more efficiently than to the apical side of enterocytes and M cells, indicating an important role for the extracellular matrix in adherence of *L. monocytogenes*. From the data presented here it seems that the survival chances of *L. monocytogenes* are enhanced in Peyer's patch tissue when compared to non-Peyer's patch intestinal tissue. Both the murine model and the coculture system gave, where applicable, strikingly similar results, indicating the usefulness of this coculture system. The results of this study indicate that M cells are not an important route of entry for *L. monocytogenes*.

Another focus of this study was to analyse the role of Internalin C (InlC) in *Listeria* pathogenicity. InlC is a newly recognised virulence factor of *L. monocytogenes*, which, however, does not seem to have a great impact on intestinal invasion. Therefore, an *inlC* in frame deletion mutant (*inlC*) was analysed in later stages of infection, and revealed significantly reduced numbers of bacteria in livers and spleens when compared to the wild type bacteria. Furthermore, abscess-like lesions in the livers of *inlC* infected mice were in greater number, but smaller in size than in mice infected with wild type bacteria. Also, lymphocyte infiltration in livers was more pronounced in the *inlC* infected mice.

The work as a whole indicates that these pathogens have developed different mechanisms of invasion which has an important impact on the design rationale of live vaccine carrier strains.

ZUSAMMENFASSUNG

Alle in Nahrungsmitteln vorkommenden Pathogene, die eine systemische Infektion auslösen, müssen die Darmwand überwinden. Für die Invasion bevorzugtes Ziel vieler Lebensmittelpathogene, wie z.B. *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri*, sind M-Zellen, die nur innerhalb des Follikel-assoziierten Epithels (FAE) über den Peyer'schen Plaques und anderen Lymphoid-Follikel vorkommen. In dieser Arbeit wurde in erster Linie die Interaktion von *S. typhimurium* und *Listeria monocytogenes* mit dem FAE untersucht, welche die frühe Phase einer Infektion repräsentiert.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß das *slyA*-Gen für die Virulenz von *S. typhimurium* in Mäusen ebenso wie für sein Überleben in Makrophagen von Bedeutung ist. Daher wurde der Einfluß eines wildtypischen Stammes, zweier *slyA* Insertionsmutanten und eines SlyA-überexprimierenden rekombinanten Stammes von *S. typhimurium* auf das Peyer'sche Plaque Gewebe vergleichend untersucht. Zwei und sieben Tage nach oraler Infektion wurden in den Peyer'schen Plaques weniger Bakterien der *slyA*-Mutanten und des SlyA-überexprimierenden Stamms gefunden als vom Wildtyp vorhanden waren. Jedoch waren im Lumen des Dünndarms alle Bakterienstämme in ähnlicher Anzahl vorhanden. Das gleiche gilt für die Zahl der Bakterien in den Peyer'schen Plaques nach 90 Minuten Infektion im "Ileal-Loop"-Modell. Elektronenmikroskopie von Peyer'schen Plaque Gewebe nach einer "Ileal-Loop"-Infektion zeigte, daß die beiden *slyA*-Mutantenstämme und der SlyA-überproduzierende Stamm in ähnlicher Zahl wie wildtypische Bakterien an M-Zellen binden, dort "membrane ruffling" hervorrufen und in diese Zellen eindringen können. Jedoch zerstören die beiden *slyA*-Mutanten und, zu einem geringeren Grad, der SlyA-überexprimierende Stamm M-Zellen und benachbarte Enterozyten weit weniger als der Wildtyp. Zusammengefaßt lassen diese Daten vermuten, daß *slyA* für das intrazelluläre Überleben und die Zerstörung von M-Zellen verantwortlich ist, nicht aber für den Invasionsprozeß. Zudem muß die Menge an SlyA zu Erhaltung der Virulenz genau ausbalanciert sein.

Der zweite Teil dieser Arbeit untersuchte den Weg, den das Pathogen *Listeria*

monocytogenes nach oraler Infektion nimmt. Es war bis jetzt nicht eindeutig geklärt, ob es in die M-Zellen der Peyer'schen Plaques eindringt, um die Darmwand zu passieren. Diese Frage sollte mit Hilfe eines experimentellen Mausmodells und eines *in vitro* Zellkultursystems (Co-kultivierung von Epithelzellen und Lymphozyten), das das FAE rekonstituiert, geklärt werden. Die vorliegenden Daten zeigen, daß M-Zellen im FAE vom *L. monocytogenes* zur Überwindung der Darmwand nicht benötigt werden. Überdies erfolgt die Anheftung von *L. monocytogenes* eher am FAE und am oberen Teil der Villi als am tiefer gelegenen Teil und an den Krypten. Es wird hier zudem auch deutlich, daß die Translokation von Listerien sehr schnell vonstatten geht, während *Bacillus subtilis* überhaupt nicht transloziert, was auf die Beteiligung von Genen hindeutet, die sowohl in *L. monocytogenes* als auch in *L. innocua*, aber nicht in *B. subtilis* vorhanden sein könnten. Interessanterweise konnte *L. monocytogenes* sehr viel effizienter an zugängliche basale Lamina des Dünndarms adhären als an die apikale Seite der Enterozyten und an M-Zellen. Dies läßt auf eine entscheidende Rolle der extrazellulären Matrix bei der Anheftung der Listerien schließen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten geben zu der Vermutung Anlaß, daß die Überlebenschancen von *L. monocytogenes* im Gewebe der Peyer'schen Plaques verglichen mit dem Dünndarmgewebe erhöht sind. Die Daten, die sich aus den Mausexperimenten ergaben, waren denen aus dem Enterozyten-Lymphozyten-Cokultursystem sehr ähnlich, was die Nützlichkeit des Cokultursystems verdeutlicht. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß M-Zellen nicht die wichtigste Eintrittspforte für *L. monocytogenes* darstellen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Internalin C (InlC) in der Pathogenität der Listeria zu untersuchen. InlC ist ein erst kürzlich entdeckter Virulenzfaktor von *L. monocytogenes*, der jedoch bei der intestinalen Invasion keine bedeutende Rolle zu spielen scheint. Aufgrund dieser Tatsache wurde untersucht, wie sich eine *inlC*-Deletionsmutante (*inlC*) in späteren Stadien der Infektion verhält. Eine Infektion mit dieser Mutante führte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zu einer Verminderung der Bakterienzahl in Leber und Milz. Überdies waren abszeßähnliche Läsionen in der Leber von mit *L. monocytogenes inlC* infizierten Mäusen häufiger und zudem kleiner als bei

Mäusen, die mit dem wildtypischen Stamm infiziert wurden. Außerdem konnte eine erhöhte Infiltration der Leber mit Lymphozyten bei den mit *L. monocytogenes inlC* infizierten Mäusen beobachtet werden.

Diese Arbeit verdeutlicht, daß diese pathogene Organismen unterschiedliche Invasionsmechanismen entwickelt haben, deren Kenntnis sehr wichtig ist, um neue Vakzinträgerstämme zu entwickeln.