



Doctoral Thesis

Diet perturbations, a risk factor for *Salmonella Typhimurium* infection?

Author(s):

Wotzka, Sandra Y.

Publication Date:

2017

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000217845> →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 24622

DIET PERTURBATIONS, A RISK FACTOR FOR
SALMONELLA TYPHIMURIUM INFECTION?

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SANDRA YVONNE WOTZKA

M.Sc. Biotechnology, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Born on 28.06.1986

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wolf-Dietrich Hardt

Dr. Emma Marie Caroline Wetter Slack

Prof. Dr. Barbara Stecher

Prof. Dr. Manfred Kopf

2017

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less."

Marie Curie

TABLE OF CONTENTS

THESIS SUMMARY	5
ZUSAMMENFASSUNG.....	7
CHAPTER 1 - GENERAL INTRODUCTION	11
The gut microbiota - a key player shaping multiple aspects of the host's physiology.....	13
The gut microbiota	13
Factors influencing the gut microbiota composition	14
The role of the gut microbiota in host metabolism and immune development	15
The gut microbiota as a protective shield against enteric infections.....	16
<i>Salmonella</i> spp. - a leading cause of gastro-intestinal infections.....	19
The different steps of a <i>S. Typhimurium</i> infection - From gut colonization to mucosal inflammation.....	20
Innate tissue defense and its consequences.....	22
The elimination of <i>S. Typhimurium</i> from the gut lumen.....	25
Factors that favor <i>Salmonella</i> growth.....	26
General risk factors for <i>S. Typhimurium</i> infection.....	26
Dietary compounds can favor infections.....	27
Dietary shifts alter the microbiota composition and can activate the host immune system	29
The effect of food on the host physiology	30
Carbohydrate digestion and absorption	31
Lipid digestion and absorption.....	32
Bile acid production and circulation	33
Regulation of the enterohepatic circulation of bile acids.....	35
<i>S. Typhimurium</i> is equipped to survive in a bile-enriched environment	36
Genetic predisposition and reaction to bile acids in <i>S. Typhimurium</i>	37
Efflux pumps confer resistance to a wide variety of toxic products.....	38
Energy conservation and metabolism in <i>S. Typhimurium</i>	40
Aims of the presented thesis.....	45
References	47
CHAPTER 2 - LACTULOSE AND ARABINOSE TREATMENT BREAK COLONIZATION RESISTANCE AND EXACERBATE <i>S. TYPHIMURIUM</i> RELATED DISEASE	65

Abstract.....	68
Introduction	68
Experimental Procedures	70
Results	76
Discussion	90
Supplementary material	93
References	101
CHAPTER 3 - SYMPTOMS AND MICROBIOTA RESPONSE IN HEALTHY INDIVIDUALS AFTER SINGLE-DOSE LACTULOSE CHALLENGE - A RANDOMIZED CONTROLLED STUDY.....	107
Abstract.....	110
Introduction	111
Experimental Procedures	112
Results	116
Discussion	124
Supplementary material	128
References	130
CHAPTER 4 - DIETARY FAT INCREASES SUSCEPTIBILITY TO <i>S. TYPHIMURIUM</i> GUT COLONIZATION VIA BILE ACID-MEDIATED MICROBIOTA DISRUPTION	135
Abstract.....	138
Introduction	138
Experimental Procedures	140
Results	148
Discussion	160
Supplementary material	164
References	178
CHAPTER 5 - GENERAL DISCUSSION.....	185
New models for non-typhoidal salmonellosis in mice	187
Diet as a key player in intestinal homeostasis	188
Diet-induced shifts in the microbiota open a niche for invading enteropathogens.....	190
Effects of elevated carbohydrate ingestion on the microbiota and host physiology.....	191
The dichotomy of bile acid function: a further link between diet and immune response..	192
A major problem, two inherently different causes.....	194

Malnutrition directly affects the immune system.....	196
References	198
ACKNOWLEDGEMENTS.....	203
APPENDIX	205
Growth phenotype of <i>Escherichia coli</i> isolates from clinical study upon lactulose treatment is dependent on microbiota composition of mice	207
Long-term infection of high-fat diet-fed mice do not promote adaption of <i>S. Typhimurium</i> to increased bile acid concentrations.....	211
The high-fat diet phenotype seems to be partially dependent on the microbiota composition and a high-carbohydrate diet also reduce colonization resistance against <i>S. Typhimurium</i>	214
The testing of <i>S. Typhimurium</i> mutants deficient in different regulators of AcrAB-TolC gene expression does not reveal any phenotype	216
<i>S. Typhimurium</i> utilizes not a single but rather multiple nutrients.....	218
Reference	224

THESIS SUMMARY

One of the most prominent foodborne pathogens causing several million infections each year including some deaths, is the gram-negative bacterium *Salmonella enterica* subspecies I serovar Typhimurium. Non-typhoidal salmonellosis is thereby not only a major public health burden in third world countries, but also in the western world. Certain risk factors associated with non-typhoidal salmonellosis have already been identified. The use or misuse of antibiotics, the consumption of raw meat and egg dishes and travel to foreign countries are the most common ones leading to disease in the western world. An essential mediator of host health is the resident microbiota, a community of microbes living in and on the host. Their beneficial role can be attributed to their capability to shape the host's immune system, to provide essential nutrients, otherwise inaccessible to the host, and to modulate the host health status. Further, a stable and healthy gut microbiota can efficiently protect the host from pathogen colonization, a mechanism termed colonization resistance. Even though the exact mechanisms that convey colonization resistance are not completely unraveled, some mechanisms contributing to this phenomenon have already been identified.

Throughout life, animals and humans are confronted with a very dynamic environment. Therefore, it is not surprising that certain perturbations can disrupt homeostasis and provoke rapid and sometimes severe changes in the microbiota composition. Changes in diet composition can sometimes result in dysbiosis and associated diseases. This explains why diet interventions and their potential effect on the gut microbiota have become a major research topic. The newly available nutrients thereby not only shift the microbiota to a new steady state, but also promote the growth of certain bacterial species capable of metabolizing these new components. We therefore hypothesized that diet shifts induced changes in microbiota composition may increase the susceptibility to colonization by invading pathogens. A first study has already linked *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) infections to alterations in diet habits, but the exact mechanism leading to the increased colonization by *S. Typhimurium*, has not been described in detail.

As the western diet contains high amounts of energy rich carbohydrates, we postulated that specific carbohydrates might have an impact in *S. Typhimurium* colonization. Here, we present a novel method that sheds light on the role of diet perturbations in increasing the susceptibility to enteropathogen infections. Treating mice with lactulose or arabinose favored the intestinal colonization of *S. Typhimurium* and the development of acute intestinal inflammation within 4 days of infection. Interestingly, the treatment with both of these carbohydrates lowered the pH in the intestine. We hypothesized that the resident gut microbiota might be more susceptible to growth retardation under lower pH compared to *S. Typhimurium*, thus allowing the invading pathogen to overcome colonization resistance and establish an infection. Using a mouse model, we can show that a perturbation of the microbiota due to a reduction in pH is plausible

and may increase the risk for *S. Typhimurium* infection. The exact mechanism however, has to be confirmed.

Since lactulose is commonly used as a food ingredient and as a medication for constipation, we were interested if lactulose consumption could potentially decrease host defense mechanisms against invading pathogens in humans. After ingestion, lactulose is fermented by certain gut microbiota members resulting in the production of hydrogen. Previous data suggested that hydrogen is essential during initial colonization of *S. Typhimurium*. Therefore, lactulose could promote the growth of hydrogen-consuming enteropathogens as well as microbiota members, e.g. *Escherichia coli* (*E. coli*), capable of exploiting this metabolite. To investigate the effect of a single-dose lactulose (50 g) ingestion on the microbiota composition and the growth of intrinsic *E. coli*, we conducted a clinical study with 32 healthy volunteers. To control for the symptoms caused by lactulose, we randomly assigned the volunteers either to the control group receiving 50 g sucrose or to the treatment group ingesting 50 g lactulose. Although we determined increased hydrogen levels after consumption of 50 g lactulose, we could not detect an alteration in the microbiota composition one day after the treatment or a bloom of intrinsic *Enterobacteriaceae*. Therefore, 50 g lactulose is unlikely to sufficiently alter growth conditions in the intestine for a significant predisposition to *S. Typhimurium* infection.

Since the western world is prone to ingest not only high amounts of carbohydrates, but also great quantities of dietary fat, we speculated that the shift to a high-fat diet also affect *S. Typhimurium* colonization. Indeed, we demonstrated that the switch to a high-fat diet one day before infection is sufficient to significantly increase gut colonization of *S. Typhimurium* in mice. Strikingly, the shift to a high-fat diet and the treatment with oleic acid, a main component of the high-fat diet, elevate the release of primary bile acids into the small intestine. We provide evidence that high amounts of primary bile acids have a negative effect on the gut microbiota, resulting in the killing of susceptible species and in a disruption of colonization resistance. In contrast, *S. Typhimurium* tolerates high concentrations of bile acids, whereby the multidrug efflux pump plays an essential role in the resistance and in the successful colonization of the fat-exposed gut.

In conclusion, this work reports two novel phenotypes in which changes in diet composition compromise colonization resistance and leave the host vulnerable to enteropathogen infection. Further, we identify the two distinct mechanisms underlying the microbiota perturbations upon diet shift and explain why this favors *S. Typhimurium* growth. Unraveling infection processes of foodborne diseases paves the way for new prevention strategies.

ZUSAMMENFASSUNG

Eines der bedeutendsten Lebensmittel-assoziierten Pathogene ist das gramnegative Bakterium *Salmonella enterica* Subspezies I serovar Typhimurium, welches zu mehreren Millionen Infektionen pro Jahr führt. Nicht-typhoide Salmonellose gelten nicht nur in der dritten Welt als ein Gesundheitsrisiko, sondern sind auch in der westlichen Welt immer noch einer der Hauptgründe für schwere Darmerkrankungen. Einige Risikofaktoren, die mit nicht-typhoiden Salmonellose in Verbindung gebracht werden, sind die Verwendung von Antibiotika, das Konsumieren von rohem Fleisch oder rohen Eierspeisen und das Reisen ins Ausland. Ein wichtiger Vermittler der Gesundheit eines jeden ist die Mikrobiota, die Gesamtheit der Mikroorganismen, die einen Wirt besiedeln. Hier übernehmen sie nützliche Funktionen, wie die Ausbildung des Immunsystems, den Abbau von sonst dem Wirt nicht zugänglichen Nährstoffen, und sie üben einen generellen Einfluss auf die Gesundheit aus. Eine stabile und gesunde Darmmikrobiota kann den Wirt zusätzlich vor Infektionen mit Darmpathogenen schützen, wobei dieser Mechanismus als Kolonisierungsresistenz bezeichnet wird. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Während des Lebens sind nicht nur Menschen, sondern auch Tiere, einer sich stetig verändernden Umwelt ausgesetzt. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass bestimmte Störungen das physiologische Gleichgewicht durcheinanderbringen und zu schnellen und teilweise schwerwiegenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota führen können. Veränderungen in der Ernährung sind ein bekannter Störfaktor, der manchmal zu einer krankhaften Veränderung der Mikrobiota (Dysbiose) und damit assoziierten Krankheiten führen kann. Infolgedessen gewinnen Themen wie Veränderungen in der Ernährung und ihr potentieller Effekt auf die Darmmikrobiota vor allem in der Forschung an Bedeutung. Die durch eine Veränderung in der Ernährung vorkommenden "neuen" Nährstoffe verändern nicht nur die Darmmikrobiotazusammensetzung, sondern fördern das Wachstum von bestimmten Bakterien, die die neu vorhandenen Nahrungskomponenten abbauen können. Dem zugrunde liegend haben wir die Hypothese aufgestellt, dass eine aus dem Gleichgewicht geratene Darmmikrobiota, basierend auf Veränderungen in der Ernährung, den Wirt nicht ausreichend vor invasiven Pathogen schützen kann. Demzufolge wird die Anfälligkeit für eine Besiedlung mit Krankheitserregern begünstigt. Eine erste Studie konnte bereits ein erhöhtes Risiko für eine Infektion mit *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) durch wechselnde Ernährungsgewohnheiten aufzeigen, jedoch wurde der genaue Mechanismus, der einer begünstigten Kolonisierung zu Grunde liegt, nicht weiter erläutert.

Da die westliche Ernährung zu einem grossen Anteil aus energiereichen Zuckern besteht, nahmen wir an, dass bestimmte Zucker höchstwahrscheinlich einen Einfluss auf die *S. Typhimurium* Darmkolonisierung haben. In diesem Teil präsentieren wir eine neue Methode, welche die Rolle der Ernährung in Zusammenhang mit der Anfälligkeit für Darmpathogeninfektionen untersucht. Hierbei hat die Behandlung von Mäusen mit den

Zuckern Laktulose und Arabinose die Darmbesiedlung von *S. Typhimurium* gefördert, welche letztlich in einer schweren Darmentzündung endete. Interessanterweise haben beide Zucker zu einer Senkung des pH-Wertes im Darm geführt. Folglich postulierten wir, dass die Darmmikrobiota sensitiver gegenüber pH-Schwankungen ist als unser Modell-Pathogen *S. Typhimurium*. Dadurch, dass *S. Typhimurium* pH-Schwankungen besser überdauern kann als die Darmmikrobiota der Maus, hat es einen Vorteil bei der Besiedlung. Zusammenfassend können wir in diesem Teil der Arbeit zeigen, dass Schwankungen im pH-Wert, hervorgerufen durch die Aufnahme von bestimmten Zuckern, das Wachstum und die Besiedlung von Darmpathogenen im Maudarm begünstigen können.

Laktulose ist sowohl ein Bestandteil in Lebensmittel als auch ein Medikament, das gegen Verstopfung eingesetzt wird. Aus diesem Grund waren wir daran interessiert zu verstehen, ob der Verzehr von Laktulose das Abwehrsystem des Menschen gegenüber eindringenden Pathogenen stört oder gar ausser Kraft setzt. Laktulose wird nach der Aufnahme von einigen Darmbakterien fermentiert, wodurch unter anderem Wasserstoff entsteht. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass Wasserstoff essentiell für die anfängliche Besiedlung von *S. Typhimurium* ist. Durch die erhöhte Produktion von Wasserstoff, bedingt durch den Verzehr von Laktulose, könnte das Wachstum von Wasserstoff-konsumierenden Darmpathogenen oder Mitgliedern der Darmmikrobiota, so wie *Escherichia coli* (*E. coli*), begünstigt werden. Um zu untersuchen, ob die Aufnahme einer einzelnen Dosis Laktulose (50 g) einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota und das Wachstum von im Darm vorkommenden *E. coli* hat, führten wir eine klinische Studie mit 32 gesunden Teilnehmern durch. Alle Teilnehmer wurden zufällig auf die Kontrollgruppe (50 g Saccharose) und auf die Testgruppe (50 g Laktulose) verteilt. Trotz der Messung von erhöhten Wasserstoffmengen im Atem der Testgruppe, konnten wir weder eine Veränderung in der Darmmikrobiotazusammensetzung feststellen, noch ein Heraufwachsen von Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* detektieren. Demzufolge scheinen 50 g Laktulose nicht auszureichen, um die Wachstumsbedingungen im Darm so zu verändern, dass eine Infektion mit *S. Typhimurium* begünstigt wird.

Da die westliche Welt nicht nur grosse Mengen an Zuckern konsumiert, sondern auch Fett ein essentieller Bestandteil der westlichen Ernährung ist, haben wir spekuliert, dass das Füttern eines fetthaltigen Mausfutters ("high-fat diet") die Kolonisierung von *S. Typhimurium* positiv beeinflusst. In der Tat konnten wir aufzeigen, dass der Wechsel zu einem fetthaltigen Mausfutter einen Tag vor der Infektion das Wachstum von *S. Typhimurium* im Darm von Mäusen begünstigt. Überraschenderweise scheinen das Verabreichen eines fetthaltigen Mausfutters und die Behandlung mit Ölsäure, eine der Hauptbestandteile des fetthaltigen Futters, zu einer erhöhten Ausschüttung von primären Gallensalzen in den Dünndarm zu führen. Wir konnten bestätigen, dass die erhöhte Gallensalzkonzentration im Dünndarm die Darmmikrobiota negativ beeinflusst, indem sensitive Arten eliminiert werden und die aus dem Gleichgewicht geratene Mikrobiota den Wirt nicht mehr ausreichend schützen kann. Im Gegensatz zu der Darmmikrobiota kann das Pathogen *S. Typhimurium* problemlos grosse

Mengen an Gallensalze tolerieren, wobei die Effluxpumpen essentiell für die Resistenz sind und letztendlich eine erfolgreiche Darmbesiedlung im fettexponierten Darm ermöglichen.

In dieser Arbeit beschreiben wir zwei neue Darmbesiedlungsphänotypen von *S. Typhimurium*, die durch eine Perturbation in der Ernährung begünstigt werden. Hinzukommend können wir die Mechanismen, die zu einer vereinfachten Invasion und einer daraus resultierenden erfolgreichen Besiedlung des Darms führen, darlegen. Durch das Verständnis der genauen Infektionsprozesse mit Lebensmittel-assoziierten Pathogenen wird der Weg für neue Präventionsstrategien geebnet.