

2006

Stefanie Maria Bohle

Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung des Virulenzfaktors "Intimin" von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli* beim Rind



Stefanie Maria Bohle

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Untersuchungen zur immunmodulierenden Wirkung des  
Virulenzfaktors "Intimin" von enteropathogenen und  
enterohämorrhagischen *Escherichia coli* beim Rind**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Stefanie Maria Bohle**

Tierärztin aus Bergisch Gladbach

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer  
Prof. Dr. M. Bülte

Tag der Disputation: 24. Mai 2006

Meiner Familie  
und meinen Freunden

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Bohle, Stefanie, Ivonne Stamm, E. Moussay, G. Baljer und Ch. Menge

Untersuchungen zur Wirkung der Intimine von Shigatoxin-bildenden  
*Escherichia coli* auf bovine Lymphozyten

BMTW (2004) **117**(11/12): 452

Bohle, Stefanie, Ivonne Stamm, E. Moussay, G. Baljer and Ch. Menge

Intimins of Shiga toxin-producing *E. coli* fail to exert an immunomodulatory  
activity on bovine lymphocytes

Int. J. Med. Microbiol. (2004) **249S1**:223

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Graduiertenkolleg "Molekulare Veterinärmedizin" an der Justus-Liebig-Universität.

INHALTSVERZEICHNIS	
1.	EINLEITUNG..... 1
2.	LITERATURÜBERSICHT..... 3
2.1	Bakterielle Kolonisation intestinaler Mukosa unter Ausbildung von „Attaching-and-effacing“-Läsionen (A/E)..... 3
2.1.1	Der chromosomale Locus of Enterocyte Effacement ..... 4
2.1.2	Der Typ III Sekretionsapparat ..... 7
2.1.3	Der Translocated Intimin Receptor..... 7
2.1.4	Intimin..... 8
2.1.4.1	Genstruktur und verschiedene Allele des Intimins ..... 9
2.1.4.2	Aufbau und Funktion des Intimins im Zusammenhang mit der Ausbildung von A/E-Läsionen..... 10
2.1.4.3	Intiminrezeptoren der eukaryotischen Wirtszelle ..... 12
2.1.4.4	Intimin-Rezeptor-Wechselwirkungen ..... 14
2.1.4.5	Vergleich mit Invasin..... 15
2.1.5	Zeitlicher Ablauf der Ausbildung von A/E-Läsionen..... 16
2.2	Immunmodulation durch EHEC und EPEC ..... 21
2.2.1	Flagellin..... 21
2.2.2	Hämolysin ..... 21
2.2.3	Lymphostatin..... 22
2.2.4	Shigatoxin ..... 23
2.2.4.1	Bedeutung bei humanen STEC-Infektionen..... 23
2.2.4.2	Bedeutung bei murinen STEC-Infektionen..... 25
2.2.4.3	Bedeutung bei porcinen STEC-Infektionen..... 25
2.2.4.4	Bedeutung bei Infektionen der Wiederkäuer..... 26
2.2.5	LEE-Produkte und ihre Wirkung auf die Chemokinsynthese..... 28
2.2.6	Antiphagozytose..... 28
2.2.7	Intimin..... 28
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN ..... 30
3.1	Material und Methoden ..... 30
3.1.1	Vorgehensweise zur Klonierung des Int280 $\gamma$ ..... 30
3.1.2	Erstellung eines rekombinanten <i>E. coli</i> -Stammes zur Expression eines Fusionsproteins ..... 31
3.1.2.1	Erzeugung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen ..... 31 (CaCl <sub>2</sub> -Methode)..... 31
3.1.2.2	Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen ..... 32
3.1.2.3	XL-PCR zur Klonierung der 3' terminalen 840 Nukleotide des Gens für die C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimin gamma (pHIT-IV-28)..... 32
3.1.2.4	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen..... 34
3.1.2.5	Generierung eines A-Überhangs (A-Tailing)..... 34
3.1.2.6	Ligation von DNS-Fragmenten ..... 34
3.1.2.7	Transformation von Plasmid-DNS in kompetente ..... DH5 $\alpha$ -Zellen ..... 34
3.1.2.8	Selektion rekombinanter Bakterienklone ..... 35
3.1.2.9	Präparation kleiner Plasmidmengen (Minipräparation) ..... 35
3.1.2.10	Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNS..... 36
3.1.2.11	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff- Sequenziergele .. 37
3.1.2.12	Präparation grosser Plasmidmengen (Midipräparation)..... 37
3.1.2.13	Transformation der Ziel-DNS in <i>E. coli</i> K 12 TG1-Zellen ..... 38
3.1.3	Nämlichkeitsüberprüfung der zur Verfügung gestellten Klone..... 39

---

3.1.4	Proteinbiochemische Methoden .....	42
3.1.4.1	Anzucht der rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämme als Vorbereitung zur Proteingewinnung .....	42
3.1.4.2	Präparation von Zellysat .....	42
3.1.4.3	Affinitätschromatographie .....	43
3.1.4.4	Entfernung von Endotoxin und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	45
3.1.4.5	SDS-PAGE .....	45
3.1.4.6	Immunoblot .....	46
3.1.5	Präparation und Kultivierung boviner Lymphozyten .....	47
3.1.5.1	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) .....	47
3.1.5.2	Intraepitheliale Lymphozyten aus dem Ileum (iIEL) .....	48
3.1.6	Nachweis der Intiminbindung an HeLa-Zellen und bovine Leukozyten .....	49
3.1.6.1	Mikroskopie .....	49
3.1.6.2	Zytometrie .....	51
3.1.7	Test zur Quantifizierung der Zellproliferation boviner Lymphozyten .....	52
3.1.8	Quantifizierung der Transformation boviner Lymphozyten zu Blasten .....	55
3.1.9	Quantifizierung der Expression von Zytokingenen in bovinen Lymphozyten .....	56
3.2	Ergebnisse .....	64
3.2.1	Nämlichkeitsprüfung der für MBP-Int <sub>280</sub> $\alpha$ bzw. MBP-Int <sub>280</sub> $\beta$ kodierenden <i>E. coli</i> -Klone .....	64
3.2.1.1	Molekulargenetische Überprüfung der <i>E. coli</i> -Klone .....	64
3.2.1.2	Charakterisierung der exprimierten Proteine .....	66
3.2.2	Erzeugung von MBP bzw. MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$ kodierenden <i>E. coli</i> -Klonen .....	68
3.2.3	Optimierung von Anzucht, Induktion und Aufreinigung .....	70
3.2.4	Funktionelle Charakterisierung der Intimine .....	75
3.2.5	Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit der Intimine an bovine Leukozyten .....	77
3.2.6	Untersuchungen zur Wirkung der Intimine auf bovine Lymphozyten .....	80
3.2.6.1	Blastenquantifizierung mittels Zytometrie .....	81
3.2.6.2	Untersuchungen zum Effekt der Intimine auf die mRNA boviner PBMC .....	86
3.2.6.3	Zytokinexpression nach vierstündiger Inkubation der mRNA boviner IEL .....	89
4.	DISKUSSION .....	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	100
6.	SUMMARY .....	101
7.	LITERATURVERZEICHNIS .....	103
8.	ANHANG .....	111
8.1	Verwendete Reagenzien .....	111
8.2	Benötigte Geräte .....	114
8.3	Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen .....	117
8.4	Verzeichnis der Abbildungen .....	130
8.5	Verzeichnis der Tabellen .....	132

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
°C	Grad Celsius
A/E	Attaching und Effacing
Abb.	Abbildung
Acc. Nr.	« <i>Accession number</i> » (Eintragsnummer einer Datenbank-Sequenz)
AK	Antikörper
al.	alii (lat. Plural andere)
AP-1	Transkriptionsfaktor
APS	Ammoniumpersulfat
Arp (2/3)-Komplex	( <i>Actin-related protein</i> )
BFP	<i>Bundle Forming Pili</i> von EPEC
<i>bfp</i>	Gene der BFP
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Calciumionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation, Differenzierungscluster
CFSE	5-, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4 Dithiotreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>

---

EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
Esc	Für den Typ III-Sekretionsapparat kodierendes Gen
Esp	<i>E. coli secreted protein</i>
esp	Gene der Esp
f.c.	Final concentration (Endkonzentration)
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IBD	Intimin Binding Domain
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgSF	Immunoglobulin Super Families
iIEL	ileale intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inosintriophosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
l	Liter
LA	Localized Adherence
LAP	Lipid A-assoziertes Protein
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine rich repeats
Lsg.	Lösung
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP	Mitochondria Associated Protein
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	Maltose bindendes Fusionsprotein

---

MBP-Int <sub>280</sub>	Maltose bindendes Fusionsprotein mit den 280 C-terminalen Aminosäuren des Intimins
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
Mol	Stoffmenge
mRNS	Messenger-RNS
NF <sub>κ</sub> B	Nuclear Factor <sub>κ</sub> B
nm	Nanometer
nt	Nucleotid
N-WASP	( <u>N</u> eurol <u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich- <u>S</u> yndrome <u>P</u> rotein)
OD	Optische Dichte
OMP	Outer Membrane Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMN	polymorphonuclear leukocyte
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
resp.	Respektive
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTX	Repeats in Toxin
SDS	Natriumdodecylphosphat (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	(Sodium dodecyl sulfate)-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Sep	Für den Typ III-Sekretionsapparat kodierendes Gen
sog.	Sogenannt

STEC	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Boroacetat-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
Tfl-PCR	PCR, bei der eine Polymerase aus <i>Thermus flavus</i> verwendet wird
TIR	translocated intimin receptor
TLR	Toll-like-receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tri-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
XL-PCR	PCR, bei der eine XL-Polymerase verwendet wird
z.T.	zum Teil

## 1. EINLEITUNG

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) können beim Menschen lebensbedrohliche Erkrankungen auslösen, die mit blutigen Durchfällen einhergehen [31] [117]. Häufige Quelle humaner STEC-Infektionen sind persistent infizierte Rinder [1] [121]. Im Gegensatz zu Infektionen des Menschen verlaufen die enteralen STEC-Infektionen erwachsener Rinder jedoch asymptomatisch [6] [21] [120]. Das Vermögen, die bovine Darmschleimhaut zu kolonisieren ohne eine Entzündung auszulösen, könnte eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung der persistenten Infektion darstellen. Mit den Shigatoxinen besitzen die STEC Virulenzfaktoren, mit denen sie aktiv die Immunreaktion unterdrücken und damit der Persistenz Vorschub leisten [91] [87] [88].

STEC induzieren im Darm auch sogenannte „attaching and effacing“-Läsionen, eine Fähigkeit, die sie mit enteropathogenen *E. coli* (EPEC) gemeinsam haben [31]. Bei den diesen Läsionen zugrundeliegenden molekularen Vorgängen sind extrazellulär sezernierte Proteine, die bakteriellen, sogenannten Intimine, von zentraler Bedeutung [32]. Die von diesen Proteinen vermittelte, enge Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen verbessert das Kolonisationsvermögen auf der Darmschleimhaut des Rindes [20] [131]. Intimine sind aber auch in der Lage, an humane und murine T-Lymphozyten zu binden [34] [50]. Diese gebundenen Intimine wirken bei der Aktivierung der T-Zellen als Kostimulus und haben bei experimentellen Infektionen von Mäusen eine massive  $T_H1$ -dominierte Entzündungsreaktion in der Darmschleimhaut zur Folge [50] [51]. Neben der Shigatoxinwirkung könnte deshalb auch der asymptomatische, persistente Charakter der STEC-Infektion von Rindern möglicherweise auf dem Unvermögen der Intimine, bei Lymphozyten dieser Tierart als Kostimulus zu wirken, beruhen. Um diese Frage abzuklären, sollten die für die Rezeptorbindung verantwortlichen, die C-terminalen 280 Aminosäuren umfassenden Fragmente der Intimine  $\beta$  und  $\gamma$  auf ihr Bindungsvermögen an bovine Lymphozyten hin untersucht werden. Darüberhinaus wurde das Proliferationsverhalten der Lymphozyten und die Transkription von Zytokinen während der Inkubation der Zellen in Anwesenheit der Intimin-Fragmente quantifiziert. Um die Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse für

die mukosale Immunantwort beurteilen zu können, wurden die Untersuchungen sowohl mit peripheren als auch mit intraepithelialen Lymphozyten durchgeführt.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Bakterielle Kolonisation intestinaler Mukosa unter Ausbildung von „Attaching-and-effacing“-Läsionen (A/E)

Als *Attaching and Effacing (A/E)-Läsionen* bezeichnet man histopathologische Veränderungen der gastrointestinalen Mukosa, die durch Kolonisation mit A/E-*verursachenden Bakterien auf intestinalen Epithelzellen entstehen und mit Funktionsänderungen der Epithelzellen einhergehen* [35]. A/E-Läsionen verursachen neben einigen Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC), *Hafnia alvei* und mauspathogenen *Citrobacter rodentium* vor allem enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) (vgl. Tab. 1) [23]. EPEC rufen besonders bei Säuglingen in Entwicklungsländern Durchfälle hervor [18] [97] [29] [122] [48] [43] [112]. Sie sind mit den STEC relativ eng verwandt. So geht man davon aus, daß Shigatoxin-bildende EHEC O157 aus einem EPEC O55-Stamm entstanden sind [110]. Die STEC besitzen, zusätzlich zum häufig, aber nicht immer vorhandenen Vermögen, A/E-Läsionen zu induzieren, die Fähigkeit, Shigatoxine (Stx) zu bilden. Da die Zytotoxizität dieser Toxine zunächst an Verozellen gezeigt werden konnte, wurden die STEC auch als VTEC, Verotoxin-bildende *E. coli*, bezeichnet. Sind STEC in der Lage, beim Menschen eine hämorrhagische Kolitis (HC) hervorzurufen, werden sie als EHEC, enterohämorrhagische *E. coli*, bezeichnet [95]. Die hämorrhagische Kolitis geht oftmals dem sogenannten Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS) voraus. HUS ist durch die Triade akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und mikroangiopathische hämolytische Anämie gekennzeichnet [95]. Bei Menschen werden besonders die STEC-Isolate als gefährlich eingestuft, die neben der Stx-Bildung auch in der Lage sind, A/E-Läsionen auszulösen. STEC/EHEC finden sich auch häufig bei Wiederkäuern, bei denen sie meist keine klinischen Symptome hervorrufen [52]. Viele Wiederkäuer sind persistent infiziert und stellen eine Infektionsquelle für den Menschen dar [60].

**Tab. 1: Überblick über pathogene Bakterien, die A/E-Läsionen verursachen**

<b>Erreger</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Erkrankung</b>	<b>Textquelle</b>
<i>Hafnia alvei</i>	Mensch	Diarrhö	[109] [73]
<i>Citrobacter rodentium</i>	Maus	Transmissible murine Kolonhyperplasie, inflammatorische Kolonerkrankung	[127] [127]
Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>	Mensch	Säuglingsdiarrhö in Entwicklungsländern	[122] [73]
Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>	Mensch	HUS, hämorrhagische Kolitis	[83] [133] [59]

### 2.1.1 Der chromosomale Locus of Enterocyte Effacement

Für die Ausbildung der A/E-Läsionen sind neben den sogenannten "frühen Adhäsinen" (s. Kap. 2.1.5) der EPEC die Produkte des Locus of Enterocyte Effacement (LEE) obligatorisch [24]. Der LEE ist eine Pathogenitätsinsel mit einer Größe von 35 kb, die in drei Regionen bekannter Funktion eingeteilt wird [94]. Die mittlere Region enthält das Intimin-kodierende *eae*-Gen und das *tir*-Gen für den *translocated intimin receptor*. Stromabwärts des *eae* liegen die *esp*-Gene, die für die *E. coli* *secreted proteins* kodieren. Diese Proteine vermitteln die Ausbildung der A/E-Läsionen durch Auslösung von Signalkaskaden in der Zielzelle. Stromaufwärts von *eae* und *tir* liegen unter anderem die *esc*- und *sep*-Gene, die für den Typ III-Sekretionsapparat kodieren [61]. Der LEE liegt auf dem Chromosom direkt stromabwärts des *selC*-tRNS-Locus. Der GC-Gehalt des LEE beträgt nur 38,4 % im Gegensatz zu dem GC-Gehalt des *E. coli*-Chromosoms, der bei 50 bis 51 % liegt. Daraus läßt sich schließen, daß der LEE ein erworbenes Pathogenitätsmerkmal darstellt [24]. Es ist nicht bekannt, woher der LEE stammt, aber man nimmt an, daß er durch horizontalen Gentransfer erworben wurde [104]. Die im LEE und an weiteren Genorten kodierten, an der Ausbildung der A/E-Läsion beteiligten bakteriellen Faktoren sind in Tabelle 2 nochmals zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 2: Übersicht über die an der zur Entstehung der A/E-Läsionen beteiligten Faktoren**

<b>Name</b>	<b>Eigenschaften und Funktion</b>	<b>Größe</b>	<b>Kodierung</b>	<b>Textquelle</b>
Esp A*	Integraler Teil eines filamentösen Organells, das den EPEC mit der Wirtszelle vernetzt, um dann die A/E-Läsionen zu bilden. Kanalbildung zur Translokation bakterieller Proteine	22-25 kDa	Gen Bestandteil des <i>lee</i> stromabwärts von <i>espB</i>	[41] [42] [22] [105]
Esp B*	Porenkomplexbildung in der Wirtszellmembran durch EspB und	37kDa (EspB)	kodierende Gene liegen strom-	[41] [42] [54] [22]
Esp D*	EspD? EspD dabei vermutlich auch extrazellulär. Interaktion von EspD mit den EspA-haltigen Filamenten? EspB: Eventuell zusätzliche Rolle als zytosolisches Effektorprotein zur Depolymerisierung des filamentösen Aktins in Wirtszellen zur Steigerung der Anzahl Aktinmonomere zur Podestbildung; Antiphagozytose	38kDa (EspD)	abwärts ("rechts") des EPEC Type III secretion gene cluster	
Esp C	Protein, Funktion nicht genau bekannt	110 kDa	<i>per</i> -Operon	[61]
Esp F	zerstört die intestinale Barrierenfunktion, ruft auf bisher ungeklärtem Wege den Tod der Wirtszelle hervor			[64]
Esp G	Homolog zum VirA-Protein von Shigella, Funktion bislang nicht genau geklärt, Beteiligung an Typ III Sekretionssystem	44kDa	<i>espG</i> -Gen (früher als <i>rorf2</i> bezeichnet)	[26] [138]
Esp H	Modulator der Zytoskelettstruktur der Wirtszelle, unterdrückt die Formation von Filopodien		<i>orf 18</i>	[126]

**Fortsetzung Tab.2**

<b>Name</b>	<b>Eigenschaften und Funktion</b>	<b>Größe</b>	<b>Kodierung</b>	<b>Textquelle</b>
Intimin	äußeres Membranprotein	94kDa	<i>eae</i> -Gen des LEE	s. Kap. 2.1.4
MAP	<i>Mitochondria-associated protein</i> frühes Adhäsion, fördert Filopodien- ausbildung mit sich anschließender Podestbildung; verbindet Pathogen und Wirtszelle, zerstört Mitochondrienmembranpotential		<i>orf19</i> des LEE	[110] [16]
per-Operon	für die optimale Aktivierung und Funktion der LEE-kodierten Gene und BFP-Expression essentiell		auf EAF- Plasmid (von EPEC) kodiert	[37]
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i> mittels Typ III Sekretionssystem in die Wirtszelle injizierter Intiminrezeptor	72kDa	Typ III Sekretions- Genkomplex (cluster)	[17] [54] s. Kap. 2.1.3
Typ IV Pili	Oberflächenorganellen gramnegativer Bakterien zur Anheftung an die Darmschleimhaut des Wirtes, bilden das "bundle forming pilus" (BFP)		<i>bfp</i> Gencluster, <i>dsbA</i> -Gen	[24] [37]

\* bei Fehlen dieser Elemente ist die Ausbildung von A/E nicht möglich [42]

### 2.1.2 Der Typ III Sekretionsapparat

Der vom LEE kodierte Typ III Sekretionsapparat ist ein komplexes Gebilde enteropathogener, gramnegativer Bakterien. Durch den Typ III Sekretionsapparat werden zahlreiche Proteine in die Wirtszelle sezerniert [110] [134]. Er besteht aus ca. 20 Proteinen, die für Sekretion und Translokation essentiell sind [126]. Der Typ III Apparat durchzieht sowohl die innere und äussere Bakterienmembran als auch die eukaryotische Wirtszellmembran. Die "Effektoren", also die sezernierten bakteriellen Proteine, interagieren mit zellulären Zielstrukturen, wodurch die Ausbildung der Veränderungen initiiert wird. EPEC und EHEC adhären transient an Wirtszellen im Dünndarm bzw. Kolon und verbinden sich eng mit der Wirtszellmembran. Man nimmt an, daß der EPEC Typ III-Sekretionsapparat aus einem bakteriellen Membrankomplex aus Esc/Sep-Proteinen besteht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß Esp B und Esp D an der Spitze eines Esp A-Filaments eine Pore in die Wirtszellmembran hinein bilden. Daraus resultierend kommt es zu einem Proteintransfer direkt aus dem bakteriellen Zytoplasma in die Wirtszelle. Zu den translozierten Proteinen bakterieller Herkunft gehören Tir, Esp B, Esp F, Esp G und MAP [138].

### 2.1.3 Der Translocated Intimin Receptor

Als Tir bezeichnet man den *translocated intimin receptor*, ein (im unphosphorylierten Zustand) 72 kDa großes Protein, das durch das Bakterium mittels Typ III Sekretionsapparat in die Wirtszelle injiziert wird und dort als Rezeptor für das bakterielle Intimin dient. Nach der Injektion wird Tir zu einem integralen Membranprotein mit zwei vorhergesagten transmembranösen Domänen. N- und C-Terminus des Tir liegen intrazellulär. Der mittlere Teil des Intimins bildet eine haarnadelförmige Struktur, die durch die Wirtszellmembran hindurch extrazellulär verlagert ist. Das Intimin bindet an die extrazelluläre Domäne des Tir, die auch IBD, Intimin-Bindungs-Domäne, genannt wird [23].

Nach dem Transfer in die Eukaryotenmembran wird der Tir von EPEC und von STEC O26:H<sup>-</sup>, [61], nicht jedoch der von *E. coli* O157:H7, an einem C-terminal lokalisierten Tyrosinrest an Position 474 phosphoryliert [23]. Der EPEC-Tir sowie der Tir von STEC O26:H<sup>-</sup> hat im phosphorylierten Zustand eine Größe von 90 kDa [61]. Wird das Tyrosin mittels Mutagenese gegen ein Phenylalanin ausgetauscht, werden von der Zielzelle keine Podeste (s. Kap. 2.1.5) mehr ausgebildet [23]. Die N-terminale Domäne des EPEC-Tir verankert Bestandteile der Wirtszelle (zum Beispiel Aktinin), die zur Ausbildung der A/E-Läsionen an der Wirtszelloberfläche nach der bakteriellen Adhäsion notwendig sind [78]. Der EHEC-Tir hat an Position 474 keinen Tyrosinrest und wird dementsprechend auch nicht phosphoryliert. Einige Autoren schlußfolgern daraus, daß EHEC sich zu gefährlicheren Erregern entwickelt haben, da sie durch die nicht notwendige Phosphorylierung von den Signalwegen der Wirtszelle unabhängiger sind [23]. Im Gegensatz zu den EPEC kann aber durch den LEE der EHEC allein keine A/E-Läsion induziert werden. Dafür sind anscheinend noch weitere mittels Typ III Sekretionssystem translozierte Virulenzfaktoren der EHEC notwendig [96].

#### **2.1.4 Intimin**

Das äußere Membranprotein Intimin wird durch das *eae*-Gen des LEE kodiert. Intimin ist ein 94 kDa großes, äußeres Membranprotein [24]. Intimin wird von verschiedenen Bakterienspezies exprimiert und existiert in verschiedenen Subtypen. Die Intimine haben eine Gesamtlänge von ca. 948 Aminosäuren. Ausschlaggebend für die Zuordnung zu einem Subtyp sind nur die C-terminalen 280 Aminosäuren (Int<sub>280</sub>) (s. Tab. 3). Diese sind auch für die Bindung des Intimins an die Wirtszelle verantwortlich [23].

**Tab.3: Bezeichnung der Sequenzcharakteristik und der Herkunft einiger bekannter Intiminallele**

Bezeichnung der Allele	ORF-Länge (bp)	G/C-Gehalt (%)	Referenzstamm (Serotyp)	Accession # (Referenz)	Herkunft der Referenzstämmen
$\alpha$ (alpha)	2.820	42.09	E2348/69 (O127:H6)	M58154	Mensch
$\beta$ (beta)	2.820	42.98	RDEC-1 (O15:H <sup>-</sup> )	AF200363	Kaninchen
$\gamma$ 1 (gamma1)	2.805	42.67	EDL933 (O157:H7)	Z11541.1	Mensch
$\gamma$ 2 (gamma 2)	2.805	42.95	95NR1 (O111: H <sup>-</sup> )	AF025311	Mensch
$\varepsilon$ (epsilon)	2.847	42.78	PMK5 (O103:H2)	AF116899	Mensch
$\zeta$ (zeta)	2.808	42.60	537/89 (O84:NM) 4795/95 (O84:H4)	AJ298279 AJ271407	Rind
$\eta$ (eta)	2.847	42.50	CF11201 (O125: H <sup>-</sup> )	AJ308550	Mensch
$\theta$ (theta)	2.808	43.07	CL37 (O111:H8)	AF449418	Mensch
$\iota$ (iota)	2.814	41.70	7476/96 (O145:H4)	AJ308551	Mensch
$\kappa$ (kappa)	2.820	42.06	6044/95 (O118:H5)	AJ308552	Mensch

#### 2.1.4.1 Genstruktur und verschiedene Allele des Intimins

Die Sequenz der N-terminalen 700 Aminosäuren bei den Intiminen von EPEC, EHEC und *C. freundii* [resp. *C. rodentium*] ist sehr ähnlich [33]. Auch Ghaem-Maghani *et al.* bestätigen, dass die N-terminalen Aminosäuren 388-667 hoch konserviert sind [35]. Die C-Termini hingegen sind starken Variationen unterworfen und ermöglichen die Unterscheidung von inzwischen nunmehr neun Subtypen, die als Intimin  $\alpha$  (alpha) bis  $\xi$  (zeta) bezeichnet werden [96]. Zhang *et al.* sprechen sogar von zehn Intiminallelen (s. Tab. 3) [140]. Man nimmt an, dass die Variationen begrenzter Teile des Intimins, z.B. der extrazellulären Domäne (s.u.), durch Rekombination und unterschiedliche, die Mannigfaltigkeit fördernde Selektion erreicht wurde. Diese Veränderungen könnten für den Erreger von Vorteil sein, da Intimine als äußere

Membranproteine dem starken selektiven Druck des Wirtsimmunsystems unterliegen. Insgesamt scheint die Rekombination zwischen Intiminallylen ähnlich häufig stattzufinden wie die in den Haushaltsgenen von *E. coli*. Deshalb schlagen einige Autoren [104] [140] eine universale Nomenklatur vor, um die steigende Anzahl neuer *eae*-Varianten zu organisieren. Nach den Maßstäben von Ramachandran *et al.* existieren inzwischen 14 verschiedene Intiminsubtypen. Die Subtypen wurden nach dem von Zhang *et al.* [140] vorgeschlagenen Gehalt von weniger als 95 % Nukleotidsequenzidentität neu benannt (Int  $\mu$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ). Im Gegensatz zu den in Tab. 3 aufgeführten Subtypen gibt es nach Ramachandran *et al.* noch einen Subtyp Intimin  $\alpha 2$  sowie Intimin  $\lambda$ , aber nur einen Subtyp  $\gamma$  [104].

EPEC können fast alle Regionen des Dünndarms kolonisieren, während die Bindung von EHEC auf das Follikel-assoziierte Epithel der Peyerschen Plaques beschränkt ist [140]. So wurden EPEC 0127:H6 (Stamm E2348/69) mit dem Intiminsubtyp  $\alpha$  aus dem Dünndarm isoliert, während EHEC O157:H7 (EDL 933) mit Intiminsubtyp  $\gamma$  auf dem follikelassoziierten Epithel im distalen Kolon des Menschen gefunden wurden. Auch der Stamm 95NR1 (O111: H) mit dem Subtyp  $\gamma 2$  wurde von den Epithelzellen des menschlichen Kolons isoliert. Zhang *et al.* weisen darauf hin, daß verschiedene STEC-Serotypen bevorzugt gesunde Rinder, Schafe und Schweine besiedeln. Von diesen STEC-Serotypen besitzen nur ca. 10 % das Intimin. Sie bezweifeln deshalb, daß Intimin überhaupt eine Rolle bei der Fähigkeit bestimmter Serovaren, Wiederkäuer zu besiedeln, spielt. Bakterienisolate mit den Intiminsubtypen  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\theta$  wurden bei vielen HUS- bzw. HC-Fällen des Menschen isoliert. Viele Autoren vermuten aufgrund dieser Ergebnisse, daß der Intiminsubtyp ein guter diagnostischer Indikator für das Potential von STEC-Isolaten aus Wiederkäuern ist, beim Menschen schwere Erkrankungen hervorzurufen [140] [104].

#### **2.1.4.2      *Aufbau und Funktion des Intimins im Zusammenhang mit der Ausbildung von A/E-Läsionen***

Die Intimine von EPEC und EHEC sind funktionell austauschbar [23]. Die Sequenzanalyse der konservierten N-terminalen Intimindomänen [von EPEC und EHEC] deutet darauf hin, daß sie in einer antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstruktur

vorhanden sind, um eine porinartige Struktur zu bilden. Dadurch wird die Oberflächenentfaltung der an die äußere Membran translozierten C-terminalen Domäne ermöglicht [96].

Luo *et al.* untersuchten die Struktur der C-terminalen 282 Aminosäuren des Intimins [78]. Sie fanden heraus, daß der C-terminale Teil des EPEC-Intimins sehr asymmetrisch ist [81]. Er besitzt eine Länge von 14 nm [96] und besteht aus drei funktionellen Domänen. Dies sind die Domänen D1 (AS 658-751), D2 (AS 752-841) und D3 (AS 842-939). Desweiteren liegen noch die Domäne D0 (AS 559-657) sowie ein N-terminaler Anker vor, der eine periplasmatische und eine transmembranöse Domäne besitzt. Die Domänen D0 (AS 559-657), D1 (AS 658-751) und D2 (AS 752-841) sind immunglobulinähnlich, die am äußersten C-Terminus gelegene Domäne D3 (AS 842-939) ist eher lektinartig [78]. Die Domänen D1 und D2 repräsentieren die klassische IgSF, *Immunoglobulin Superfamily*, da sie die typische  $\beta$ -Faltblattstruktur enthalten [81]. Die Domänen D2 und D3 bilden eine Superdomäne. Die Spitze des Intimins, die eine positive Nettoladung trägt, hat ihre Gestalt durch eine kurze Alpha-Helix (Reste 904-909) [78]. Die Intimindomäne D1 läßt sich gut mit den -ebenfalls immunglobulinartigen- überwiegend in " $\beta$ "-Faltblatt angeordneten Domänen D1 bis D3 von Invasin vergleichen, was eine ähnliche Struktur mit vielen immunglobulinähnlichen Wiederholungen vermuten läßt (vgl. Abb. 1) [78]. Hintereinanderliegende Wiederholungen von IgSF-Domänen kommen bei Zelloberflächenadhäsionsmolekülen ubiquitär vor und sind für eine Reihe von molekularen Erkennungsprozessen verantwortlich. Die IgSF-Domänen des Intimins bilden ein ausgedehntes, deutlich gegliedertes Verbindungsstück, das von der Bakterienoberfläche hinwegzeigt und eine sehr gut zugängliche Typ C-Lektin-artige Domäne (D3) exponiert. In allen C-Typ-Lektinen (und Invasin) ist das Cys937 hoch konserviert. Bei seinem Austausch ist eine Bindung an den eukaryotischen Rezeptor nicht möglich, da es zusammen mit dem Cys860 eine 76 Aminosäuren lange Schleife bildet, die für die Bindung an die Wirtszelle essentiell ist [32]. Die Disulfidbrücke zwischen Cys860 und Cys937 wird nur ausgebildet, wenn das Intimin mit der IBD (s. Kap. 2.1.6) als Komplex, nicht jedoch, wenn das Intimin frei vorliegt. Dieses Phänomen ist auf den jeweiligen rotamerischen Zustand des Cysteins zurückzuführen. Bei einem Austausch des Cys937 gegen ein Serin

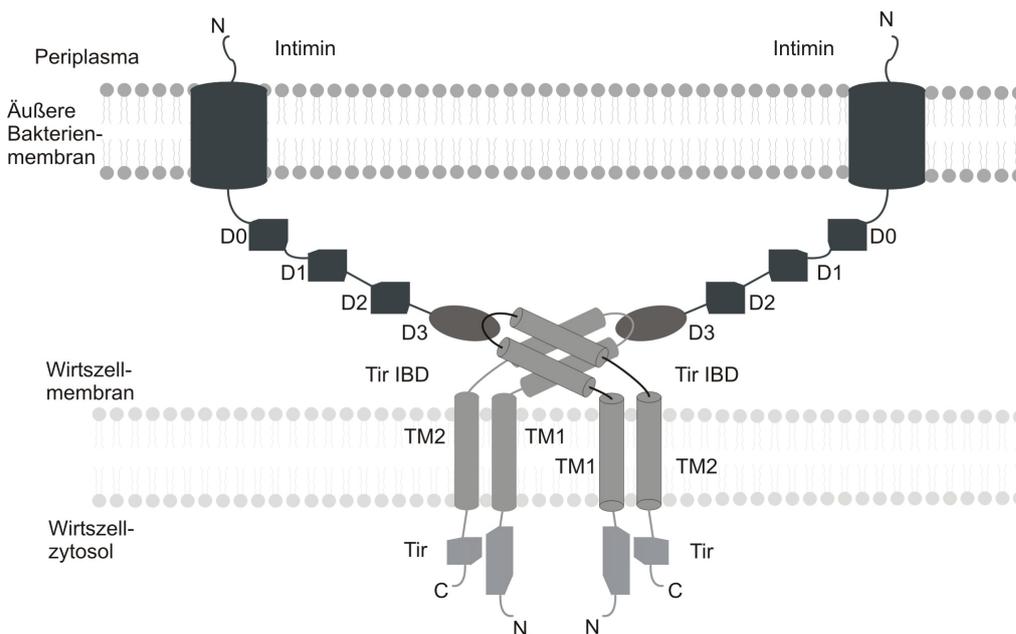
kommt es zur Destabilisierung der Proteinfaltung, die die gesamte Stabilität der Interaktion *in vivo* beeinflusst [78]. Die Präsenz der Disulfidbrücke im C-Typ-Lektinteil der C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimins ( $\text{Int}_{280\alpha}$ ) ist für die korrekte Faltung dieser Domäne und die Kohlenhydratbindung durch andere C-Typ-Lektine essentiell [45]. Frankel *et al.* zeigten, dass bei einem Austausch von Cystein gegen Serin keine Bindung an  $\beta 1$ -Integrine möglich ist [30]. Higgins *et al.* stellten bei einem Austausch des Cysteins gegen Alanin an der gleichen Position eine herabgesetzte Bindungsfähigkeit des Intimins an  $\beta 1$ -Integrine fest [50]. Neben den Cysteinen, die die Disulfidbrücke bilden, sind vier Tryptophanreste in der rezeptorbindenden Superdomäne des Intimins konserviert und erscheinen bei allen Intiminsubtypen. Diese sind W177/776, W136/795, W222/881 und W240/899, wobei sich die erste Zahl auf die Länge von  $\text{Int}_{280}$  [dem C-Terminus] und die zweite auf die Gesamtlänge des Intimins bezieht. Das Tryptophan 240/899, das sich in einer konservierten Schleife der D3-Domäne befindet, ist für die Intimin-Tir-Interaktionen und die A/E-Ausbildung essentiell. Bei einer Substitution von Alanin anstelle des Tryptophan W136/795 ist zwar noch eine Intimin-Tir-Interaktion detektierbar, aber es werden keine A/E-Läsionen mehr ausgebildet. Der Aminosäure an dieser Stelle wird außerdem eine zentrale Rolle in der Erhaltung der Integrität der D2- und D3-Superdomäne zugeschrieben. Die anderen beiden Tryptophanreste sollen Funktionen bei der Tir-unabhängigen Wirtsrezeptor-Interaktion haben [104].

#### **2.1.4.3 Intiminrezeptoren der eukaryotischen Wirtszelle**

Als rekombinante Fusionsproteine binden Intimine an nicht infizierte Zielzellen, obwohl kein Tir vorhanden ist [33] und induzieren eine Neugestaltung der Zelloberfläche [100]. Dies und die Tatsache, dass der Intiminsubtyp für den Gewebetropismus entscheidend ist [99], spricht dafür, dass es neben dem Tir auch eukaryotische Intiminrezeptoren gibt, die als Hir (*host cell intimin receptor*), bezeichnet werden [107]. Bislang wurden Nucleolin und  $\beta 1$ -Integrine als Hir identifiziert. Auch der Tir wurde ursprünglich als Hir bezeichnet, bis Kenny *et al.* ihn als 90 kDa großes Protein identifizierten, das durch den Typ III-Sekretionsapparat erst in die Wirtszelle injiziert wird und sich dort als Intiminrezeptor in der Wirtszellmembran verankert [32] [65].

Nucleolin ist ein Protein, das im Nucleolus von Hefe- über Pflanzen- bis hin zu Säugetierzellen vorhanden ist. Es besitzt eine speziesabhängige Größe, die zum Beispiel beim Menschen 77 kDa beträgt. Nucleolin hat viele strukturelle Domänen, wodurch es mit verschiedenen Proteinen und RNS-Sequenzen interagieren kann. So wird es mit der Chromatinstruktur, rDNS-Transkription, rRNS-Prozessierung, der Ribosomenzusammensetzung und dem zytoplasmatischen Transport in Verbindung gebracht [36]. Nucleolin kann aber auch an die Zelloberfläche gelangen und dient dort als Rezeptor für verschiedene Viren. Nucleolin wird in sich aktiv teilenden Zellen vermehrt exprimiert (es macht bis zu 5 % der nukleären Proteine aus), seine Expression ist bei ruhenden Zellen jedoch stark herunterreguliert. Sinclair *et al.* stellten dies fest, weil die Bindung von Intimin des Subtyps  $\gamma$  an subkonfluenten, sich also noch teilenden Hep2-Zellen, sehr viel besser war als an konfluenten Hep-2-Zellen. Sinclair und O'Brien identifizierten somit Nucleolin als möglichen Rezeptor für Intimin  $\gamma$  auf Hep2-Zellen. Auch die stark negative Nettoladung des Nucleolins spricht dafür, daß es ein Rezeptor für das stark positiv geladene Intimin sein kann [115]. Außerdem ist inzwischen bekannt, daß die Intiminsubtypen  $\alpha$  und  $\beta$  mit ähnlicher Affinität an das Nucleolin binden wie der Subtyp  $\gamma$ . Die Avidität ist bei dieser Art der Bindung an das Nucleolin jedoch geringer als die bei Bindung an den Tir. Offensichtlich ist also die Intimin-Nucleolin-Interaktion nicht nur auf den Subtyp  $\gamma$  beschränkt, sondern bei allen Intiminsubtypen vorhanden. Außerdem scheinen Tir und Nucleolin während der Adhärenz um das Intimin zu konkurrieren [116].

Integrine sind heterodimere, integrale Membranproteine. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Zytoskelett. Dies geschieht entweder durch die Bindung an Bestandteile des Zytoskeletts und an extrazelluläre Matrixproteine oder Zelloberflächenproteine [44]. Frankel *et al.* konnten zeigen, daß Intimine bzw. Fusionsproteine bestehend aus dem Maltose-bindenden Protein und den C-terminalen 280 Aminosäuren verschiedener Intiminsubtypen in der Lage sind, an  $\alpha 4\beta 1$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine zu binden. Die Bindung war in der Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  im Vergleich zu  $Ca^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  stärker. Die Bindung von Intiminen an die Integrine ist empfindlich gegenüber EDTA und kann durch ein RGD (Arg-Gly-Asp)-haltiges Peptid (RGD= in vielen Integrinen vorhandene Sequenz) verhindert werden [30].



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Intimin-Dimers, das an ein in die Eukaryotenzelle injiziertes Tir-Dimer bindet. Modifiziert nach Luo *et al.* [78]**

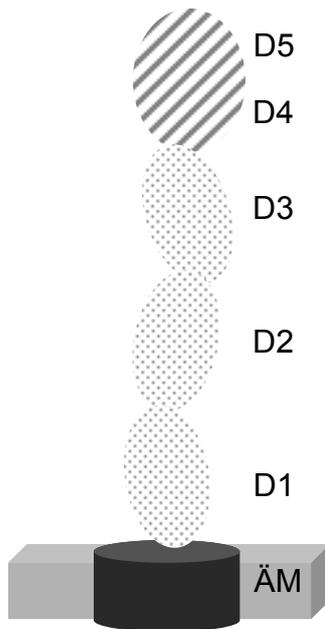
#### 2.1.4.4 *Intimin-Rezeptor-Wechselwirkungen*

Die Intimin bindende, extrazelluläre Domäne des Tir befindet sich im Bereich zwischen zwei membrandurchziehenden Regionen und besteht aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices, die durch eine Schleife verbunden sind. Zusammen mit einem weiteren Tir-Molekül als Dimer entsteht ein Verbund aus vier Helices. Zwei Intiminmoleküle binden an jeweils eine der Schleifen [96]. Intimin liegt stets als Dimer vor [2]. Die lektinartige Domäne (D3) am äußersten Ende des C-Terminus von Intimin (und Invasin) suggeriert eine Bindung an einen Kohlenhydratrezeptor [71]. Aufgrund der Ähnlichkeit der Intimindomäne D3 mit Lektinen postuliert Matthews, daß die Kohlenhydraterkennung eine Funktion des Intimins darstellen könnte und entwirft drei mögliche Modelle der Intimin-initiierten Zelladhäsion [81]. Ein Modell wäre, daß Intimin an einen Kohlenhydratrest bindet, der zum Tir gehört. Allerdings macht die Seltenheit bakterieller Glykolisierung diese Variante wenig wahrscheinlich. Das zweite Modell postuliert eine zweigeteilte Interaktion, bei der Intimin mit dem Tir und zusätzlich, in einer Lektin-ähnlichen Weise, mit einem Hir (z.B. dem Nucleolin [115]) interagiert [45]. Studien zeigen nämlich, daß  $\text{Int}_{280}$  und seine Fragmente auch in Abwesenheit von Tir an kultivierte Epithelzellen binden können. Schließlich wäre denkbar, daß die Ähnlichkeit mit dem C-Typ-Lektin

zufällig ist und Intimin mit dem Tir direkt interagiert. Dafür spricht, dass Intimin auch an den Tir binden kann, wenn die C-Typ-Lektindomäne zerstört ist [81].

#### **2.1.4.5 Vergleich mit Invasin**

Invasin ist ein äußeres Membranprotein von *Yersinia* spp., das zur effizienten Aufnahme von Yersinien in die M-Zellen benötigt wird [44]. Man nimmt an, daß die Bindung von Invasinen an  $\beta$ 1-Integrine die Reorganisation des Wirtszytoskeletts mit der Ausbildung von Pseudopodien, die das Bakterium einhüllen, bewirkt. Das Yersinien-Invasin ist mit dem Intimin der A/E auslösenden Erreger verwandt. Das Invasin von *Yersinia pseudotuberculosis* besitzt eine Länge von 986 Aminosäuren. Die circa 500 N-terminalen Aminosäuren, von denen postuliert wird, daß sie in der äußeren Membran (von *Yersinia*) liegen, zeigen 36 % Identität zu den analogen Regionen der Intimine. Die C-terminalen 497 Aminosäuren des Invasins, die den extrazellulären Bereich ausmachen, können als lösliches Protein, das an Integrine bindet, rekombinant exprimiert werden (Inv497). Die ersten vier Domänen D1-D4 des Inv497 bestehen aus einer  $\beta$ -Struktur, die fünfte Domäne (D5) beinhaltet  $\alpha$ -Helices und eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (s. Abb. 23). Durch die Wechselwirkungen zwischen den Domänen D4 und D5 des Invasins wird eine Superdomäne gebildet, die aus den C-terminalen 192 Aminosäuren besteht, die für die Integrinbindung notwendig sind. Trotz nur 20% Übereinstimmung in der Sequenz sind die Region D3 bis D5 strukturell ähnlich zu den C-terminalen (extrazellulären) 280 Aminosäuren des Intimins von enteropathogenen *E. coli* [44]. Die hohe Divergenz der C-Termini von Intimin- und Invasinmolekülen spricht aber für die Bindung an verschiedene Rezeptoren [82]. Die N-terminalen 539 Aminosäuren von Intimin und die entsprechenden 489 Aminosäuren von Invasin (mit nur 33% Identität) sind funktionell austauschbar.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des *Yersinia*-Invasins** mit einer porinartigen Struktur (grauer Zylinder) in der äußeren Yersinienmembran (ÄM) und den fünf Domänen (D1-D5).

(D1 bis D3 (gepunktet) bestehen aus  $\beta$ -Faltblattstrukturen und D4 und D5 (schraffiert) aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Faltblattstrukturen.)

### 2.1.5. Zeitlicher Ablauf der Ausbildung von A/E-Läsionen

Die Entstehung der A/E-Läsionen vollzieht sich in drei Schritten [24]. In der ersten Stufe bilden die EPEC dichte Mikrokolonien auf der Oberfläche von Zellkulturen in Form eines Musters, das als lokale Adhäsion (LA) bezeichnet wird. Die dazu benötigte Information liegt auf einem großen Plasmid, das mit der Produktion von Typ IV Fimbrien, die auch als *Bundle Forming Pili* (BFP) bekannt sind, assoziiert wird [24]. (Im Gegensatz zu den EPEC besitzen EHEC kein bfp! [99]). Man geht davon aus, daß BFP die initiale Adhärenz der EPEC an Wirtszellen vermitteln [24]. Ein Protein namens "Mitochondria associated protein" (MAP) gehört zu den frühen Adhäsinen. Es fördert die Ausbildung von Filopodien, der sich dann die Entstehung der Podeste anschließt. Die Podestausbildung wird eigentlich durch MAP inhibiert, so daß man annimmt, daß MAP nur bis zu einem bestimmten Zeitpunkt der A/E-Läsion-Ausbildung aktiv ist. Nachdem zunächst der enge Kontakt zwischen Wirtszelle und Erreger durch MAP hergestellt wurde, nimmt dann der Einfluß des MAP ab, während die Neuordnung des Aktins durch einen steigenden Tir- Gehalt vorangetrieben wird [110]. Die EPEC-induzierte Signaltransduktion erfolgt durch sezernierte (EPEC-) Proteine. Bald nach der Bindung von EPEC an die Epithelzelle erfolgt die Aktivierung diverser Wirtszellsignale. Dazu gehören die "second messenger" Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Calcium ( $Ca^{2+}$ ), die

möglicherweise die Proteinkinase C der Wirtszelle aktivieren. Außerdem induzieren die EPEC die Phosphorylierung der leichten Myosinketten und die Tyrosinphosphorylierung des Tir [45]. Mittels des Typ III Sekretionsapparates exportieren die EPEC (so wie viele andere Enteropathogene) ihre Virulenzfaktoren in die Wirtszelle. In Abhängigkeit von Medium, Temperatur und dem per-Lokus sezernieren die EPEC mindestens fünf verschiedene Proteine. Bei Deletion des *sep*-Gens (s. Kap. 2.1.1) wird -bis auf das größte der fünf sezernierten Proteine, Esp C- ihre Sekretion unterbunden. Mindestens die beiden sezernierten Proteine Esp A und Esp B sind notwendig, um die Signalkaskaden im Epithel zu aktivieren. Dazu gehören IP<sub>3</sub>-Ströme, die Tyrosinphosphorylierung von HP 90 bzw. Tir, die Depolarisierung der Zelle, Aktinreorganisation und die Intiminbindung [24]. Als dritter und letzter Schritt der A/E-Ausbildung erfolgt die extrem dichte Anheftung des Erregers an die Wirtszelle. Diese wird durch das bakterielle äußere Membranprotein Intimin veranlaßt. Intimin bindet nur unter der Voraussetzung an die Tyrosinphosphorylierte Form des HP 90-Protein, bzw. Tir, wenn die Phosphorylierung des Rezeptors durch die EPEC aktiviert wurde. Die dichte Anheftung findet folglich erst nach der Signaltransduktion statt [24].

Nach der Injektion des Tir in die Wirtszelle wird der Tir von EPEC durch die Proteinkinase A an zwei Serinresten phosphoryliert. Durch eine bislang unbekannt Kinase wird auch der Tyrosinrest an Position 474 phosphoryliert. Die Tyrosinphosphorylierung des Tir ermöglicht die direkte Bindung von Nck, eines Wirtszelladaptorproteins. Nck bindet dann entweder direkt an oder rekrutiert indirekt das N-WASP-Protein, welches wiederum den Arp 2/3-Komplex aktiviert. N-WASP ist für den A/E-Effekt essentiell. Der Arp 2/3-Komplex initiiert die Aktinkondensation und veranlaßt die Ausbildung der Aktinfilamente.  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin, Cortactin und Talin binden den intrazytoplasmatischen N-Terminus des Tir unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung. Talin und Cortactin werden anscheinend für die Podestausbildung benötigt [96]. Die an der Ausbildung der A/E-Läsionen beteiligten Faktoren auf Wirtsseite und ihre physiologischen Funktionen sind in Tabelle 4 nochmals zusammenfassend dargestellt. Das Phänomen des

"Attaching and Effacing" wurde zuerst für EPEC beschrieben und ist für diese *E. coli* am besten erforscht. Charakteristisch für die Läsionen sind das Verstreichen der Mikrovilli und die extrem dichte Anheftung der Bakterien an die Zellmembran. Direkt unterhalb der adhärenierten Bakterien können ausgeprägte Veränderungen des Zytoskeletts beobachtet werden. Dazu gehört die Akkumulation polymerisierten Aktins und die Ausbildung der Podeste, auf deren Oberfläche sich die angehefteten EPEC befinden. Die Podeste können pseudopodienartig bis zu 10 µm von der Epithelzelle wegragen. Die Neuordnung des Zellzytoskeletts ist für die Podestbildung und eventuell auch für das Verstreichen der Mikrovilli verantwortlich. Zu den Komponenten des Zytoskeletts, die in den Epithelzellen unter den adhärenierten EPEC akkumulieren, gehören filamentöses Aktin,  $\alpha$ -Aktinin und leichte Myosinketten sowie die Moleküle Talin und Ezrin, die die Aktinfilamente mit der Membran verbinden. An der Spitze der ausgestreckten Podeste unterhalb der Plasmamembran befinden sich tyrosinphosphorylierte Proteine. Die EPEC an der Spitze der ausgestreckten Pseudopodien können sich mit einer Geschwindigkeit von 0,07 µm pro Sekunde über die Zelloberfläche bewegen, wobei man noch nicht weiß, welche Bedeutung dieser Beweglichkeit zukommt [61]. Die Oberfläche der Podeste paßt sich in ihrer Form der Krümmung der Bakterien an und behält entlang der kompletten Bakterienoberfläche einen Abstand von weniger als zehn Nanometer (10 nm) bei [54]. Das Bakterium ist somit fast "eingebettet". Es ist jedoch noch nicht klar, wie dieser Zustand dem Keim zugute kommt. Denkbar jedoch ist, daß er die Persistenz und/oder den Zugang des Erregers zu Nährstoffen der Zelle fördert. Die angehefteten Bakterien scheinen sich auch auf der Wirtszelle zu teilen, da kleine Bakterienketten auf der Oberfläche der Eukaryotenzelle festgestellt werden konnten. Wird eine Zelle apoptotisch oder nekrotisch, lösen sich die Bakterien ab. Man nahm an, dass gesunde Wirtszellen für den Mechanismus der engen Anheftung gebraucht werden, der durch Proteinphosphorylierung oder andere Modifikationsvorgänge angehalten wird [110]. Jedoch wurde unlängst bei Kälbern auch die Ausbildung von A/E-Läsionen auf dem Plattenepithel des reкто-analen Übergangs nachgewiesen [102].

**Tab. 4: Überblick über an der Ausbildung der A/E-Läsionen beteiligte Faktoren auf Wirtsseite**

<b>Wirtsfaktor</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>physiologische Funktion</b>	<b>Funktion im A/E-Phänomen</b>	<b>Textquelle</b>
Aktin	Protein; Polypeptidketten, die sich mit ihren jeweilig entgegengesetzten Enden aneinanderlagern und eine strukturelle Polarität besitzen (intrazytoplasmatisch)	Filamente bilden starres Bündel im Inneren eines jeden Darm-Mikrovillus	aus dem Aktin werden die Podeste gebildet	[24] [4] [41]
$\alpha$ -Actinin	Aktin-Bindeprotein (intrazytoplasmatisch)	bündelt Aktin zu Filamenten	verbindet den N-Terminus des Tir mit dem Zytoskelett	[5] [24] [138] [4] [40]
Nck	Protein	Wirtszellanheftung ( <i>host adaptor protein</i> , Adapterprotein: Allgemeinbegriff für Proteine in intrazellulären Signalwegen, die verschiedene Proteine einer solchen Kette direkt miteinander verbinden). In den Aktinsignalweg involviert	initiiert Aktinsignalweg zur Podestausbildung, rekrutiert N-WASP und den Arp2/3-Komplex	[8] [4]
leichte Myosinketten	gestreckte Proteine (intrazytoplasmatisch)	bildet dicke Filamente wie in einem Sarkomer, bilden Streifasern in Nichtmuskelzellen, kontraktil. Regulation der Tight Junction-Permeabilität	Akkumulation unter den adhärenzten EPEC in Epithelzellen	[24] [75] [138] [4]
Talin	Protein (intrazytoplasmatisch)	Anheftung, Regulation der Tight Junction-Permeabilität	für die Podestbildung essentiell	[24] [5] [110] [138] [9]

Fortsetzung Tab. 4

Wirtsfaktor	Eigenschaften	physiologische Funktion	Funktion im A/E-Phänomen	Textquelle
Ezrin	Mikrofilament-assoziiertes Protein (intrazytoplasmatisch)	Verbindung von Aktinfilamenten an die Zellmembran	akkumuliert unter adhärennten EPEC, Vernetzung mit dem transmembranösen Rezeptor?	[24] [28]
IP <sub>3</sub> , Inositol-1,4,5-Trisphosphat	kleines wasserlösliches Molekül, entsteht aus der Spaltung von PIP <sub>2</sub> in IP <sub>3</sub> und Diacylglycerin durch die Phospholipase C (intrazytoplasmatisch)	reguliert die Calciumfreisetzung zur Steuerung von Zellfunktionen	wird bald nach der Adhäsion von EPEC freigesetzt	[5] [24]
HIR, Host cell intimin receptor	membranassoziiert	Physiolog. Funktion unbekannt	Intiminbindungsstellen an der Wirtszelle	[24]
N-WASP ( <i>Neural Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein</i> )	Protein (intrazytoplasmatisch)	Schlüsselement für die Signalwege, die die Aktinpolymerisation über den Arp2/3-Komplex regulieren	initiiert die Podestformation nach EPEC-/ EHEC-Adhäsion	[43] [76]
Arp (Actin-related protein)	Proteinkomplex, Proteine zu je ca. 45% identisch mit Aktin (intrazytoplasmatisch)	Aktinpolymerisation, ermöglicht rasche Verlängerung am Plus-Ende der Aktinfilamente	Aktivierung führt zur Aktinpolymerisation	[138] [4]
PI <sub>3</sub> -Kinase	Kinase	Enzyme, die Phosphatgruppen übertragen (intrazytoplasmatisch)	Antiphagozytose	[138] [135]

## **2.2 Immunmodulation durch STEC und EPEC**

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Intimin auch in der Lage ist, die Immunantwort zu modulieren [106]. Es ist deswegen nicht nur als Adhäsion, sondern auch als Moduline zu betrachten. Moduline stellen eine Klasse bakterieller Virulenzfaktoren dar, die insbesondere die Zytokinantwort einer Wirtszelle oder eines Wirtsorganismus verändern [49]. Seine Wirkung als Moduline zeigte das Intimin z.B. in Untersuchungen an Mäusen [51]. Aber auch andere Virulenzfaktoren der STEC verändern die Reaktionslage des lokalen Immunsystems bei der Kolonisierung der Darmschleimhaut.

### **2.2.1 Flagellin**

Flagellin von *E. coli* O157:H7 ruft in Epithelzellen eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hervor, was sich in der vermehrten IL-8-Produktion bemerkbar macht. Die Flagellinerkennung ist Teil des angeborenen Immunsystems zum Erregernachweis und wird durch den Toll-like Rezeptor 5 vermittelt. Durch Bindung an den Rezeptor wird ein intrazellulärer Signalweg über Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 aktiviert. Eine solche Aktivierung erfolgt auch durch EPEC-Stämme, STEC-Stämme anderer Serovaren sowie Stx [111].

### **2.2.2 Hämolyysin**

Das porenbildende STEC-Hämolyysin gehört zur Familie der RTX-Toxine und liegt auf einem großen, STEC-spezifischen Plasmid. Das STEC-Hämolyysin zeigt Verwandtschaft zum Hämolyysin von uropathogenen *E. coli*, ist aber weniger aktiv. Die genaue Rolle des STEC-Hämolyisins bei der Infektion ist nicht bekannt, eventuell ist es jedoch an der Eisenakquirierung beteiligt. Es wurde spekuliert, daß es in kleinen Mengen auch Signalkaskaden in Endothelzellen auslösen und dadurch synergistisch zum Stx wirken könnte [71]. Bei einer Studie an humanen Leukozyten zeigte sich, daß nach Behandlung mit  $\alpha$ -Hämolyysin (*hlyA*) der oxidative Metabolismus zeit- und dosisabhängig aktiviert war. Wurden die Leukozyten mit Hämolyysin vorinkubiert, war ihre

Fähigkeit, Bakterien und Partikel zu phagozytieren und chemotaktisch zu agieren, herabgesetzt. Vitalität und Funktion der Leukozyten werden durch das Hämolysin beeinflusst, so daß ihre bakteriziden Eigenschaften vermindert sind. Dadurch wird auch die Persistenz von *E. coli* unterstützt [10].

### 2.2.3 Lymphostatin

Lymphostatin ist das Produkt des chromosomalen Gens *lifA* (*lymphocyte inhibitory factor A*). Es ist ein 366 kDa großes Toxin, das die Proliferation humaner PBMC hemmt. Es zeigt eine signifikante Homologie zu den katalytischen Domänen der großen clostridialen Zytotoxine [67].

Klapproth *et al.* zeigten, dass Bakterienlysate sowohl eines EPEC-Stammes als auch eines EHEC-Stammes in mitogen-stimulierten humanen PBMC die Transkription der Zytokingene von IL-2, IL-4, IL-5 und Interferon  $\gamma$  reduzierten. Nicht betroffen von diesem Effekt waren dagegen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und IL-12, so dass nicht von einem generalisierten Effekt auf die Transkription von Zytokinen ausgegangen werden kann [69]. Diese spezifische Inhibition ist dosisabhängig sowie protease- und hitzeempfindlich. EPEC-Bakterienlysate wiesen die gleiche Wirkung auch bei mononukleären Zellen der Lamina propria des humanen Kolons auf [68]. Die Zytokintranskription von IL-2, IL-4, IL-5 und Interferon  $\gamma$  sank bei gleichbleibender IL-8-Transkription. Gleichzeitig änderte sich die CD25-Expression der mukosalen CD4+, CD8+ und CD45RO+ Zellen nicht [69]. Obwohl eine proliferationshemmende Wirkung zu beobachten war, konnten keine Anzeichen für die Auslösung von Apoptose gefunden werden [68]. Der Effekt scheint lymphozytenspezifisch zu sein, da er auch nach Depletion von Makrophagen und in Jurkat-Zellen zu beobachten ist.

Bei STEC wird ein dem Lymphostatin sehr ähnliches, plasmidkodiertes Protein postuliert, das vermutlich Produkt des *ORF 7095* ist. Ein Verlust des Plasmids ging mit dem Verlust der inhibitorischen Wirkung auf die Zytokinproduktion von Lymphozyten durch Bakterienlysate eines O157:H7-Stammes einher. Obwohl *lifA* nicht auf dem LEE liegt, konnte eine Aktivität dieses Gens bisher nur in Bakterienstämmen nachgewiesen werden, die auch A/E positiv waren [67]. Bei dem Vergleich von Lymphostatin mit ToxinB von *Clostridium difficile* fällt eine

500 bp große Homologieregion auf. Diese liegt N-terminal und wird im Fall von ToxinB erst nach Mikroinjektion in die Zelle aktiv. Deshalb vermuten Klapproth *et al.*, dass auch Lymphostatin an die Zelle bindet und in sie transloziert werden muß, um seine Wirkung zu entfalten [67].

Das *efa1*-Gen von Non-0157-Stämmen hat die gleiche Größe wie das *lifA*-Gen und ist auch in der Nukleotidsequenz zu 99,9 % mit diesem identisch. Über die Funktion seines Genproduktes, nämlich des "EHEC factor for adherence" (EFA), wird noch spekuliert. EFA könnte sowohl die Funktion eines Adhäsins haben oder durch Modulation der mukosalen Immunität das Überleben der EHEC sichern als auch indirekt die Expression und Sezernierung LEE-kodierter bzw. membranassoziierter, für die Kolonisation verantwortlicher Proteine beeinflussen [121].

#### **2.2.4 Shigatoxin**

Nach Endozytose der Stx in der Zielzelle wird durch die irreversible Hemmung der Proteinbiosynthese binnen Stunden der Zelltod ausgelöst. Die Shigatoxine sind aber auch stark zytokininduzierende Moleküle [86]. Durch die Modulation der lokalen Zytokinsynthese werden wahrscheinlich erst Bedingungen geschaffen, durch die sich die zytotoxische Wirkung der Stx im Gewebe dann richtig entfaltet. Toxindosen, die sonst für einen zytotoxischen Effekt zu gering wären, sind so eventuell ausreichend, um ihre zerstörerische Wirkung zu entfalten [119]. LPS und Stx 1 (bzw. Stx 2) wirken synergistisch, das heißt, daß die bei STEC-Infektionen relativ niedrigen LPS-Konzentrationen durch die potenzierende Wirkung des Stx eine zytokininduzierende Wirkung haben. Die synthetisierten Zytokine (insbesondere TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , [89]) werden aus den Zellen freigesetzt und sensibilisieren die Zielzellen der Stx (v.a. Endothelzellen). Diese exprimieren vermehrt Stx-Rezeptoren (Globotriaosylceramid; Gb<sub>3</sub>/CD77), wodurch die Einzelzellen durch die erhöhte Toxinaufnahme verstärkt geschädigt werden [119].

##### **2.2.4.1 Bedeutung bei humanen STEC-Infektionen**

Die Hauptangriffsorte des Stx sind Zellen im Darm und in der Niere. In humanen Darmepithelzellen veranlassen die Stx 1 und -2 die IL-8-Produktion.

Durch diesen Vorgang werden dann polymorphkernige Leukozyten durch Chemotaxis vermehrt angelockt. Dementsprechend treten bei STEC-Infektionen vermehrt neutrophile Granulozyten in der Darmmukosa auf [57] [125] [137]. Auch die Anheftung von Lymphozyten aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel wird verstärkt und durch TNF- $\alpha$  noch gesteigert [90]. Stx 1 induziert in Monozyten die Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 [63] [129]. Da STEC nichtinvasive Erreger sind, ist die Aufnahme des Stx in tieferliegende Gewebsschichten einer der bedeutendsten Schritte in der Pathogenese der STEC- bedingten Erkrankungen [111]. In Versuchen zeigte sich, daß durch eine vergrößerte parazelluläre Permeabilität und den Zusammenbruch der *tight junctions* die Menge an Stx 1 und Stx 2, die von apikal nach basolateral durch einen Monolayer polarisierter T84-Zellen translozierte, proportional zu der Anzahl polymorphkerniger Granulozyten war, die in die entgegengesetzte Richtung migrierten [56]. Durch die apikale Positionierung von STEC wird zusätzlich auch die Produktion von IL-8 veranlaßt [111]. Die IL-8-Induktion wird dabei nicht durch A/E, sondern durch das Flagellen-Antigen verursacht [141]. Die Bildung, Freisetzung und Verteilung des Stx via Blutstrom führt oftmals zu Nierenschäden. Stx 1 induzierte in proximalen Tubulusepithelzellen und glomerulären Endothelzellen die Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 [55]. Außerdem zeigten einige Autoren [130], daß das Stx die Proliferation von Mesangiumzellen reduzierte und hemmend auf die DNA-Synthese wirkte. Polymorphkernige Granulozyten wurden durch proinflammatorische Chemokine von Endothelzellen, die durch die STEC-Infektion in Glomerulumkapillaren vermehrt synthetisiert wurden, angelockt und verstärkten die Schädigung von Endothelzellen, die wiederum durch die Zytokine bereits (gegenüber Stx) sensibilisiert waren [90]. Die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen wird durch den Einfluß des Stx 1 verstärkt, weshalb es in Folge zur vermehrten Ablösung der Endothelzellen in den Glomerulumkapillaren kommt [79]. Stx 2 hemmt die spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten dosis- und zeitabhängig, wodurch von den Granulozyten verursachte Gewebeschäden noch verstärkt werden [77]. Erhöhte MCP-1-mRNS-Spiegel in Mesangiumzellen werden durch Stx1 induziert und durch IL-1 $\alpha$  weiter verstärkt. Die Ausscheidungsmenge dieser Chemokine im Urin der Patienten korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung [113]. Außerdem kann Stx 1 die

Produktion freier Sauerstoffradikale polymorphkerniger Granulozyten bei gleichzeitig reduzierter Phagozytoseaktivität hochregulieren [66]. Bei HUS-Patienten findet man in den Glomerula neben Mesangiumzellen auch Makrophagen, Monozyten und polymorphkernige Zellen, deren Chemotaxis und Aktivierung durch MCP-1 und IL-8 verursacht wird [129].

Bisher noch wenig verstanden ist die Wirkung von Stx auf das humane Immunsystem. Cohen *et al.* zeigten an Burkitt Lymphomzellen (Daudizellen), die hochempfindlich gegenüber dem Stx sind, daß Stx einen Einfluß auf B-Zellen in Keimzentren hat und schlußfolgern daraus, daß diese Wirkung auf die B-Zellen wiederum die Bildung von Antikörpern gegen EHEC-Antigene erschwert [14].

#### **2.2.4.2      *Bedeutung bei murinen STEC-Infektionen***

Bei Mäusen wurden ebenfalls immunmodulatorische Wirkungen durch Stx festgestellt. Tesh *et al.* zeigten, daß in murinen Makrophagen durch Stx 1 vermehrt TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und IL-6 freigesetzt wurden. Außerdem konnte TNF- $\alpha$  bei Makrophagen auch noch durch Stx 2 induziert werden [124]. Diese Interleukine sind auch in den Nieren infizierter Mäuse, zunächst aber nicht in deren Seren nachweisbar. Erst nach längerer Infektionsdauer als Zeichen der gestörten Zytokinregulierung steigen auch die Serumspiegel [58].

#### **2.2.4.3      *Bedeutung bei porcinen STEC-Infektionen***

Eine häufige, durch *E. coli* verursachte Erkrankung von Schweinen ist die Ödemkrankheit, die durch das Shigatoxin "2e" hervorgerufen wird und aufgrund toxininduzierter Gefäßschäden und daraus resultierenden Hirninfarkten mit hoher Mortalität bei Absatzferkeln einhergeht [92].

Bei gnotobiotischen Schweinen, die mit einem Stx 1-produzierenden *E. coli*-Stamm (0111:NM) infiziert wurden, gab es viele Anzeichen dafür, daß die mehrwöchige, persistierende Infektion bei diesen Tieren dadurch hervorgerufen wird, daß der Erreger befähigt ist, der Immunantwort des Wirtes adäquat zu begegnen. Dies äußerte sich sowohl in histopathologischen Veränderungen der lymphatischen Gewebe als auch in der Immunantwort. Der Verlust periarterieller lymphatischer Scheiden in der Milz, der Verlust lymphoglandulärer Komplexe in der Submukosa des Dickdarms, eine reduzierte

Anzahl von Lymphozyten im peripheren Blut, eine herabgesetzte Proliferationsantwort auf T-Zell-Mitogene sowie eine verminderte Antikörperproduktion waren Anzeichen dafür, daß die Wirtsreaktion unterlaufen wurde. Durch die Invasivität von O111:NM könnte das Stx vermehrt Zugang zu den Lymphgefäßen und dem Kreislaufsystem haben, wodurch Immunzellen beeinflusst werden. Hinzu kommt nach Ansicht der Autoren, daß eine chronische Entzündung und die vermehrte Wirkung von Endotoxinen die Freisetzung von Produkten wie z.B. TNF- $\alpha$  veranlassen könnte, die in der Lage sind, zu einer Immunsuppression beizutragen [13].

#### **2.2.4.4 Bedeutung bei Infektionen der Wiederkäuer**

Rinder sind zwar Reservoirwirte der EHEC, jedoch meist nur asymptomatisch infiziert [21]. Trotzdem wurden bei Rindern neben Epithelzellen [52] [84] insbesondere Lymphozyten als Zielzellen für Stx identifiziert. Im Gegensatz zum Menschen beeinflusst Stx 1 beim Rind die Funktionen aller Lymphozytensubpopulationen. Das weist darauf hin, daß das Immunsystem ein Hauptziel des Stx 1 bei Rindern ist [86]. Stx 1 wirkt direkt auf bovine Lymphozyten, indem es (ebenso wie Lymphostatin) die Proliferation peripherer mononukleärer Zellen des Blutes des Rindes *in vitro* hemmt [88]. In Kulturen boviner PBMC wurde die Anzahl der vitalen, zu Blasten transformierten Zellen, die gleichzeitig Gb<sub>3</sub>/CD77<sup>+</sup> exprimierten, in allen Subpopulationen (BoCD2<sup>+</sup>, BoCD4<sup>+</sup>, BoCD8<sup>+</sup>, WC1<sup>+</sup> [ $\gamma\delta$ -T-Zellen] BoCD21<sup>+</sup>, und BoCD25<sup>+</sup>) durch den Einfluß des Stx 1 extrem reduziert.

Zellen einer bovinen B-Lymphomzelllinie (BL-3) sind unter bestimmten Bedingungen sehr sensibel gegenüber einer Apoptose-Induktion durch Stx 1. Die Empfänglichkeit dieser Zelllinie wurde nur durch LPS oder PWM (pokeweed mitogen) induziert, wohingegen Kulturen, die mit T-Zell-Mitogenen stimuliert waren, durch das Toxin unbeeinflusst blieben. Im Gegensatz dazu induzierte Stx 1 weder Apoptose noch Nekrose in primären PBMC-Kulturen; es verhinderte allerdings die mitogeninduzierte Steigerung der metabolischen Aktivität. Der Einfluß des Stx 1 auf einzelne PBMC-Subpopulationen variierte je nach verwendetem mitogenem Stimulus. Die Stimulation mit Phytohemagglutinin P induzierte die Proliferation boviner CD8<sup>+</sup>-Zellen. Diese proliferative Antwort wurde durch das Stx 1 blockiert. Andererseits reduzierte

das Stx 1 den Anteil vitaler B-Zellen in der Gegenwart von LPS. Das Stx bewirkte auch, dass der IL-2-Rezeptor BoCD 25 länger und vermehrt exprimiert wird. Da jedoch bei Supplementierung des Kulturmediums mit den Zytokinen TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$  und IL-2 der Zusatz dieser Zytokine den Effekt des Stx 1 weder nachahmen noch aufheben konnte, ist er offensichtlich nicht zytokinvermittelt [88].

Sowohl Stx 1 als auch die rekombinante B-Untereinheit banden an stimulierte PBMC, vor allem an die Subpopulationen, die hochempfindlich für das Stx1 sind (B-Zellen, BoCD8+). Kompetitions- und Bindungsstudien bestätigten, daß Stx 1 an bovines Gb<sub>3</sub> bindet, aber es wurden auch verschiedene Rezeptorisoformen mit variierender Affinität für rekombinantes StxB1 während der Lymphozytenaktivierung exprimiert. Mindestens eine dieser Isoformen vermittelt die Toxinaufnahme. Ein monoklonaler Anti-StxB1 Antikörper aus der Maus, eingesetzt als Modell für spezifische bovine Stx 1-Serumantikörper, modulierte die Bindung und Internalisierung durch den Rezeptor eher, als sie zu verhindern.

Die Präsenz funktioneller Stx 1-Rezeptoren auf bovinen Lymphozyten erklärt den immunmodulatorischen Effekt des Stx1 [120]. Die Feststellung von Pirro *et al.*, daß über 90 % adulter Rinder Stx-spezifische Antikörper im Serum haben, läßt die Möglichkeit offen, daß das Toxin einen immunmodulatorischen Effekt besitzt, der nur lokal auf das Darmimmunsystem begrenzt ist [101]. Insgesamt also scheint das Stx 1 zur Pathogenese der STEC-assoziierten Diarrhö insofern beizutragen, als daß die Mukosa-assoziierte Immunantwort unterdrückt und die Erregerpersistenz begünstigt wird [88].

Hinzu kommt, daß durch Sekretion der Proteine [via TypIII Sekretionssystem], die zur Anheftung notwendig sind, es eigentlich -wie beim Menschen- zu einer proinflammatorischen Antwort mit dem Ziel der Erregereliminierung kommen müßte. Eine derartige Reaktion findet jedoch nicht statt, der Organismus unterdrückt vielmehr eine solche Immunantwort. Denkbar ist, daß bestimmte sezernierte Proteine zusammen mit dem Stx für diese Modulation verantwortlich sind [110].

### 2.2.5 LEE-Produkte und ihre Wirkung auf die Chemokinsynthese

Rogers *et al.* sind der Meinung, daß die Produkte des LEE die Chemokingenexpression in humanen Kolonepithelzellen nicht beeinflussen [111]. Anderer Auffassung sind Hauf *et al.*. Sie untersuchten die Wirkung der Infektion von HeLa-Zellkulturen mit Stx-bildenden *E. coli* hinsichtlich NF- $\kappa$ B. Sie zeigten, daß das Produkt des *espB*-Gens einen inhibitorischen Effekt auf die TNF  $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung hat. Wildtyp-STEAC inhibierten die IL-8- und IL-6- Produktion von HeLa-Zellen EspB-abhängig. Diese Interferenz an einer bestimmten Stufe des NF- $\kappa$ B-Signalwegs ließ sich auch für EHEC und EPEC nachweisen. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß die Suppression der NF- $\kappa$ B-DNS-Bindungsaktivität ein Pathogenitätsmechanismus ist, den Bakterien entwickelt haben, um der proinflammatorischen Immunantwort, die durch die Chemokin-induzierende Wirkung des Stx auf Epithelzellen initiiert wird, zu entkommen [47].

### 2.2.6 Antiphagozytose

In Versuchen mit EPEC und einer murinen Phagozytenzelllinie konnte gezeigt werden, dass EPEC ihre Aufnahme in phagozytierende Zellen durch einen Mechanismus blockieren, der mit der Tyrosindephosphorylierung der Wirtsproteine zusammenhängt. Da die Antiphagozytose bei Tir- bzw. Intimindeletierten Stämmen weniger effizient war, ist der antiphagozytotische Phänotyp von EPEC von den Typ III-Sekretionswegen und den sezernierten Proteinen abhängig [42]. Die Erreger blockieren PI<sub>3</sub>-Kinase-vermittelte Signalwege, um sich vor der Phagozytose zu schützen [11]. Möglicherweise trägt dies zur Persistenz der Keime im Wirt bei [39].

### 2.2.7 Intimin

*C. rodentium* ruft bei Mäusen A/E-Läsionen hervor [93]. Untersuchungen an infizierten Mäusen zeigten erstmals, daß Intimin auch als Immunmodulator fungieren kann.

Mäuse, die mit einem abgetöteten, intiminpositiven *C. rodentium*- Wildstamm oral inokuliert wurden, zeigten eine starke T<sub>H</sub>1-Zellantwort, die sich in einer

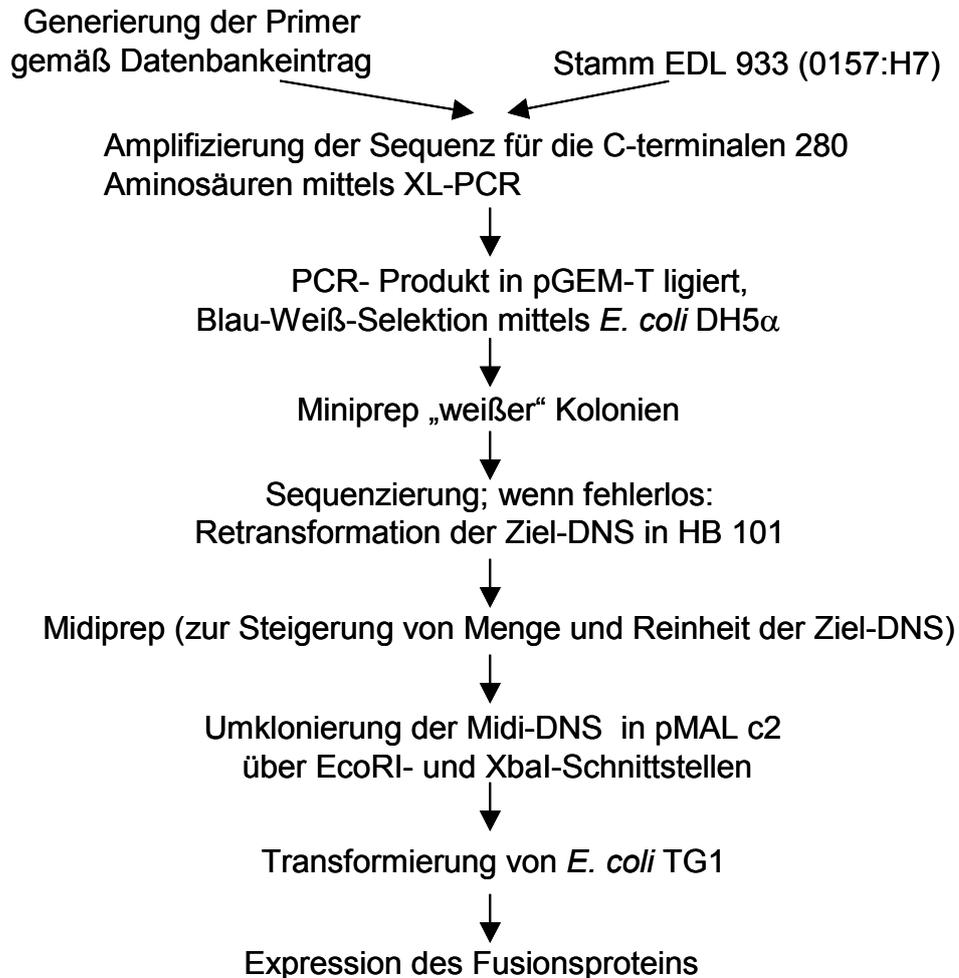
Verdickung der Mukosa und einer Hyperplasie der Krypten äußerte [50]. Bei den zu beobachtenden, vermehrt immigrierten CD4<sup>+</sup>-Zellen handelte es sich vermutlich um Makrophagen. Auch CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen waren in der *Lamina propria* an der Kryptenbasis verstärkt vorhanden. Die mRNS für IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  aber auch für den epithelialen Wachstumsfaktor KGF war im distalen Kolon im Vergleich zur Kontrollgruppe extrem erhöht. Diese Beobachtungen brachten Higgins *et al.* zu der Annahme, daß die Erhöhung der mRNS von KGF für den Erreger von Vorteil ist, da die Substratoberfläche zur Ausbildung von A/E vergrößert wird. Eine Ursache für die in diesem Modell veränderte Zytokingenexpression ist die Costimulation von T-Zellen durch das Intimin. Intimin wird auf der äußeren Oberfläche von *C. rodentium* exprimiert und soll sich auf die mukosale T-Zellproliferation auswirken. Auch beim Einsatz von Int<sub>280</sub> bei Splenozyten zeigte sich, daß Intimin einen costimulierenden Effekt hat, da beim Zusatz von ConA zusätzlich zum Intimin die proliferative Antwort der T-Zellen dosisabhängig gesteigert werden konnte; wurden die Zellen jedoch nur mit Intimin und Medium ohne Stimulans inkubiert, zeigte sich kein proliferativer Effekt. Korrespondierende Resultate ergab auch die Auswertung der mRNS-Transkripte für IFN  $\gamma$ , IL-2 und IL-4 [50].

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Vorgehensweise zur Klonierung des Int280 $\gamma$

Es sollte ein Klon hergestellt werden, der die C-terminalen 280 Aminosäuren des Intiminsubtyps  $\gamma$  in Form eines Maltose-bindenden Fusionsproteins exprimiert. Dafür wurde nach dem folgenden Schema vorgegangen:



### 3.1.2 Erstellung eines rekombinanten *E. coli*-Stammes zur Expression eines Fusionsproteins

#### 3.1.2.1 Erzeugung transformationskompetenter *E. coli* Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)

Sowohl die zur Blau-Weiß-Selektion (vgl. Kap. 3.1.2.8) befähigten *E. coli* K 12-DH5 $\alpha$ -Zellen (Fa. Invitrogen, Katalognr. 18258-012) als auch die *E. coli* K 12-HB101-Zellen (Institut für Virologie, Gießen) wurden mittels der CaCl<sub>2</sub>-Methode zur Transformation kompetent gemacht. Ein Milliliter einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes wurde 1 : 100 in Luria-Bertani (LB)-Medium<sup>++</sup> mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM KCl gegeben und ca. 90 min bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator (Gesellschaft für Labortechnik mbH Typ 3032) belassen, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,55 erreicht war. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und dann in einer vorgekühlten Zentrifuge 10 min bei 1409 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml vorgekühltem Puffer (*Transformation buffer* (TfB) I) gelöst, 10 min auf Eis gestellt und wieder 10 min bei 1409 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml TfB II gelöst. Die Zellen wurden mindestens 1 h bei -70 °C eingefroren. Zur Transformation wurden sie aufgetaut und sofort auf Eis gestellt, wo sie 5 bis 10 min belassen wurden.

Die *E. coli* K12 TG1-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Katalognr. DSM 6056-*Escherichia coli*) wurden abweichend davon 1 : 100 in LB-Medium vorverdünnt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 bis 0,4 wachsen gelassen. Nach ebenfalls 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 4 °C und 1940 x g in einer Beckmann L8-55 Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25 ml 50 mM eiskalter und steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden 15 min auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml eiskalter und steriler 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15 % Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu je 100  $\mu$ l aufgeteilt, in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

### **3.1.2.2 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen die DNS an spezifischen Sequenzmotiven und spalten sie dort. Ein durch Spaltung erhaltenes DNS-Fragment kann dann in einen entsprechend vorbehandelten Vektor kloniert werden. Für eine gerichtete Klonierung wurden sowohl das DNS-Fragment als auch die Vektor-DNS mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* gleichzeitig verdaut. Durch die Wahl von zwei Enzymen wurde die Orientierung des Inserts im Vektor festgelegt. Die Reaktionsbedingungen sind von dem bzw. den entsprechenden Enzymen abhängig und wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Analytische Spaltungsansätze hatten ein Volumen von 10 µl entsprechend 100-200 ng DNS, präparative Spaltungsansätze 50 µl entsprechend 3-5 µg DNS. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Restriktionsreaktion wurde ein Aliquot der gespaltenen DNS auf einem Agarosegel parallel zu ungeschnittener DNS und DNS-Größenmarker aufgetrennt.

### **3.1.2.3 XL-PCR zur Klonierung der 3´terminalen 840 Nukleotide des Gens für die C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimin gamma (pHIT-IV-28)**

Um die gewünschte DNS zur Herstellung eines gentechnisch veränderten Organismus zu erhalten, wurde eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes EDL 933 (O157:H7, Intimin Subtyp gamma, Stx1&2; ATCC Nr. 43895) von einer frischen Blutagarplatte in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Inhalt des Röhrchens 1 : 1 mit sterilem *A. bidest.* verdünnt und die Aliquots à 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße bei -20 °C tiefgefroren. Zum Einsatz in der PCR wurde ein Aliquot 2 min in Wasser gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Um den Einbau der Fremd-DNS in die kompetent gemachten Bakterienzellen in der gewünschten Richtung zu gewährleisten, wurden die Sequenzen der Restriktionsenzyme in die folgenden Primer integriert:

Primer	Basenfolge 5'→3'
gamma forward	gaa ttc CAA ACC AAG GCC AGC ATT ACT GAG ATT AAG ( <i>EcoRI</i> an 5')
gamma reverse	tct aga TTA TTC TAC ACA AAC CGC ATA GAC ATT TGG ( <i>XbaI</i> an 3')

Der Ansatz (Mastermix) für die XL-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Stamm-Konz.	Gebrauchskonz.	Menge pro 1 x Ansatz
<i>A. bidest.</i>	-	-	25,4 µl
XL-Puffer		1 x	15,0 µl
Mg(OAC) <sub>2</sub>		1 mM	2,2 µl
Primer gamma forward bzw. reverse	20 µM	1 µM	0,8 µl (je Primer)
dNTP-Mischung	Je 4 mM	Je 200 µM	4,0 µl
XL-Polymerase		0,25 U/ml	0,8 µl

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurde dem Mastermix (entsprechend den in der Tabelle aufgeführten Reagenzien) 1,0 µl Bakteriensuspension zugegeben, das Gefäß gevortext, kurz an zentrifugiert und mit folgendem Programm im Cycler Gene Amp PCR Systems 9600 (Fa. Perkin Elmer) inkubiert:

94 °C	2 min	} 16 x
94 °C	15 sec	
60 °C	1 min	
94 °C	15 sec	
60 °C	1 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Zur Überprüfung der Amplifikatlänge wurden 4,5 µl des PCR-Produktes mit 0,5 µl 10 x -Ladepuffer auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit 1,5 % Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE, als Größenstandards dienten der Gene Ruler 100 bp (Fa. MBI Fermentas) und der 1 kb-Ladder (Fa. Gibco). Die Proben wurden 45 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

#### **3.1.2.4 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNS aus dem Agarosegel und der gleichzeitigen Entfernung von Agarosegelresten wurde eine DNS-Gelextraktionsfiltereinheit (DNS Gel Extraction Kit, Fa. Montage) eingesetzt. Die gewünschte DNS-Bande wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht (312 nm, Transilluminator) aus dem Gel ausgeschnitten, auf den Filter gebracht und 10 min bei 5009 x g in einer Heraeus Tischzentrifuge Biofuge pico abzentrifugiert. Das erhaltene Fragment konnte anschließend sofort weiterverwendet werden.

#### **3.1.2.5 Generierung eines A-Überhangs (A-Tailing)**

Da die XL-Polymerase eine Korrekturaktivität besitzt und somit „glatte Enden“ produziert werden, müssen zur Ligation in den pGEM-T-Vektor (Fa. Promega, Resistenz: Ampicillin) mit T-Überhang sogenannte PolyA-Überhänge an das Insert angehängt werden. Dies geschah mit Hilfe des A-Addition-Kits (Fa. Qiagen):

8 µl PCR-Produkt und

2 µl 5x-A-Addition MM

wurden 30 min bei 37 °C inkubiert.

#### **3.1.2.6 Ligation von DNS-Fragmenten**

Die Ligation von Insert und Vektor wurde durch T<sub>4</sub>-DNS-Ligase vorgenommen, die die Enden doppelsträngiger DNS unter ATP-Verbrauch verbindet.

Ansatz:

5,0 µl 2 x Rapid Ligation Buffer

1,0 µl pGEM-T-Vektor (entsprechend 50 ng)

3,0 µl PCR-Produkt (mit A-tail)

1,0 µl T<sub>4</sub>-DNS-Ligase (3 U/µl)

Der Ansatz wurde in einem Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C ligiert.

#### **3.1.2.7 Transformation von Plasmid-DNS in kompetente DH5α-Zellen**

Der Ligationsansatz bzw. die DNS wurde zu 50 µl kompetenten DH5α-Zellen gegeben, 20 min auf Eis gestellt, 2 min bei 42 °C inkubiert und dann 1 bis 2 min auf Eis gestellt. Dann wurden 200 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 3 min bei 37 °C inkubiert. Der komplette Ansatz wurde mit 10 µl X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol-β-D-Galactopyranosid, Fa. Roth) für die Blau-Weiß-

Selektion versetzt, auf eine LB-Platte mit 100 mg Ampicillin f.c. ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.1.2.8 Selektion rekombinanter Bakterienklone**

Die Selektion der plasmidtragenden, transformierten Bakterienklone erfolgte durch die Verwendung von antibiotikahaltigen Selektivnährböden entsprechend den vektorkodierten Antibiotikaresistenzgenen, so dass nur transformierte, plasmidtragende Zellen wachsen konnten. Die Auswahl der positiven Klone basiert auf der „Blau-Weiß-Selektion“ durch das im Vektor vorliegende *lacZ*-Gen. Das Produkt dieses Gens ist eine Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase. Ihre Aktivität wird in der Blaufärbung der Kolonien nach Zusatz von X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid, f.c. 20 mg/ml) sichtbar. Durch die Insertion von Fremd-DNS in die dafür vorgesehene „Multiple cloning site“ des Vektors, allerdings auch durch Ligation defekter Schnittstellen wird der Leserahmen dieses Gens verschoben. Kolonien von Zellen mit rekombinierten Plasmiden oder solche mit defekten religierten Schnittstellen bleiben auf der Selektivplatte weiß. Die genetisch veränderten „weißen“ Klone wurden vermehrt, ihre Plasmid-DNS gewonnen und durch Restriktionsanalyse bzw. DNS-Sequenzierung genetisch charakterisiert.

### **3.1.2.9 Präparation kleiner Plasmidmengen (Minipräparation)**

Eine „weiße“ Kolonie (vgl. Kap. 3.1.2.8) wurde von der Platte genommen und in ein Glasröhrchen mit 3 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37 °C bei 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die DNS nach dem Prinzip der alkalischen Lyse präpariert. Eineinhalb Milliliter der Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) abgefüllt und 20 sec bei 5009 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und je 200  $\mu$ l eiskalter RNase-haltiger Puffer P1 zugegeben. Das Bakterienpellet wurde 5 min auf dem Schüttler resuspendiert. Es folgte die Zugabe des Puffers P2 (2 N NaOH) und das fünfminütige Durchmischen. Dann wurden 200  $\mu$ l eiskalter Puffer P3 (3 M NaAcetat) zugegeben und ebenfalls 5 min geschüttelt. Nach Positionierung des Reaktionsgefäßes in der auf 4°C vorgekühlten Kühlzentrifuge wurde ca. 10 min mit 13226 x g zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu$ l Isopropanol gefällt. Die Suspension wurde gemischt und 20 min bei 13226 x g

und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Durch ca. fünfminütiges Inkubieren im Heizblock bei 37-42 °C wurde das Pellet getrocknet und anschließend durch ca. fünfminütiges Schütteln in 50 µl *A. bidest.* resuspendiert. Für den Restriktionsverdau wurden je 1,0 µl der gewonnenen DNS mit 1,0 µl H-Puffer, 0,1 µl *EcoRI*, 0,2 µl *XbaI* und *A. bidest.* ad 10,0 µl versetzt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Die kompletten Ansätze wurden mit je 2,0 µl 5 x -Ladepuffer versetzt, auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und 30 min bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Retransformation (der "Mini-DNS" in HB101 zum Zweck der Vermehrung mittels sich anschließender Midi-Prep) von 1,0 µl dieser DNS in *E. coli* HB 101 erfolgte analog zur Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Je 50 µl der Suspension wurden dann auf eine LB-Ampicillinplatte ausplattiert beziehungsweise in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin in einen Glaskolben überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert bzw. geschüttelt.

### 3.1.2.10 Sequenzierung von doppelsträngiger Plasmid-DNS

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mittels der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Ein Mikrogramm DNS in 1,4 µl *A. bidest.* wurden mit 1,0 µl M13 Primer „forward“ und 1,0 µl M13 Primer „reverse“ (je 2 pmol) (Fa. New England Biolabs, im Folgenden abgekürzt als NEB) mit autoklaviertem *A. bidest.* auf 25,0 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und dann auf vier PCR-Reaktionsgefäße à 6,0 µl verteilt. In diese PCR-Reaktionsgefäße waren zuvor je 2,0 µl einer Mischung, die aus den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), der T7-DNS-Polymerase und jeweils einem der vier 2', 3' Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) besteht, vorgelegt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgendem Programm:

Cycle Sequencing:	40 °C	2 min	
	95 °C	2 min	
	95 °C	30 sec.	} 30 x
	50 °C	30 sec.	
	70 °C	45 sec.	
	70 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Zugabe von je 4  $\mu$ l Stopmix pro Ansatz, dann:

40 °C	2 min
70 °C	2 min
4 °C	$\infty$

### **3.1.2.11 Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff- Sequenziergele**

Zur Auftrennung der Sequenzierproben kam ein 4 % iges Sequenziergel „Sequagel XR 4 %“ mit 66 cm Länge und 0,25 mm Dicke zum Einsatz. Die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wurde, wurden mit *A. bidest.* und Ethanol gereinigt. Die Breite des Abstandhalters zwischen den Glasplatten betrug 0,25 mm. Die Platten, zwischen die das Gel gegossen werden sollte, wurden in die dafür vorgesehenen Halterung festgeschraubt. Die für das Gel angesetzte Lösung wurde in eine saubere Einmalspritze aufgezogen und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Das Gel polymerisierte zunächst 1 h aus, dann wurden die Glasplatten nochmals mit *A. bidest.* und absolutem Ethanol gereinigt und in die Elektrophoreseapparatur DNA-Sequencer (Modell LiCor 4000L Fa. MWG) eingespannt. Das Einsetzen des Probenkamms (mit 48 Taschen) in das Gel erfolgte, nachdem Anoden- und Kathodenkammer mit 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer befüllt waren. Nach 30 minütigem Vorlauf wurden 1,5  $\mu$ l jeder Probe aufgetragen. Das Gel lief bei 2000 V, 37 mA, 50 W und 45 °C über Nacht. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mittels des Programmes „Husar“ des Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Nach Klonierung der sequenzierten DNS in den Expressionsvektor pMAL c2 und Retransformation erfolgte die Präparation grosser Plasmidmengen.

### **3.1.2.12 Präparation grosser Plasmidmengen (Midipräparation)**

Die Präparation größerer DNS-Mengen erfolgte durch sogenannte Midi-Präparationen. Diese beruhen (wie die Mini-Präparationen) ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Fünfzig Milliliter einer Übernachtskultur wurden in ein 50 ml Plastikröhrchen überführt und 10 min bei 3184 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands folgte die Resuspension des Pellets in 4 ml S1-

Puffer. Nach Zugabe von 4 ml S2-Puffer wurde wieder gemischt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 5 ml S3-Puffer wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Eine Nucleobond AX-Säule wurde mit 2 ml N2-Lösung äquilibriert und anschließend auf ein sauberes 50 ml-Plastikröhrchen gesetzt. Die Vorreinigung des DNS-haltigen Ansatzes erfolgte durch das Auflegen eines Papierfilters auf die Säule. Nach Bindung der DNS an die Säule wurde sie zweimal mit je 5 ml N3-Puffer gewaschen. Nach Umsetzen der Säule auf ein neues 15 ml-Röhrchen folgte die Elution der DNS mit 2,7 ml N5-Puffer. Dem Eluat wurden 2,3 ml Isopropanol zugesetzt, die Suspension gemischt und auf drei Reaktionsgefäße à 2 ml verteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 13226 x g für 10 min. Der Überstand wurde aus den Reaktionsgefäßen abgenommen und durch 200 µl Ethanol 70% ersetzt. Es folgte ein weiterer fünfminütiger Zentrifugationsschritt, nach dem das Ethanol wieder abgenommen wurde. Die DNS wurde getrocknet, in 70 µl *A. bidest.* aufgenommen, in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und die enthaltene DNS-Menge photometrisch bestimmt.

### **3.1.2.13 Transformation der Ziel-DNS in *E. coli* K 12 TG1-Zellen**

Nach erfolgter Kontrolle der Ergebnisse der Sequenzierreaktion wurde die Zielsequenz in den Expressionsvektor (pMALc2) umkloniert (vgl. Kap. 3.1.2.6) und dieses Plasmid (mit der Information für die C-terminalen 280 Aminosäuren für den Intiminsubtyp  $\gamma$ ) zum Zwecke der Induktion in den *E. coli* K12 TG1-Stamm transformiert (vgl. Kap. 3.1.2.7). Die Zellen wurden zur Kontrolle auf eine LB-Carbenicillin-Platte ausplattiert. In der gleichen Weise wurde auch mit dem pMALc2-Vektor ohne Insert (geführt als pHIT-IV-29) verfahren, um eine Negativkontrolle für die Untersuchungen zu erhalten. Die Induktion ist gleichzeitig die Kontrolle dafür, daß die Transformation funktioniert hat. Übernachtskulturen mit 5 ml supplementiertem LB-Medium (0,2 % Glucose f.c., 100 mg Carbenicillin f.c.) wurden mit je einer der gewachsenen Kolonien über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur in 500 ml supplementiertem LB-Medium 1:100 verdünnt und bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,4 bis 0,6 mit 0,3 mM f.c. IPTG induziert.

### 3.1.3 Nämlichkeitsüberprüfung der zur Verfügung gestellten Klone

Die transformierten *E.coli*-Bakterien, die das Fusionsprotein aus den C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimin Subtyps  $\alpha$  bzw.  $\beta$  und dem Maltosebindenden Protein exprimieren, wurden freundlicherweise von Dr. G. Frankel, Imperial College, London, zur Verfügung gestellt. Nach schriftlicher Mitteilung von Gad Frankel war die Klonierungsstrategie die folgende: Die 840 bp, die für die C-terminalen 280 Aminosäuren der Intimine von einem den Intiminsubtyp  $\alpha$  exprimierenden *E. coli*-Stamm des Serotyps O127ab:H6 (geführt als pHIT-IV-26) und einem den Intiminsubtyp  $\beta$  exprimierenden *E. coli*-Stamm des Serotyps O114:H2 (geführt als pHIT-IV-27) kodieren, wurden gerichtet in den Vektor pMALc2 (Fa. NEB) kloniert und in kompetent gemachte *E. coli* K 12 TG1-Zellen überführt. Als Selektionsmarker dieses Vektors dient Ampicillin, als Promotorinduktor IPTG. Zur Überprüfung der Nämlichkeit der erhaltenen Klone wurden im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere sowohl die Plasmide aus den transformierten *E. coli* präpariert als auch PCR-Reaktionen durchgeführt. Zunächst erfolgte die Präparation der Plasmide gemäß dem Protokoll der Firma Qiagen zu dem Testkit "Qiagen Plasmid Midikit" und den Angaben zu den sog. *Low Copy* Plasmiden. Die Sequenzierung der präparierten DNS erfolgte mit den Primern pMAL 1 und pMAL 2 (jeweils außerhalb des Inserts liegend) im Institut für Mikro- und Molekularbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Kröger (s. S. 41). Danach schlossen sich PCR-Reaktionen an, um mit neu generierten Primern gemäß der Methode des Primerwalkings die Inserts komplett sequenzieren zu können. Dafür wurden die in Glycerinkulturen bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten Organismen auf einer LB-Platte mit 100 mg/ml Carbenicillin f.c. ausgestrichen. Drei Kolonien wurden dann in 5 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Carbenicillin f.c. und 0,2 % Glucose überführt und über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm im Inkubator geschüttelt. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  der gut resuspendierten Übernachtskultur mit 100  $\mu\text{l}$  *A. bidest.* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min gekocht. Mittels insertspezifischer Primer (entsprechend pMAL 3 & 4 für das Fusionsprotein mit dem Intiminsubtyp  $\alpha$  bzw. pMAL 5 & 6 für Subtyp  $\beta$ ) erfolgte dann die Durchführung der Sequenzierungsreaktionen durch den Sequenzierungsdienst des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Gießen.

Der Mastermix für die PCR-Reaktionen setzte sich aus den folgenden Reagenzien zusammen:

**Reagenzien zur Tfl-PCR mit dem Ziel der Sequenzierung**

Reagenz	Stamm-Konz.	Gebrauchskonz.	Menge pro 1 x Ansatz
<i>A. bidest.</i>	-	-	13,25 µl
Tfl-Puffer	20 x	1 x	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1,5 µl
Primer pMAL 1 resp. pMAL 3 resp. pMAL 5 (Forward)	20 µM	1 µM	1,25 µl
Primer pMAL 2 resp. pMAL 4 resp. pMAL 6 (Reverse)	20 µM	1 µM	1,25 µl
dNTP-Mischung	Je 4 mM	Je 200 µM	1,25 µl
Tfl-Polymerase	1,0 U/µl	0,25 U/ml	0,25 µl

Den 20 µl Mastermix pro Ansatz wurden je 5 µl des Ganzzelllysates (vgl. Kap. 3.1.4.2) in einem Reaktionsgefäß für die PCR zugesetzt. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und dann in den vorgeheizten Thermocycler (DNA Thermal Cycler, Fa. Perkin Elmer) gestellt. Die Proben wurden anschließend mit je einem Tropfen Mineralöl bedeckt.

Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

94 °C	5 min	}	30 x
94 °C	30 sec		
55 °C			
72 °C	1 min 30 sec		
72 °C	5 min		
4 °C	∞		

**Zur Nämlichkeitsüberprüfung der MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$  bzw. - $\beta$  exprimierenden, rekombinanten Bakterienstämme eingesetzte Primer**

<b>Primer</b>	<b>Basenfolge 5'→3'</b>
pMAL 1 (forward)	GAC GCG CAG ACT AAT TCG AGC
pMAL 2 (reverse)	GCC TCT TCG CTA TTA CGC CAG
pMAL 3 (forward)	CCT GAA GTT GAA TTT TTT AC
pMAL 4 (reverse)	ATC AGA CTA TTA GGT GTT
pMAL 5 (forward)	GGG GGC AAT GGA AAA TAC AC
pMAL 6 (reverse)	TCC ACA GCA ATT ACA ATA

Die Proben wurden dann mit 4,0  $\mu$ l 6 x Ladepuffer auf ein 1,5 %iges Agarosegel mit 1,5 % Ethidiumbromid (0,1  $\mu$ g/ml) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 x Tris-Acetat-EDTA (TAE), als Größenstandards dienten der Gene Ruler 100 bp (Fa. MBI Fermentas) und Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III (MBI Fermentas). Die Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mittels der Software LASERGENE<sup>®</sup>, DNASTAR Ltd. Das Zusammensetzen der Einzelsequenzen geschah mit Seqman II, die Analyse mittels Edit Seq, Map Draw und Gene Quest. Die vergleichenden Datenbankanalysen wurden mit den BLAST-Programmen des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) vorgenommen.

### 3.1.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1.4.1 **Anzucht der rekombinanten *E. coli*-Stämme als Vorbereitung zur Proteingewinnung**

Die rekombinant hergestellten Organismen dienen dem Zweck, Fusionsproteine zu gewinnen, die zum einen aus dem Maltose bindenden Protein (MBP) und zum anderen aus den jeweiligen C-terminalen 280 Aminosäuren der ausgewählten Intiminsubtypen bestehen. In dem verwendeten Vektor pMALc2 (Fa. NEB) ist das für MBP-kodierende *malE*-Gen enthalten. Das Arbeiten mit MBP-Fusionsproteinen zur vereinfachten Aufreinigung der Produkte ist eine praktikable und bezüglich der Arbeiten mit Intiminen häufig durchgeführte Methode. Um die Expression des Produktes der eingeschleusten DNS zu erzielen, wurden die Bakterien aus den Glycerin-stabilisierten Kulturen zunächst auf LB-Carbenicillinplatten ausgestrichen, diese über Nacht bei 37 °C inkubiert und je eine Kolonie dieser Platte in ein Glasröhrchen mit 5 ml LB-Medium supplementiert mit 0,2 % Glucose f.c. und 100 µg/ml Carbenicillin f.c. transferiert. Dieses wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Vorkultur wurde 1 : 100 in 500 ml LB-Medium mit 0,2 % Glucose f.c. und 100 µg/ml Carbenicillin f.c. verdünnt. Diese Suspension wurde dann in zwei 1 l-Flaschen aufgeteilt (entsprechend jeweils 250 ml). Die Deckel wurden angedreht, so dass ein Gasaustausch möglich war. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,6 wurde die Genexpression mit 0,3 mM IPTG induziert und die Suspension 12 h bei RT und 180 rpm geschüttelt. Zum Zeitpunkt „0 h“ und „12 h“ wurden Proben zur Kontrolle der Expression genommen und bis zum Auftrag auf der SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren. Die Anzucht des transformierten *E. coli*, der nur den leeren Vektor ohne Insert enthielt und nur den Maltose-bindenden Teil des Proteins exprimiert (pHIT-IV-29), wurde ebenso durchgeführt. Diese Methode der Präparation von Fusionsproteinen wurde durch Optimierung ermittelt (vgl. Kap. 3.2.3 des Ergebnisteils).

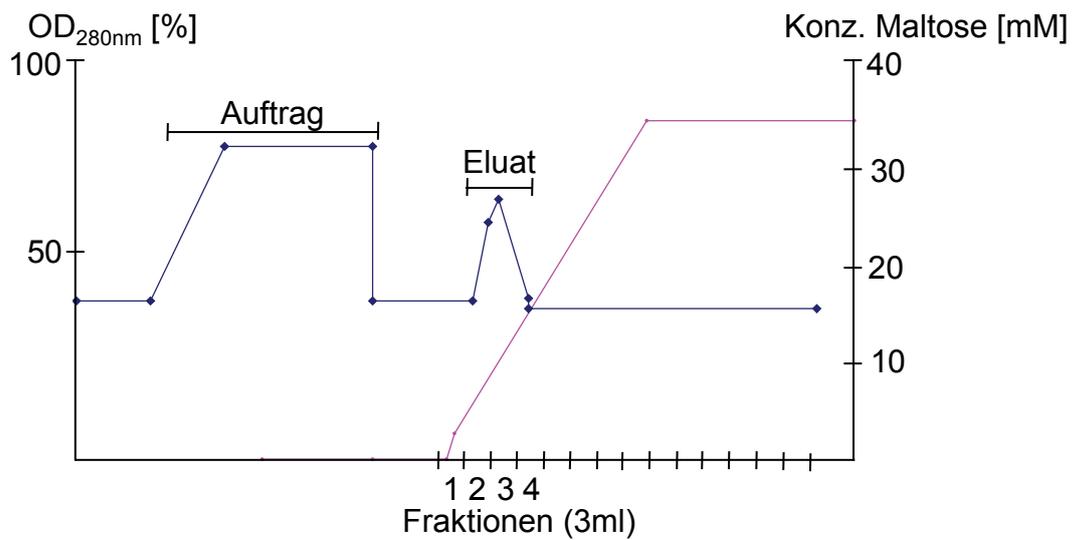
#### 3.1.4.2 **Präparation von Zellysat**

Die transformierten *E. coli*-Bakterien (Ausgangsvolumen der Kultur 500 ml) wurden nach der Induktion durch Zentrifugation (30 min, 2661 x g, 4°C;

Zentrifuge RC5B, Fa. Sorvall® Rotor SS34) gewonnen, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 30 ml sterilfiltriertem, entgastem Laufpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels French® Pressure Cell (Fa. SLM-Aminco, Rochester, NY, USA) bei 20.000 bar und einer Flussrate von ca. 3 ml/min. Die Proben wurden dann zentrifugiert (60 min bei 2500 x g und 4 °C, Zentrifuge Eppendorf 5804R) und der Überstand ultrazentrifugiert (150 min, 100.000 x g, 4 °C, Ultrazentrifuge L8-55, Rotor Ti 45, Fa. Beckman, München). Der Überstand wurde gewonnen (ca. 25 ml) und auf zwei 50 ml Röhrchen (Fa. Greiner) aufgeteilt. Das Volumen wurde mit Laufpuffer auf je 50 ml aufgefüllt („Rohprotein“) und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### **3.1.4.3 Affinitätschromatographie**

Die Aufreinigung des Rohproteins erfolgte mittels FPLC®-Anlage. Die zu diesem Zweck verwendete Amylosesäule (Fa. NEB) wurde mit dem 3-fachen an Säulenvolumen mit Laufpuffer äquilibriert und anschließend mit dem Rohprotein unter Verwendung einer Superloop-Probenauftragsschleife (Fa. Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala Schweden) beladen. Die Säule wurde dann mit Laufpuffer gespült, bis die OD<sub>280nm</sub> des Durchflusses 0 erreichte. Die Elution der gebundenen Fusionsproteine erfolgte durch eine kontinuierliche Zumischung des maltosehaltigen Elutionspuffers, dessen Anteil in drei Stufen von 0 % über 10 % zu 40 % auf 70 % des Zuflusses stufenweise erhöht wurde. Das Eluat wurde in 3 ml-Fractionen gesammelt. Die Zielfractionen wurden gepoolt und in einen vorbereiteten Dialyseschlauch gefüllt (Visking Dialysis Tubing 20/32, Fa. Serva; vor Verwendung jeweils 20 min gekocht in 0,1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA und *A. bidest.*). Es wurde über Nacht bei leichtem Rühren gegen das 200-fache Volumen des Eluates mit 0,89 % NaCl dialysiert. In Abb. 3 ist der Verlauf einer Aufreinigung grafisch dargestellt.



**Abb. 3: Grafische Darstellung der Aufreinigung einer Probe in der FPLC-Anlage.** Die durchgehende Linie zeigt die Steigerung des Maltosegehalts im Elutionspuffer, durch den die Elution induziert wird. Die proteinhaltigen Fraktionen (2-4, vgl. Abb. 14, S. 73) wurden gepoolt und weiter verwendet.

#### **3.1.4.4 Entfernung von Endotoxin und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Reduzierung verbliebenen Endotoxins erfolgte durch Passage über eine Detoxigel<sup>®</sup>-Säule (Fa. Pierce). Nach Sterilfiltration über einen Millex<sup>®</sup>-GV-Filter (0,2 µm Porenweite, Fa. Millipore) wurde die Proteinkonzentrationen mit dem BCA-Protein-Assay<sup>®</sup> der Firma Pierce nach Herstellerangaben bestimmt. Es wurde im Dreifachansatz gemessen. Anschließend wurden die Proteine aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **3.1.4.5 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE wurde nach der von LAEMMLI (1970) beschriebenen Methode angewendet [72]. Die SDS-PAGE in 4 %-igen Sammelgelen und 12,5 %-igen Trenngelen erfolgte unter reduzierenden Bedingungen in einer Vertikalelektrophorese-Kammer Modell Minigel-Twin Typ G42 (Fa. Biometra GmbH, Göttingen). Die Trenngele hatten eine Größe von 8,5 x 6,5 cm und eine Dicke von 1 mm. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit Proteinprobenpuffer gemischt, 5 min bei 100°C aufgeköcht und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V gestartet. Nach Eintritt der Farbstofffront in das Trenngel erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 120 V über 2 h (Netzgerät: Fa. Bio-Rad GmbH, München). Als Molekulargewichtsmarker kamen der SeaBlue<sup>®</sup> Plus 2 Pre-Stained Standard (Fa. Invitrogen) bzw. der Prestained SDS-PAGE Standards Low Range (Fa. Biorad) zum Einsatz. Die Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteinfractionen erfolgte mit einer Coomassie-Färbung. Dazu wurde das Trenngel in Färbelösung gefärbt und abschließend nicht proteingebundener Farbstoff durch Entfärben in 7 %-iger Essigsäure entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf Filterpapier Gel-Blotting-Papier (Fa. Schleicher & Schuell) aufgezogen und unter Vakuum für 2 h bei 80°C in einem Gelrockner Modell "Gel Dryer 543" (Fa. Bio-Rad) getrocknet.

**Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE**

<b>Stammlösungen</b>	<b>Trenngel 12,5%</b>	<b>Sammelgel 4,5%</b>
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	2500 µl	
Sammelgelpuffer (1 M Tris-HCl, pH 6,8)		250 µl
Akrylamid:N,N'-Methylen-bis-Akrylamid	5000 µl (50:1,5)	250 µl (30:0,8)
SDS (20%)	62,5 µl	12,5 µl
Harnstoff (8 M)	3750 µl	1500 µl
<i>A. bidest.</i>	890 µl	450 µl
Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)	60 µl	75 µl
TEMED	10 µl	2,5 µl

**3.1.4.6 Immunoblot**

**Proteintransfer.** Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. Kap. 3.1.4.5) und unter Verwendung des Semi-Dry-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran (Typ Protran® BA 85, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Dazu wurden 18 Filterpapiere (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) und eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Auf die untere Graphit-Anode einer Elektroblokkammer (Fa. Pharmacia, LKB Biochrom Ltd., Cambridge) wurden sechs in Anodenpuffer I und drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere gelegt. Dann wurden die in 1 x PBS getränkte Nitrozellulose-Membran, das kurz in Anodenpuffer II äquilibrierte SDS-PAGE-Gel und die neun in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere darauf aufgeschichtet. Nach Einlegen der oberen Graphit-Kathode erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel für 90 min. Im Anschluß an das Blotten wurde der Erfolg des Transfers durch Coomassiefärbung des Gels überprüft. Die Membran wurde bei 4 °C in 1 x PBS aufbewahrt.

**Detektion der Proteine.** Nach dem Blocken mit 20 ml 1 % BSA in PBS-Tween (1 h, 37°C) wurde die Membran dreimal mit 20 ml PBS-Tween (je 5 min, RT) gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Anti-MBP-Antikörper bzw. dem Anti-MBP-Antiserum (vgl. S. 47) erfolgte für 1 h bei 37°C (Verdünnung 1:1000, 20 ml, verdünnt in PBS-Tween); dreimaliges Waschen mit 1 x PBS und danach Zugabe des Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugates

(Fa. Amersham) waren die weiteren Schritte (1:1000, 20 ml, verdünnt in PBS-Tween, 1 h, 37°C). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Dann wurde sie in 2 ml Chloronaphtol (0,12 g in 40ml Methanol) mit 8 ml 1 x PBS und 6µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben und die Enzymreaktion nach deutlichem Sichtbarwerden der Banden durch Waschen mit *A. bidest.* gestoppt. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken in Kunststoffschalen. Zur Sichtbarmachung der geblotteten Proben wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Anti-MBP-Antikörper (Maus), Fa. NEB	(1 : 1000),
Anti-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase, Fa. Amersham	(1 : 1000),
Anti-MBP-Antiserum (Rabbit), Fa. NEB	(1 : 2000) ,
Anti-Kaninchen biotinyliertes Konjugat, Fa. Amersham	(1 : 1000),
5B8 Hybridoma-Überstand (Für die Positivkontrolle)	(10 ml).

### **3.1.5 Präparation und Kultivierung boviner Lymphozyten**

#### **3.1.5.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Vollblut von Rindern wurde durch Punktion der Vena jugularis gewonnen und sofort mit 3,8 %iger Na-Zitrat-Lösung zur Gerinnungshemmung gemischt. Je 20 ml Zitratblut wurden mit 17 ml 1 x PBS-EDTA-Puffer vermischt und vorsichtig über 12 ml Ficoll-Paque<sup>®</sup> in einem 50 ml-Röhrchen geschichtet. Je nach Bedarf wurden auf diese Weise pro Tier mehrere Röhrchen befüllt und im Anschluß 45 min bei 800 x g mit ungebremsten Auslauf zentrifugiert (Zentrifuge Heraeus Sepatech Omnifuge 2.ORS). Die PBMC-enhaltende Interphase und die Ficollphase wurden abpipettiert, in neuen Röhrchen mit dem 4- bis 5-fachen Volumen (bis zur 45 ml-Marke) an 1 x PBS-EDTA gut gemischt und erneut zentrifugiert (249 x g, 8 min). Nach dem Dekantieren der Überstände wurden alle Zellen eines Tieres mit 10-20 ml Erythrozyten-Lyse-Reagenz versetzt und 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit dem gleichen Volumen an 1 x PBS-EDTA abgeschwächt. Nach erneutem Zentrifugieren (202 x g, 7 min) folgten je ein Waschschrift mit 1 x PBS-EDTA-Puffer und mit 1 x PBS. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml RPMI-Medium (RPMI 1640 W 2,0g/l NaHCO<sub>3</sub> W 0,53g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin, Fa. Biochrom) aufgenommen.

Es folgte die Auszählung eines Aliquots der Zellsuspension nach Anfärbung mit Trypanblau-Lösung in einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand).

Weiterverwendet wurden nur Präparationen mit mehr als 95 % lebenden (ungefärbten) Zellen.

### **3.1.5.2      *Intraepitheliale Lymphozyten aus dem Ileum (iIEL)***

Auf dem Schlachthof Gießen wurden ca. 50 cm lange Abschnitte des Ileums von normal geschlachteten, mindestens drei Jahre alten Rindern der Rasse "Deutsche Rotbunte" bzw. "Deutsche Schwarzbunte" entnommen. Der Darm wurde der Länge nach eröffnet, unter fließendem Wasser gut abgespült und in 500 ml 4 °C kaltem 1 x PBS in das Labor transportiert. Dort wurde das Darmstück in vorgewärmtem PBS, das DTT in einer Konzentration von 1 mM enthielt, für 25 min im Schüttelwasserbad bei 37°C und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Darmstück in ca. 0,5 cm breite Streifen zerschnitten. Die Streifen wurden auf vier 50 ml-Röhrchen aufgeteilt und in je 35 ml vorgewärmtem "PBS-AB-EDTA" bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 20 min inkubiert. Dann wurde jedes Röhrchen exakt 2 min gevortext. Es folgte eine Filtration über sterile Nylonwolle, die mit 10-15 ml "PBS-AB-EDTA" befeuchtet und in den Kolben einer sterilen Einmalspritze verbracht war. Der Durchfluß wurde bei 250 x g 8 min bei RT zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen von je zwei Röhrchen wurden in 25 ml 40%igem Percoll entsprechend einer Dichte von  $d=1,050$  g/ml aufgenommen und auf 10 ml 67 % Percoll entsprechend einer Dichte von  $d=1,0816$  g/ml aufgeschichtet. Es folgte ein 20 minütiger Zentrifugationsschritt bei 652 x g und 20 °C. Die Beschleunigung der Zentrifuge betrug Stufe drei (von neun möglichen), die Verzögerung Stufe eins (von neun möglichen). Während dieser Dichtegradientenzentrifugation bildeten sich drei zellhaltige Schichten aus. Die Zellen aus dem Bereich zwischen den zwei Percollkonzentrationen wurden in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt und das Volumen mit PBS-EDTA-Puffer auf 50 ml ergänzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 202 x g und 7 min mit anschließendem Dekantieren des Überstandes. Nach einem letzten Waschschrift mit -je nach Pelletgröße- 10-25 ml PBS-EDTA (202 x g, 7 min) wurden die Zellen in IEL-Medium aufgenommen und in einer Zählkammer nach Neubauer die Zellzahl bestimmt.

### 3.1.6 Nachweis der Intiminbindung an HeLa-Zellen und bovine Leukozyten

#### 3.1.6.1 *Mikroskopie*

Um zu untersuchen, ob die Fusionsproteine an sogenannte Hirs (wirtszelleigene Rezeptoren) binden, wurden Versuche mit HeLa-Zellen (von PD Dr. Ebel, München) durchgeführt. HeLa-Zellen wurden auf runden Deckgläschen auf den Böden einer 24 Lochbodenplatte bis zur Subkonfluenz steril anwachsen gelassen. Die Deckgläschen wurden aus der Anzucht- in eine Färbepalette transferiert und je 300 µl RPMI 1640 zu jedem Deckgläschen zugegeben. Das RPMI wurde abgesaugt und zwei Waschschriffe mit je 500 µl PBS durchgeführt. Dann wurden je 300 µl Proteinlösung mit 11 µg Protein in RPMI 1640-Medium absolut, 2,5 mM Maltose und 2 % FCS (bzw. 300 µl PBS für die Konjugatkontrollen) in jede Vertiefung pipettiert. Die 60-minütige Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Dann wurde 2 x mit je 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit je 500 µl 2%igem Paraformaldehyd in PBS 30 min bei RT fixiert, 2 x mit je 500 µl PBS gespült und die Zellen mit 0,005 % Digitonin in 500 µl 1 x PBS exakt 10 min permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Dabei kamen folgende Antikörper mit einem Arbeitsvolumen von je 50 µl und einer Inkubationsdauer von 1 h bei Raumtemperatur im Dunklen zum Einsatz:

<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
Anti-MBP monoclonal Antibody Fa. NEB 1 : 100	αms IgG (H+L) FITC, Fa. Dianova 1 : 100
Anti-MBP-Antiserum (Rabbit), Fa. NEB 1 : 200	αrabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488, Fa. Molecular Probes 1 : 250

Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte (s.o.). Dann wurden die Deckgläschen in einem zweiten Färbeschritt unter denselben Bedingungen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (s. S. 49), 2 x in je 500 µl PBS gewaschen auf einen Objektträger transferiert und mit 50 µl Mowiol-Mounting-Medium bedeckt. Ein 18 x 18 mm großes Deckglas wurde luftblasenfrei auf das zellbewachsene Deckgläschen gelegt. Zum Trocknen wurden die Objektträger über Nacht dunkel bei 4 °C gelagert. Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit einem Filter bei 514 nm im Fluoreszenzmikroskop (Typ DMRB Fa. Leica).

Um zu überprüfen, ob die Bindung des Intimins vom Vorhandensein des Tirs abhängig ist, wurden die Zellen mit Übernachtskulturen von Intimin  $\beta$ -exprimierenden *E. coli*-Stamm RDEC1 (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Gießen, Tagebuch Nr. x-378/01) bzw. Intimin  $\gamma$ -exprimierenden *E. coli*-Stamm EDL933 (ATCC Nr. 43895) inkubiert. Die Keime wurden dafür auf Blutagarplatten ohne weitere Zusätze angezüchtet, jeweils eine Kolonie von den Platten in 3 ml steriles Peptonwasser überführt und über Nacht bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Die Deckgläschen wurden 24 h vor Versuchsbeginn in antibiotikafreies RPMI-Medium umgesetzt, um ein Abtöten der Tir-injizierenden Bakterien zu vermeiden. Die bewachsenen Deckgläschen wurden aus der Anzucht- in eine Färbplatte transferiert und je 300 µl RPMI 1640 pro Vertiefung zugegeben. Nach Abnehmen des RPMI 1640 wurden je 25 µl der gut resuspendierten Übernachtskultur auf die Deckgläschen gegeben und diese 3 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen 3 x mit je 750 µl 1 x PBS gewaschen und mit je 0,5 ml RPMI eine weitere Stunde bei RT stehengelassen, um die Verankerung der Tirs in den Zellen sicherzustellen. Die anschließende Detektion der Intiminbindung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Auch die Bindung der Intimine an bovine Gesamtleukozyten wurde untersucht. Dafür wurden 2 ml ungerinnbar gemachtes Rinderblut (16 ml, versetzt mit 4 ml Zitrat 3,8 %) mit 18 ml *A. bidest.* 50 sec in einem sterilen 50 ml Röhrchen geschwenkt, um eine osmotische Lyse der Erythrozyten zu bewirken. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 10 x PBS-EDTA abgestoppt. Es folgte eine 7 minütige Zentrifugation bei 200 x g und RT. Das Pellet wurde in 10 ml

1 x PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 2 ml 1 x PBS aufgenommen und die vorhandenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-V-Form-Mikrotiterplatte (Abk. im folgenden: MTP, Fa. Nunc) eingesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (7 min, 150 x g, RT). Die Platte wurde ausgeschlagen und 150 µl Proteinlösung mit 11 µg Protein, 2,5 mM Maltose f.c. und 2 % FCS in RPMI-Medium in jede Vertiefung gegeben. Dann wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugations- und dann ein Waschschrift (dabei wurden die Zellen in 100 µl 1 x PBS resuspendiert und dann wie oben angegeben zentrifugiert). Die sich anschließenden Schritte der Fixation, Permeabilisation und Inkubation mit Antikörpern entsprachen der für die HeLa-Zellen beschriebenen Vorgehensweise mit der Ausnahme, dass die Flüssigkeiten nicht abpipettiert, sondern jeweils durch Waschschrift in der Zentrifuge entfernt wurden. Außerdem wurde der letzte Waschschrift mit 150 µl 1 x PBS-EDTA durchgeführt, um eine vollständige Ablösung der Zellen aus der V-Boden-MTP zu gewährleisten. Dann wurde der Inhalt je einer Vertiefung mit einem Endvolumen von 200 µl in eine Zytokammer (Fa. Hettich) gegeben, die mit einem vorgefrosten Objektträger bestückt war, und 5 min bei 560 x g und RT zentrifugiert. Die Präparate trockneten zunächst, wurden dann mit je 50 µl Mowiol Mounting Medium bedeckt, über Nacht im Kühlschrank belassen und am nächsten Tag mit den gleichen Einstellungen wie für die oben beschriebenen Präparate im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

### **3.1.6.2 Zytometrie**

Bindungsstudien mit den Proteinen wurden an bovinen PBMC sowie an bovinen intraepithelialen Lymphozyten *ex vivo* durchgeführt. Es wurden je  $2,5 \times 10^5$  PBMC bzw. IEL pro Vertiefung einer 96-MTP mit V-förmigen Vertiefungen eingesetzt. Die Zellen wurden analog zu den Proben für die Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Kap. 3.1.6.1) vorbereitet. Dabei wurden die Zellen parallel nativ belassen bzw. fixiert und permeabilisiert. Dies geschah, um zu überprüfen, ob die Antikörper bei erleichterter Zugänglichkeit zu den Proteinen durch die Permeabilisation binden konnten. Die Zellen wurden zunächst 30 min bei 4 °C auf Eis mit den Proteinen inkubiert, dann 7 min bei 150 x g und 4 °C zentrifugiert und die Platten dann ausgeschlagen, um die Proteinrückstände zu

entfernen. Danach wurden die Zellen aller Ansätze in je 150 µl 1 x PBS resuspendiert und wie beschrieben zentrifugiert. Die eine Hälfte aller Proben wurde dann 30 min mit 2%igem Paraformaldehyd (in PBS) inkubiert (nach gründlichem Resuspendieren), das Paraformaldehyd abzentrifugiert, die Zellen einem Waschschrift unterzogen (entsprechend oben beschriebener Resuspendierung in 1 x PBS und anschließender Zentrifugation) und exakt 10 min in 0,005 %igem Digitonin (in PBS) inkubiert. Anschließend wurden sowohl die nun fixierten und permeabilisierten Zellen als auch die nativ belassenen Zellen in 50 µl der Antikörperlösung mit dem Primärantikörper (in PBS) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgten ein Zentrifugations- und ein Waschschrift. Die Zellen wurden danach in je 50 µl Volumen mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (in PBS) 20 min abgedunkelt auf Eis nach vorhergehendem Resuspendieren inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugations- und ein Waschschrift. Die Zellen wurden dann in je 50 µl PBS aufgenommen und in Röhrcchen für die Zytometrie überführt, in die schon je 300 µl PBS vorgelegt waren. Antikörper und Proteine wurden in Konzentration und Arbeitsvolumen entsprechend der Fluoreszenzmikroskopie (Kap. 3.1.6.1) eingesetzt.

### **3.1.7 Test zur Quantifizierung der Zellproliferation boviner Lymphozyten**

Die für die nach vier Inkubationstagen folgende Durchflußzytometrie vorgesehenen bovinen PBMC wurden mit dem Farbstoff 5-, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE) gefärbt. Dies ist ein fluoreszierender Farbstoff mit zwei Acetatseitenketten, die ihm ein hohes Membranpermeabilisationsvermögen verleihen. Als Negativkontrolle wurden  $1,5 \times 10^6$  in RPMI aufgenommene Zellen abzentrifugiert und in PBMC-Medium (s.u.) aufgenommen. Diese wurden bis zur Ausplattierung unter sterilen Kautelen bei RT aufbewahrt. Parallel dazu wurden  $4 \times 10^7$  Zellen in 400 µl RPMI (Fa. Biochrom) in ein 50 ml-Röhrcchen überführt. Um eine gleichmäßige Anfärbung der Zellen zu gewährleisten, wurden 400 µl gebrauchsfertiger CFSE-Lösung (1 : 500 entsprechend 7,5 µM) blitzartig unter Schwenken des Röhrcchens zugegeben. Das Röhrcchen wurde rasch verschlossen und kurz

gevortext. Anschließend wurde das Röhrchen mit den Zellen exakt 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 16 ml PBMC-Medium zugegeben. Danach folgten zwei Waschschrte mit jeweils 16 ml PBMC-Medium (202 x g, 7 min RT). Nach Dekantieren der Überstände wurden die Zellen in 4 ml PBMC-Medium aufgenommen und erneut in einer Tot-Lebend-Färbung gezählt. Es wurden je  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 50 µl PBMC-Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, Fa. PAA) und 2,5 µg/ml Gentamicin pro Probe in jede Vertiefung einer 96-U-Form-MTP ausplattiert. In der Platte lagen schließlich die folgenden Ansätze vor:

Bezeichnung der Probe	ConA-Zusatz	Zusatz von MBP bzw. MBP-Int <sub>280</sub>	CFSE-gefärbt
"Ungefärbt unstimuliert"	---	---	-
"Gefärbt unstimuliert"	---	---	+
"Gefärbt stimuliert"	2,0 µg/ml	---	+
"Gefärbt stimuliert"	2,0 µg/ml	5,0 µg/ml f.c. Protein	+
"Gefärbt stimuliert"	2,0 µg/ml	1,667 µg/ml f.c. Protein	+
"Gefärbt stimuliert"	2,0 µg/ml	0,555 µg/ml f.c. Protein	+
"Gefärbt stimuliert"	2,0 µg/ml	0,185 µg/ml f.c. Protein	+

Für die Einrichtung der Felder "ungefärbt und unstimuliert", "gefärbt und stimuliert" und "unstimuliert und gefärbt" für das Meßprotokoll des Zytometers dienten die oben angegebenen Ansätze. Die Platte wurde vier Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und Wasserdampfsättigung belassen und die Proben dann im Zytometer gemessen. Für die Zytometrie wurden je 100 µl PBS-PI mit 2 µg/ml Propidiumjodid f.c. pro Probe in ein Zytometerröhrchen vorgelegt und anschließend die Probe aus der 96-U-Lochplatte überführt. Es wurden 5000 Ereignisse aus jeder Probe gemessen und anhand ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) untersucht. Die Region „Vitale“ des Zytometerprotokolls (Feld "R1" in Abb. 4A) setzte sich aus der Gesamtheit der „Nonblasten“ (Feld "R2" Abb. 4A) und „Blasten“ (Feld "R3" in Abb. 4A) zusammen. Die Proliferation der Zellen wurde innerhalb des Fensters "Vitale" beurteilt. Die Unterteilung der Zellen erfolgte in Generationen. Dabei entspricht eine Generation genau den Zellen, die aus den zu dem Zeitpunkt der Betrachtung vorhandenen Zellen durch Teilung in rechnerisch

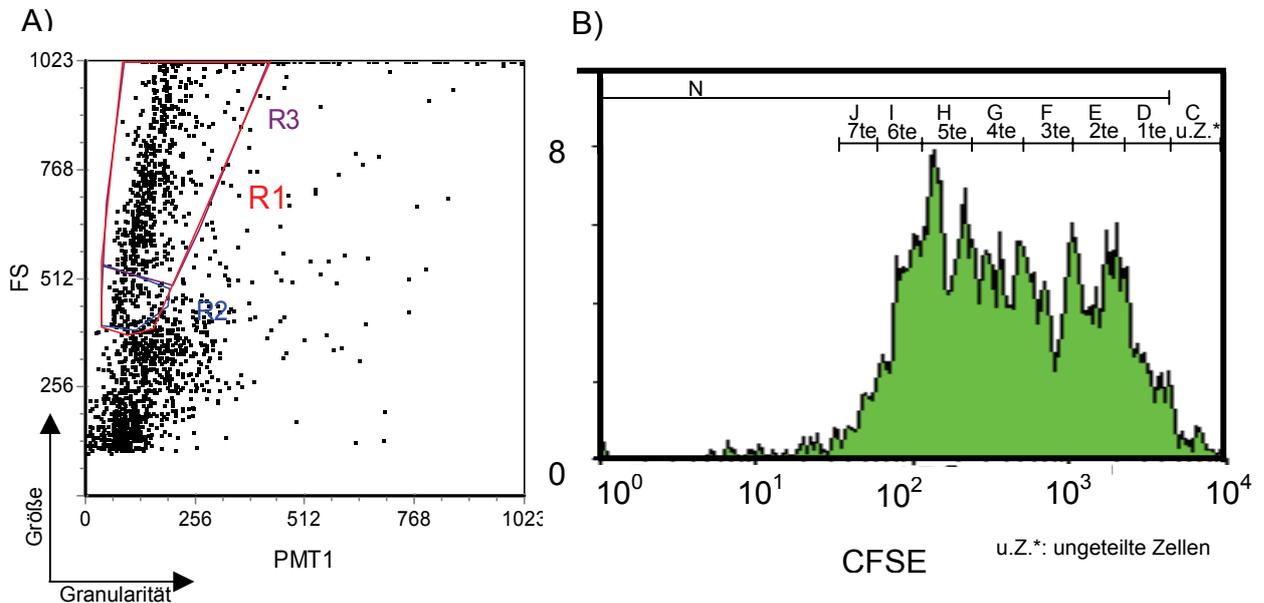
zwei Tochterzellen (unter gleichmäßiger Aufteilung des Farbstoff) pro einer Zelle entstanden sind.

Das Feld "C" repräsentierte die ungeteilten, gefärbten, unstimulierten Zellen (Abb. 4B). Im Feld D befinden sich die Zellen, die sich bereits einmal geteilt (= "1") haben. Analog dazu sind in den Feldern E (=2), F (=3), G (=4), H (=5), I (=6) und J (=7) die Zellen, die sich in der zweiten bis siebten Teilungsgeneration befinden. Das Feld N repräsentierte alle Zellen, die sich geteilt hatten (Abb. 4B). Es deckte also die Gesamtheit der lebenden Zellen ab, die in Feld C (nicht in Teilung gegangene Zellen) nicht enthalten waren. Die Einteilung in Generationen erfolgte nach folgender Berechnung [98]:

Zunächst wurden die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten („Fluoreszenzmittelwert“) der gefärbten, unstimulierten sowie der ungefärbten, unstimulierten Zellen anhand der entsprechenden Proben ermittelt. Der Fluoreszenzmittelwert der ungefärbten, unstimulierten Zellen (entsprechend der Autofluoreszenz der Zellen) wurde von dem der gefärbten, unstimulierten Kontrollzellen (entsprechend der maximal möglichen Fluoreszenz einer Population nicht geteilter Zellen) subtrahiert. Die Differenz („spezifische Fluoreszenzintensität“) wurde zur Basis 10 logarithmiert. Dann wurden die theoretischen Fluoreszenzmittelwerte von durch Teilung hervorgegangenen Tochterpopulationen errechnet. Da diese Mittelwerte immer die Hälfte der Mittelwerte der vorhergehenden Population betragen müssten, wurden  $n \times 0,3$  (mit  $n$  = Anzahl Teilungen der Vorläuferzellen, Progenitoren) von der spezifischen Fluoreszenzintensität subtrahiert. Die Grenzen der jeweiligen Tochterpopulation ergaben sich dann durch Addition und Subtraktion von 0,15 zum Fluoreszenzmittelwert der Tochterpopulation. Nach Entlogarithmierung und Addition des geometrischen Mittelwertes der Autofluoreszenz wurden die so festgelegten Grenzen der Positionierung der Regionen im Histogramm zugrundegelegt und die Anzahl der Zellen einer jeden Tochterpopulation ermittelt. Um die Zahl der Vorläuferzellen, aus denen die Zellen der jeweiligen Tochterpopulation seit Beginn der Kultivierung hervorgegangen waren zu errechnen, wurde die Zahl der Tochterzellen durch  $2^n$  (mit  $n$  = Anzahl der Teilungen) dividiert.

Diese quantitative Analyse der Zellteilung, die die Anzahl der Vorläuferzellen ergab, sollte Aufschluss darüber geben, wieviele Zellen in die Apoptose gingen

und wieviele sich -gemessen an der verbleibenden Menge des CFSE-Farbstoffes in jeder Zelle- teilten.



**Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der Auswertung des CFSE-basierten Proliferationstests.**

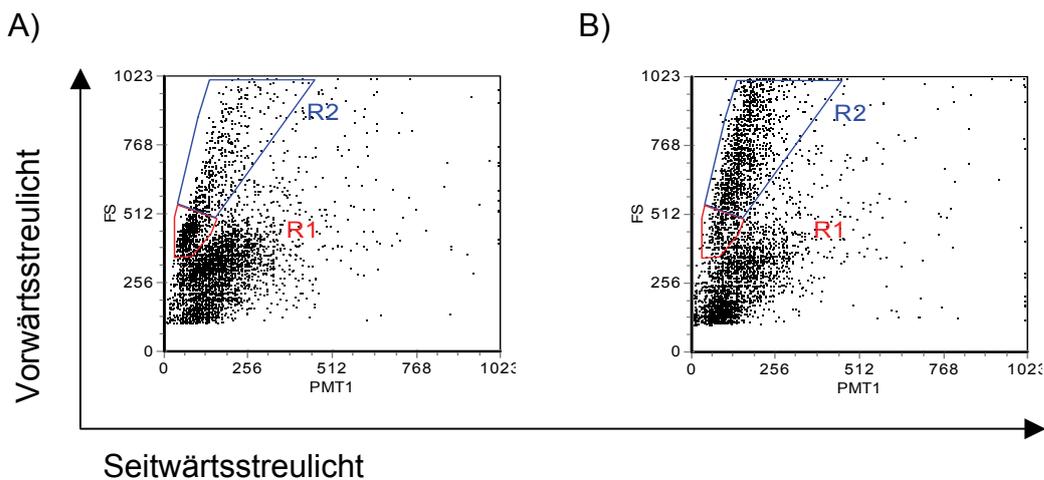
A: Scattergramm. Das Acquisitionsfenster R1 repräsentiert die Gesamtheit der vitalen Zellen, die sich aus den vitalen Nonblasten (R2) und den Blasten (R3) zusammensetzen.

B: Ein-Parameter-Histogramm mit der Darstellung der CFSE-Fluoreszenz der in R1 befindlichen Zellen. Die aus R1 (s. Abb. 4A) errechneten, auf Teilung der Vorläuferzellen unter Abgabe des Farbstoffes beruhenden Generationen proliferierter Zellen sind mit den Buchstaben D bis J bezeichnet. "C" entspricht den zum Zeitpunkt 0 vorhandenen, nicht geteilten Zellen, „N“ repräsentiert alle Zellen, die in Teilung gegangen sind.

### 3.1.8 Quantifizierung der Transformation boviner Lymphozyten zu Blasten

Zusätzlich zum Proliferationsverhalten wurde bei der Analyse der in 3.1.7. beschriebenen Zellen auch die Differenzierung in Blasten und Non-Blasten nach viertägiger Inkubation mit den Fusionsproteinen und Stimulation mit Concavalin A untersucht. Als Blasten werden all die Zellen bezeichnet, die sich durch ein größeres Vorwärtsstreulichtsignal von ruhenden Zellen abgrenzen ließen. Nonblasten sind alle noch lebenden Zellen, bei denen sich keine

Morphologieänderung vollzogen hat. Im Scattergramm (Abb. 5A) sieht man exemplarisch die Verteilung von PBMC, die 96 Stunden ohne Stimulans inkubiert worden waren. Das Feld "R1" repräsentiert die vitalen Non-Blasten, Feld "R2" enthält die vitalen, zu Blasten transformierten Zellen. Die nicht eingegrenzten Zellen waren als subvital zu bewerten und wurden in die Analyse nicht mit einbezogen. In Abb. 5 sieht man vergleichend, daß sich im Bild A) weniger Zellen in "R2" befinden als in dem gleichen Feld im Bild B), da zweitens durch Concavalin A zur Blastenbildung angeregt wurden.



**Abb 5: Scattergramme von unstimulierten (A) und stimulierten (B) bovinen PBMC. R1= vitale Nonblasten, R2= Blasten.**

PMT 1= Seitwärtsstreulicht entsprechend Granularität, Vorwärtsstreulicht= Zellgröße  
 ad A: unstimulierte PBMC nach 96h Inkubation. Vitale Nonblasten repräsentiert durch das Acquisitionsfenster "R1", Blasten durch "R2".

ad B: Con A-stimulierte PBMC nach 96h Inkubation. Hier sind im Vergleich zum linken Scattergramm deutlich mehr Ereignisse in "R2" zu sehen, da mehr PBMC zu Blasten transformiert sind.

### 3.1.9 Quantifizierung der Expression von Zytokingenen in bovinen Lymphozyten

**Inkubation und Rückgewinnung der Zellen.** Es wurden je  $2 \times 10^7$  der frisch präparierten PBMC bzw. IEL mit dem Maltose-bindenden Protein, mit MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$  und MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$  mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  und 2  $\mu\text{g/ml}$  Concavalin A in einem Gesamtvolumen von 9 ml PBMC- bzw. IEL-Medium 4 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde jeder Ansatz auf 2 Vertiefungen einer 6-Lochplatte mit 4,5 ml Inhalt aufgeteilt. Die sich nun anschließenden Schritte

fanden alle auf Eis, mit vorgekühltem 1 x PBS und mit vorgekühlten Zentrifugenrotoren statt. Nach Ablauf der vierstündigen Inkubation wurden die Zellen aus den Vertiefungen durch Resuspendieren entfernt und in Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Zusätzlich wurden die Vertiefungen mit je 5 ml 1 x PBS vorsichtig gespült und mit einem Gummiwischer (Fa. Roth) ausgeschabt, um die Zellen möglichst vollständig zurückzugewinnen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Eppendorf 5804 R-Zentrifuge (5 min bei 4° C und 300 x g). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in je 1 ml 1 x PBS pro  $5 \times 10^6$  Zellen (entsprechend 4 ml für  $2 \times 10^7$  Zellen) aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und anschließend in einem Volumen von 1 ml in vorbeschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 300 x g, 5 min und 4° C. Die Überstände wurden verworfen, die PBS-Reste durch Abtropfen auf einem sauberen Tuch so weit wie möglich entfernt und 600 µl RLT-Puffer ("RNeasy Minikit", Fa. Qiagen) mit 1% β-Mercaptoethanol pro Reaktionsgefäß zugegeben, um das Pellet darin aufzunehmen. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei -70° C.

**Präparation der RNS.** Die Präparation der RNS aus den inkubierten PBMC und IEL erfolgte mittels des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits der Fa. Qiagen, gemäß den Angaben des Herstellers („RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells I“, Version Juni 2001).  $5 \times 10^6$  Zellen wurden dabei jedoch in 600 µl anstatt in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen. Außerdem wurde der optionale Schritt „Appendix D: Optional On-Column DNase Digestion with the RNase-Free DNase Set“ sowie ein optionaler Schritt zur vollständigen Entfernung des ethanolhaltigen Waschpuffers -auch entsprechend Herstelleranleitung- stets durchgeführt. Das bedeutet, dass die Säule mit der zu gewinnenden RNS in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gestellt und zentrifugiert wurde, um Ethanolreste zu entfernen. Zudem folgte ein zweiter DNase-Verdau des Materials nach Eluierung von der Säule zur Entfernung genomischer DNS in einem Volumen von 100 µl, das sich aus 10 µl 10 x DNase-Puffer (Fa. Amersham Biosciences), 2 µl Ribonuclease Inhibitor (80 U, Fa. MBI Fermentas), 20-30 µl DNase I (20-30 U, Fa. Amersham Biosciences), dem Eluat, das die RNA enthielt und DEPC-H<sub>2</sub>O (DEPC-treated Water, Fa. MBI

Fermentas) ad 100 µl zusammensetzte. Die Inaktivierung der DNase I erfolgte anschließend durch Vortexen des Verdau mit 5 µl Laurylsarcosin 0,1 % entsprechend 1/10 des Gesamtvolumens und anschließendem zweiminütigem Inkubieren bei Raumtemperatur. Zur Fällung der RNS (zwecks Volumeneinengung) wurde der Ansatz dann mit 10 µl 3 M Na-Acetat pH 4,6 versetzt, erneut gevortext, abschließend mit dem 2 - 2,5-fachen Volumen an 99 % igem EtOH versetzt und über Nacht bei -70 °C eingefroren. Am Tag darauf erfolgte eine dreißigminütige Zentrifugation der Aliquots bei 12000 x g und 4 °C. Dann schlossen sich die Dekantierung des Überstandes und das zweimalige Waschen der Pellets mit 70 % igem EtOH (5 min bei RT und 8000 x g) an. Flüssigkeitsreste wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und die Pellets solange getrocknet, bis das Ethanol restlos verdunstet war. Die Aufnahme des Pellets erfolgte unter dem Zusatz von 1 µl entsprechend 40 U RNAsin in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Dann folgte das dreimalige Vortexen und Abzentrifugieren, um das Pellet zu lösen. Zur RNS-Mengenbestimmung im Beckman DU 600<sup>®</sup>-Photometer mußten 5 µl der RNS-Lösung mit 95 µl autoklaviertem TE 1:20 verdünnt und bei verschiedenen Wellenlängen (λ 260 nm, λ 280 nm, λ 320 nm) gegen Tris-EDTA-Puffer als Leerwert in einer Ultravette (Fa. Brand) gemessen werden. Der RNS-Gehalt wurde dann nach der folgender Formel errechnet:

$$(OD_{260} - OD_{320}) \times 40 \times \text{Verdünnung} = \text{RNS-Gehalt in ng/}\mu\text{l.}$$

Der Quotient aus λ 260 nm und λ 280 nm diente zur Abschätzung der Reinheit der RNS. Die Qualitätskontrolle der RNS erfolgte mittels eines 1% igen Agarosegels (Abb. 6) mit 0,002 % Ethidiumbromid (beides gelöst in TAE-Puffer). Pro Geltasche wurden 200 ng RNS mit je 1,0 µl 6x Ladepuffer geladen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE. Dann folgte die Transkriptionsreaktion oder die Lagerung bei -20° C.

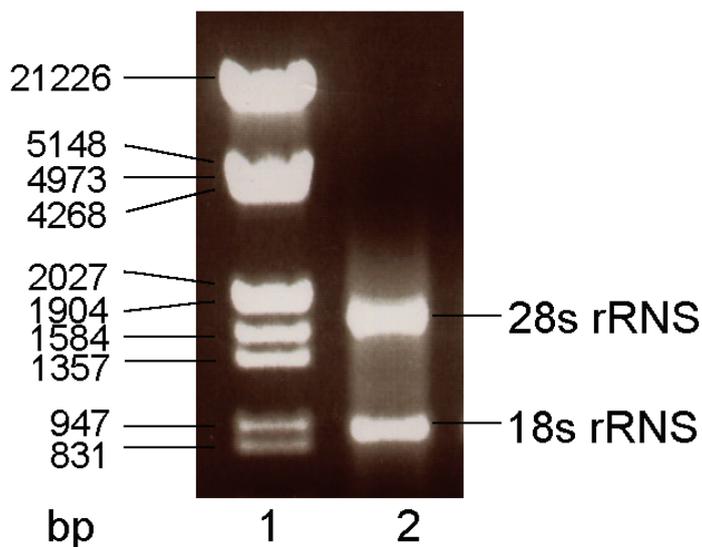
### **Umschreibung der RNS in cDNS.**

Siebenhundertfünfzig Nanogramm RNS in 23 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurden in ein PCR-Gefäß (200 µl, Fa. Nerbe) mit 2 µl Oligo d(T) Primer (2,5 µM f.c.) für die Umschreibereaktion bzw. *A. bidest.* für die Kontrolle auf das Vorhandensein von genomischer DNS 5 Minuten bei 70 °C im Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer, Gene Amp PCR-System 9600) inkubiert. Anschließend wurden die Proben

sofort auf Eis gestellt und 1 µl Wasser für die Molekularbiologie, 8 µl 5 x MMLV-Puffer, 4 µl dNTPMix (2,0 mM f.c.), 1 µl RNAsin (40 U) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U, M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant, Fa. Promega) zugegeben. Für die Kontrolle auf das Vorhandensein genomischer DNS wurde statt der Reversen Transkriptase 1 µl *A. bidest.* zugesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug somit 40 µl. Die Proben wurden alle im Thermocycler (Fa. Perkin-Elmer) bei folgendem Programm behandelt:

40 °C	60 Minuten
94 °C	2 Minuten
4 °C	∞

Die Proben wurden anschließend sofort in die Realtime-PCR eingesetzt oder bei – 20 °C eingefroren.



**Abb.6:**

**1,5 %iges Agarosegel zur Qualitätskontrolle der mRNS**

Spur 1: Größenstandard  
Lambda hind EcoRI

Spur 2: repräsentative Darstellung für RNS, die aus PBMC präpariert wurde. 28s- (obere Bande), 18s-rRNS (untere Bande)

**Überprüfung auf Vorhandensein genomischer DNS.** Zur Überprüfung des DNase-Verdau wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, bei der im Doppelansatz die ohne Reverse Transkriptase behandelten Proben sowie bereits umgeschriebene DNS als Systemkontrolle mit den Primern für das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH eingesetzt wurden. Es wurde ein Mastermix angesetzt, der außer der cDNS alle zur Detektion eines spezifischen Transkriptionsproduktes notwendigen Substanzen enthielt. Zwei Mikroliter der cDNS bzw. 2 µl aus dem Ansatz ohne RT als Negativkontrolle wurden dem folgenden Ansatz zugesetzt:

**Zusammenfassung der im Mastermix pro PCR-Ansatz enthaltenen Substanzen**

Substanz	Verwendetes Volumen (in $\mu\text{l}$ )	Verwendete Menge	Bezugsquelle
<i>A. bidest.</i>	11,6	-	-
10 x Puffer für die Amplitaq Polymerase	2,0		Applied Biosystems
Primer Bo-GAPDH- Taq2 forw (s. S. 61)	1,0	5,0 pmol	MWG Biotech AG
Primer Bo-GAPDH- Taq2 rev (s. S. 61)	1,0	5,0 pmol	MWG Biotech AG
AmpliTaQ Polymerase	0,2	1 U	Applied Biosystems
DNTP	1,0	4 nmol je Nukleotid	Fa. MBI Fermentas
MgCl <sub>2</sub>	1,2	1,5 mM	Fa. PAN

Das gesamte Probenvolumen (20  $\mu\text{l}$ ) wurde gevortext, 10 sec bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zielsequenz im Cycler (Fa. Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 9600) wie folgt amplifiziert:

<u>94 °C</u>	<u>2 min</u>	}	40 x
94 °C	15 sec		
60 °C	30 sec		
<u>72 °C</u>	<u>30 sec</u>		
<u>72 °C</u>	<u>2 min</u>		
4 °C	$\infty$		

Je 20  $\mu\text{l}$  PCR-Probenansatz wurden mit je 2,5  $\mu\text{l}$  10 x Ladepuffer versetzt, gemischt und in eine Tasche eines Agarosegels (3 % in 1 x TAE-Puffer mit 50-100  $\mu\text{g/l}$  Ethidiumbromid) geladen. Als Größenstandard wurde der Gene Ruler™ 100 bp DNA-Ladder, Fa. MBI Fermentas, 1  $\mu\text{l}$ , zusammen mit 1  $\mu\text{l}$  Ladepuffer und 8  $\mu\text{l}$  *A. bidest.* in eine Tasche des Gels zugesetzt.

Als Laufpuffer diente 1 x TAE; die Proben wurden 60 min bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 6).

„**Real-Time-PCR**“. War keine genomische DNS in Form von Banden auf dem Agarosegel sichtbar, wurde die Real-Time-PCR im Taqman®- (Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Alle Proben wurden im Doppelansatz getestet. Die

mRNS für die jeweiligen Gene wurde dabei mit den unten aufgelisteten Primern (Fa. MWG Oligo) quantifiziert. Es wurde stets auf Eis gearbeitet.

#### Für den Taqman® -Reaktion verwendete Primer

Primer	Basenfolge 5` bis 3` Ende	erwartete Länge des Amplifikats	Referenz
Bo-GAPDH-Taq2 forw	-GCG ATA CTC ACT CTT CTA CCT TCG A-	82 nt	Acc. No. U85042
Bo-GAPDH-Taq2 rev	-TCG TAC CAG GAA ATG AGC TTG AC-	82 nt	Acc. No. U85042
Bo-IFN-Taq2-forw	-CAG CTC TGA GAA ACT GGA GGA CTT-	151 bp	[132]
Bo-IFN-Taq2-rev	-TGG CTT TGC GCT GGA TCT-	151 bp	[132]
Bo-Taq-IL2-forw	-GGA TTT ACA GTT GCT TTT GGA GAA A	165 bp	[74]
Bo-Taq-IL2-rev	-GCA CTT CCT CTA GAA GTT TGA GTT CTT-	165 bp	[74]
Bo-IL4-Taq-forw	-CAT GCA TGG AGC TGC CTG TA-	ca. 83 bp	Dr. Anja Taubert, Institut für Parasitologie der JLU Giessen, unveröffentlicht
Bo-IL4-Taq-rev	-AAT TCC AAC CCT GCA GAA GGT-	ca. 83 bp	Taubert, unveröffentlicht
Bo-Taq-IL8 -forw	-CAC TGT GAA AAA TTC AGA AAT CAT TGT TA-	113 bp	[74]
Bo-Taq-IL8-rev	-CTT CAC CAA ATA CCT GCA CAA CCT TC-	113 bp	[74]

Bo-IL10-Taq-forw	-CCA AGC CTT GTC GGA AAT GA-	ca. 91 nt	Taubert, unveröffentlicht
Bo-IL10-Taq-rev	-GTT CAC GTG CTC CTT GAT GTC A-	ca. 91 nt	Taubert, unveröffentlicht
Bo-Taq-TNF-forw	-TCT TCT CAA GCC TCA AGT AAC AAG T-	103 bp	[74]
Bo-Taq-TNF-rev	-CCA TGA GGG CAT TGG CAT AC-	103 bp	[74]

Es wurden folgende Sonden (Fa. Gene Tech Europe; 5'-Ende: 6-FAM, am 3'-Ende: TAMRA) verwendet:

Name	Produktions- nummer	Sequenz 5' bis 3'
Bo GAPDH 2	813436	-CTG-GCA-TTG-CCC-TCA-ACG-ACC-ACT-T-
Bo-IFN probe	782048	-AGC-TGA-TTC-AAA-TTC-CGG-TGG-ATG-ATC-T-
BoIL2	805345	-CGT-GCC-CAA-GGT-TAA-CGC-TAC-AGA-ATT- GAA-
BoIL4	780603	-TGC-TGC-CCC-AAA-GAA-CAC-AAC-TGA-GAA-G
BoIL8	805346	-AAT-GGA-AAC-GAG-GTC-TGC-TTA-AAC-CCC- AAG-
BoIL10	813442	-AGC-CTG-TGG-CAT-CAC-CTC-TTC-CAG-GTA-A
BoTNFalpha	805348	-AGC-CCA-CGT-TGT-AGC-CGA-CAT-CAA-CTC-C

Folgende Parameter waren für den Taqman vorgegeben:

Reaktionsvolumen	25 µl
Probevolumen pro Reaktion	1,5 µl
Forward Primer	[5µM]
Reverse Primer	[5µM]
Sonde	[5µM]

Für eine Probe wurde folgender Mastermix angesetzt:

Reagenz	Konzentration Stock	Endkonzentration	$\mu$ l pro Reaktion
2 x uMM-Puffer	2 x	1 x	12,5
Forward Primer	5 $\mu$ M	300nM	1,50
Reverse Primer	5 $\mu$ M	300nM	1,50
Sonde	5 $\mu$ M	200nM	1,00
Wasser	-	-	7,00
Endvolumen ( $\mu$ l)			25,00

Alle Reagenzien für den Mastermix wurden von der Fa. Euro Gene Tech bezogen. Dem jeweiligen Mastermix wurde 1,5  $\mu$ l cDNS pro Probe zugesetzt.

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Temperaturprofil:

50 °C	2 min	
<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>	
95 °C	15 sec	} 40 x
<u>60 °C</u>	<u>1 min</u>	
4 °C	$\infty$	

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Mittelwert aus den Ct-Werten der Doppelansätze errechnet. Im nächsten Schritt wurde auf das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH normalisiert: durch Subtraktion des Mittelwertes des Ct-Wertes des Haushaltsgens von dem des Zielgens erhielt man den Wert „ $\Delta$ Ct“. Im nächsten Schritt wurde ein Referenzsystem mit einem sogenannten Kalibrator bestimmt. Als Kalibrator dienten Proben, die nur mit dem Maltose-bindenden Protein oder nur mit Medium inkubiert worden waren. Dann wurde auf den Kalibrator normalisiert, indem der  $\Delta$ Ct-Wert des Kalibrators von dem des Zielgens subtrahiert wurde. Das Ergebnis wird mit „ $\Delta\Delta$ Ct“ bezeichnet und ist im Falle des Kalibrators gleich 0. Dann wird der negative  $\Delta\Delta$ Ct-Wert als Exponent der Zahl 2 eingesetzt. Der Kalibrator erreichte somit den Wert 1 bzw. 100 % und diente als Berechnungsgrundlage für die relative exprimierte RNS-Menge.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Nämlichkeitsprüfung der für MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$ bzw. MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$ kodierenden *E. coli*-Klone

#### 3.2.1.1 Molekulargenetische Überprüfung der *E. coli*-Klone

Bei den Untersuchungen zur Wirkung des Intimins auf bovine Immunzellen wurde repräsentativ für die bislang neun bekannten Intiminsubtypen (vgl. Tab. 3) mit den Subtypen  $\alpha$  und  $\beta$  sowie  $\gamma$  in Form von Fusionsproteinen gearbeitet. Die korrespondierenden Bakterienklone für die Intiminsubtypen  $\alpha$  und  $\beta$  wurden von Dr. Gad Frankel, Imperial Kollege, London, zur Verfügung gestellt und ausgewählt, da die von ihnen exprimierten Fusionsproteine ihre modulatorische Wirkung auf das lokale Darmimmunsystem von Mäusen in früheren Publikationen bereits bewiesen hatten [50] [51]. Zunächst erfolgte die Nämlichkeitsüberprüfung der Klone, aus denen die Fusionsproteine MBP-Int<sub>280</sub>  $\alpha$  bzw. MBP-Int<sub>280</sub>  $\beta$  gewonnen wurden. Dafür wurden die kodierenden Plasmide präpariert und teilweise sequenziert. Die für das Insert erwarteten Bandengrößen von 850 bp konnten elektrophoretisch bestätigt werden. Da in einer ersten Reaktion das Plasmid nur teilweise sequenziert werden konnte, wurden zur vollständigen Sequenzierung mittels der Methode des Primerwalkings neue Primer generiert und in Tfl-PCR-Reaktionen eingesetzt. Nach Vergleich der gewonnenen Sequenzierungsdaten konnten in jedem der Klone Abweichungen von den Datenbankeinträgen für die entsprechenden Gene identifiziert werden. Im Vergleich zu dem Datenbankeintrag M58154 (GenBank) wird bei der für den MBP-Int<sub>280</sub>  $\alpha$  exprimierenden Klon ermittelten Aminosäure-Sequenz an der Aminosäureposition 78 für ein Isoleucin anstelle eines Serins und an der Position 248 für ein Valin anstelle eines Alanin kodiert (Abb. 7A). Beim Abgleich der ermittelten, vorhersagbaren Aminosäure-Sequenz des MBP-Int<sub>280</sub>  $\beta$  exprimierenden Klons mit dem GenBank Datenbankeintrag AF081186 wurden Austausche an Position 276 (Alanin gegen Serin) und 277 (Isoleucin gegen Valin) des C-Terminus gefunden (Abb. 7B).

A: MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$

	10	20	30	40
eae alpha	I T E I K A D K T T A V A N G Q D A I T Y T V K V M K G D K P V S N Q E V T F T			
m58154	I T E I K A D K T T A V A N G Q D A I T Y T V K V M K G D K P V S N Q E V T F T			
	50	60	70	80
eae alpha	T T L G K L S N S T E K T D T N G Y A K V T L T S T T P G K S L V S A R V I D V			
m58154	T T L G K L S N S T E K T D T N G Y A K V T L T S T T P G K S L V S A R V S D V			
	90	100	110	120
eae alpha	A V D V K A P E V E F F T T L T I D D G N I E I V G T G V K G K L P T V W L Q Y			
m58154	A V D V K A P E V E F F T T L T I D D G N I E I V G T G V K G K L P T V W L Q Y			
	130	140	150	160
eae alpha	G Q V N L K A S G G N G K Y T W R S A N P A I A S V D A S S G Q V T L K E K G T			
m58154	G Q V N L K A S G G N G K Y T W R S A N P A I A S V D A S S G Q V T L K E K G T			
	170	180	190	200
eae alpha	T T I S V I S S D N Q T A T Y T I A T P N S L I V P N M S K R V T Y N D A V N T			
m58154	T T I S V I S S D N Q T A T Y T I A T P N S L I V P N M S K R V T Y N D A V N T			
	210	220	230	240
eae alpha	C K N F G G K L P S S Q N E L E N V F K A W G A A N K Y E Y Y K S S Q T I I S W			
m58154	C K N F G G K L P S S Q N E L E N V F K A W G A A N K Y E Y Y K S S Q T I I S W			
	250	260	270	280
eae alpha	V Q Q T A Q D V K S G V A S T Y D L V K Q N P L N N I K A S E S N A Y A T C V K			
m58154	V Q Q T A Q D A K S G V A S T Y D L V K Q N P L N N I K A S E S N A Y A T C V K			

↑ Aminosäureaustausch im Vergleich zum Datenbankeintrag

**Abb. 7:** Abgleich der Sequenzen der C-terminalen 280 Aminosäuren der Intimine Subtyp  $\alpha$  und  $\beta$  aus den rekombinanten *E. coli* K12 TG 1-Zellen mit Einträgen der Datenbank für die C-terminalem 280 Aminosäuren des jeweiligen Intiminsubtyps.

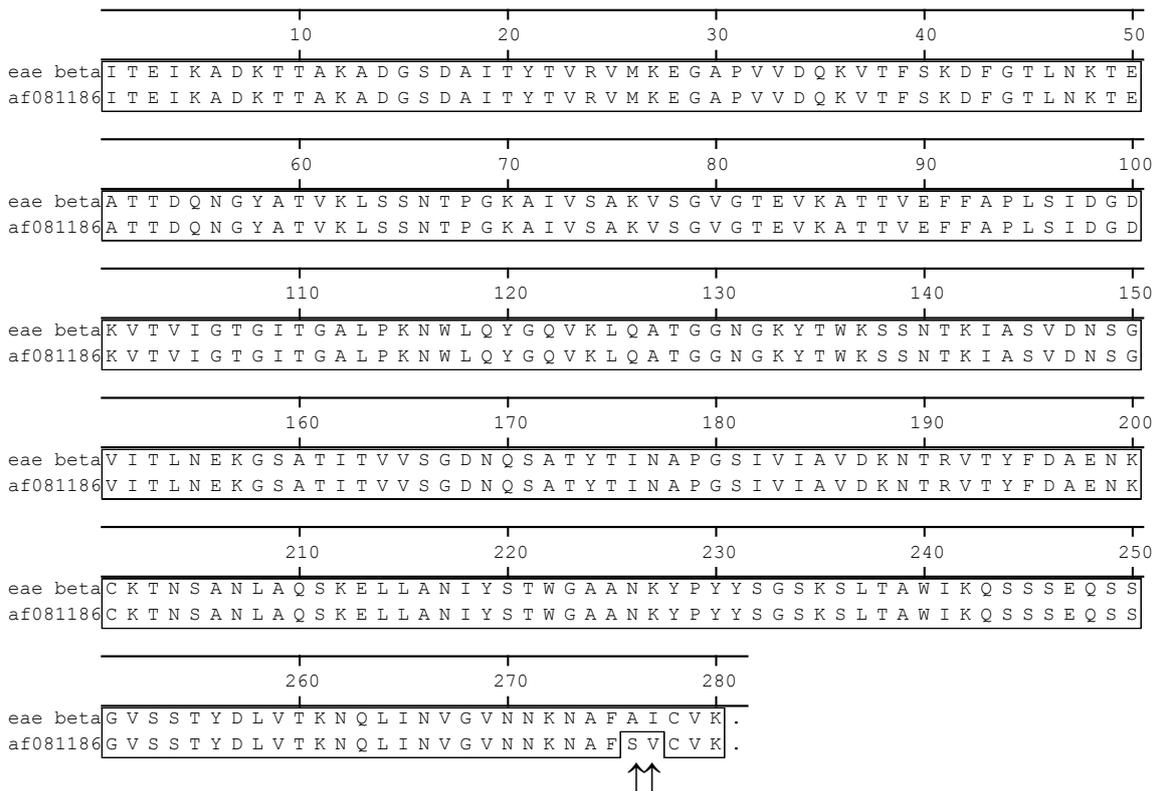
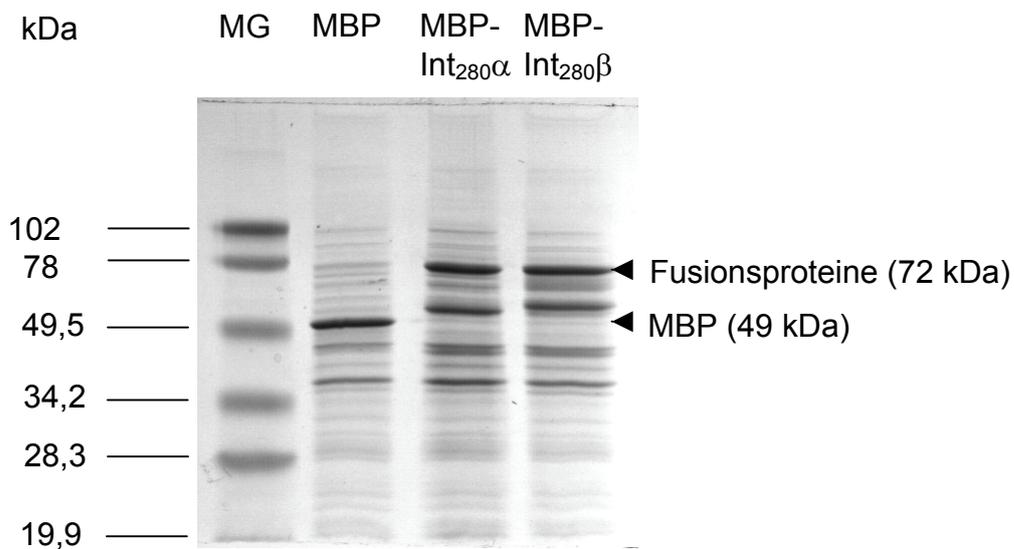
B: *MBP-Int<sub>280</sub>* $\beta$ 

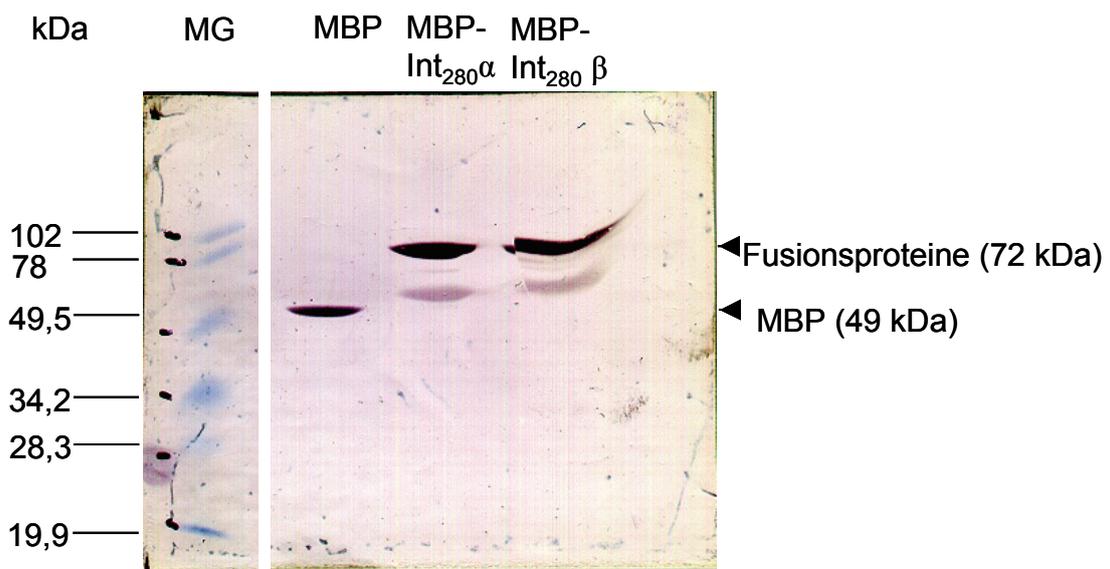
Abb. 7: Fortsetzung

## 3.2.1.2 Charakterisierung der exprimierten Proteine

Die Expression der Fusionsproteine bzw. des MBP (vgl. Kap. 3.2.2) war bei IPTG-Konzentrationen von 60  $\mu$ M bis 1500  $\mu$ M induzierbar (Abb. 8). Die Position der detektierten Proteinbanden in der SDS-PAGE entsprach ihrer erwarteten Größe von 72 kDa (MBP-Int<sub>280</sub>) bzw. 49 kDa (MBP).



**Abb. 8: SDS-PAGE zur Illustration der Induzierbarkeit der transformierten *E. coli* durch 1,5 mM IPTG, Anzucht bei 37°C und 6h (MG= Molekulargewichtsmarker Low Range Fa. Biorad)**



**Abb. 9: Immunoblot mit dem monoklonalen Anti-MBP-Antikörper zur Darstellung von MBP und den Fusionsproteinen MBP-Int<sub>280</sub>α bzw. -β vor der Aufreinigung (MG= Molekulargewichtsmarker Low Range Fa. Biorad)**

Die nicht aufgereinigten Fusionsproteine -ebenso wie der Maltose-bindende Teil des Proteins allein- wurden im Immunoblot durch einen monoklonalen Anti-MBP-Antikörper erkannt (Abb. 9). Außerdem war zusätzlich eine weitere Bande bei ca. 50 kDa sichtbar. Die Fusionsproteine stellten sich auch nach der Aufreinigung wie aus der Literatur bekannt [33] jeweils als Doppelbanden dar

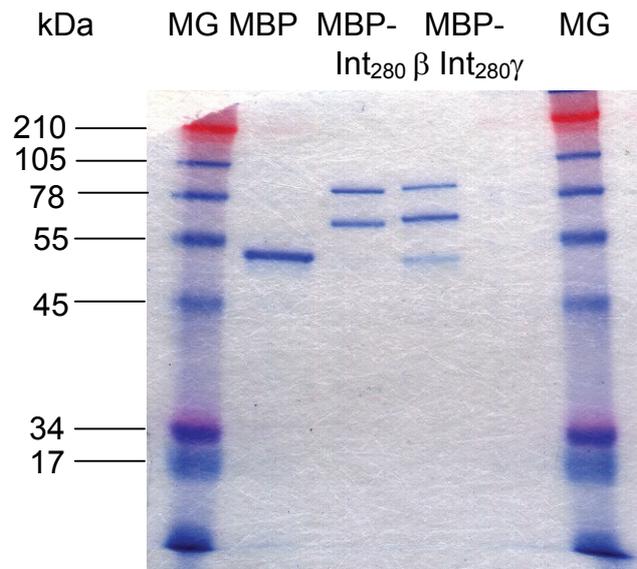
(s.u.). Die jeweils untere Bande wurde deshalb als unvollendetes Transkriptionsprodukt gewertet.

### **3.2.2 Erzeugung von MBP bzw. MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$ kodierenden *E. coli*-Klonen**

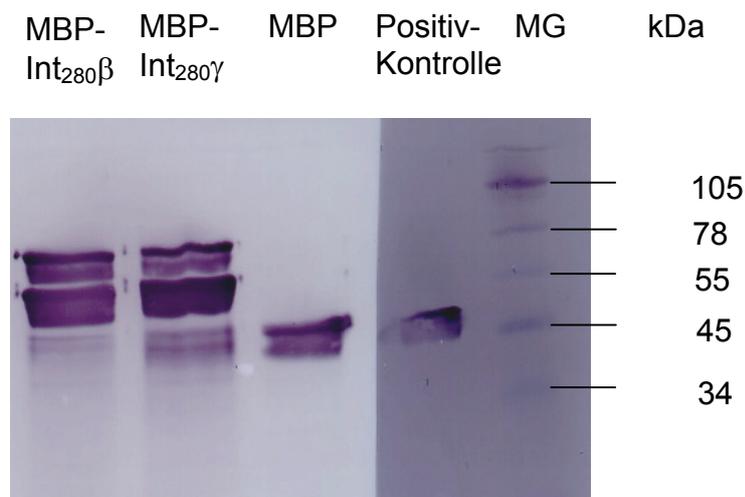
Da für den Intiminsubtyp  $\gamma$  [sowie inzwischen auch für andere Intiminsubtypen [116]] ein alternativer Weg der Bindung an das zelluläre Nucleolin im Gegensatz zur alleinigen Tir-Abhängigkeit der anderen Subtypen diskutiert wurde, wurde mit Hilfe der Arbeitsgruppe von PD Dr. Norbert Tautz, Institut für Virologie der Universität Gießen, ein rekombinanter *E. coli*-Stamm hergestellt, um ein Fusionsprotein mit den C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimins Subtyp  $\gamma$  zu erhalten. Das Insert, das zu diesem Zweck in den Vektor pMALc2 zur Transformation eines kompetenten *E. coli* K 12 TG 1 eingeführt wurde, stammte aus dem EHEC-Stamm EDL 933 (ATCC 43895). Es kodierte für die C-terminalen 280 Aminosäuren des Intimin Subtyps  $\gamma$  und besaß eine Größe von 850 bp. Die Sequenz, die aus dem pGEM-T-Vektor sequenziert wurde, zeigte eine 100 %ige Homologie zu dem GenBank-Eintrag AE005595. Außerdem wurde die DNA des kommerziell erhältlichen Vektors pMALc2 ebenfalls in den gleichen, kompetenten *E. coli*-Stamm transformiert, um so für die nachfolgenden Experimente eine Kontrolle für den Maltose bindenden Teil des Proteins zu erhalten.

Durch Zugabe von IPTG zu den Medien während der Anzucht der erzeugten Klone ließen sich Proteine induzieren, deren Bandenpositionen im SDS-Gel jeweils der vorhergesagten Proteingröße entsprachen (Abb. 10).

Banden dieser Größe ließen sich auch im Westernblot mit einem Antiserum gegen MBP detektieren (s. Abb.11).



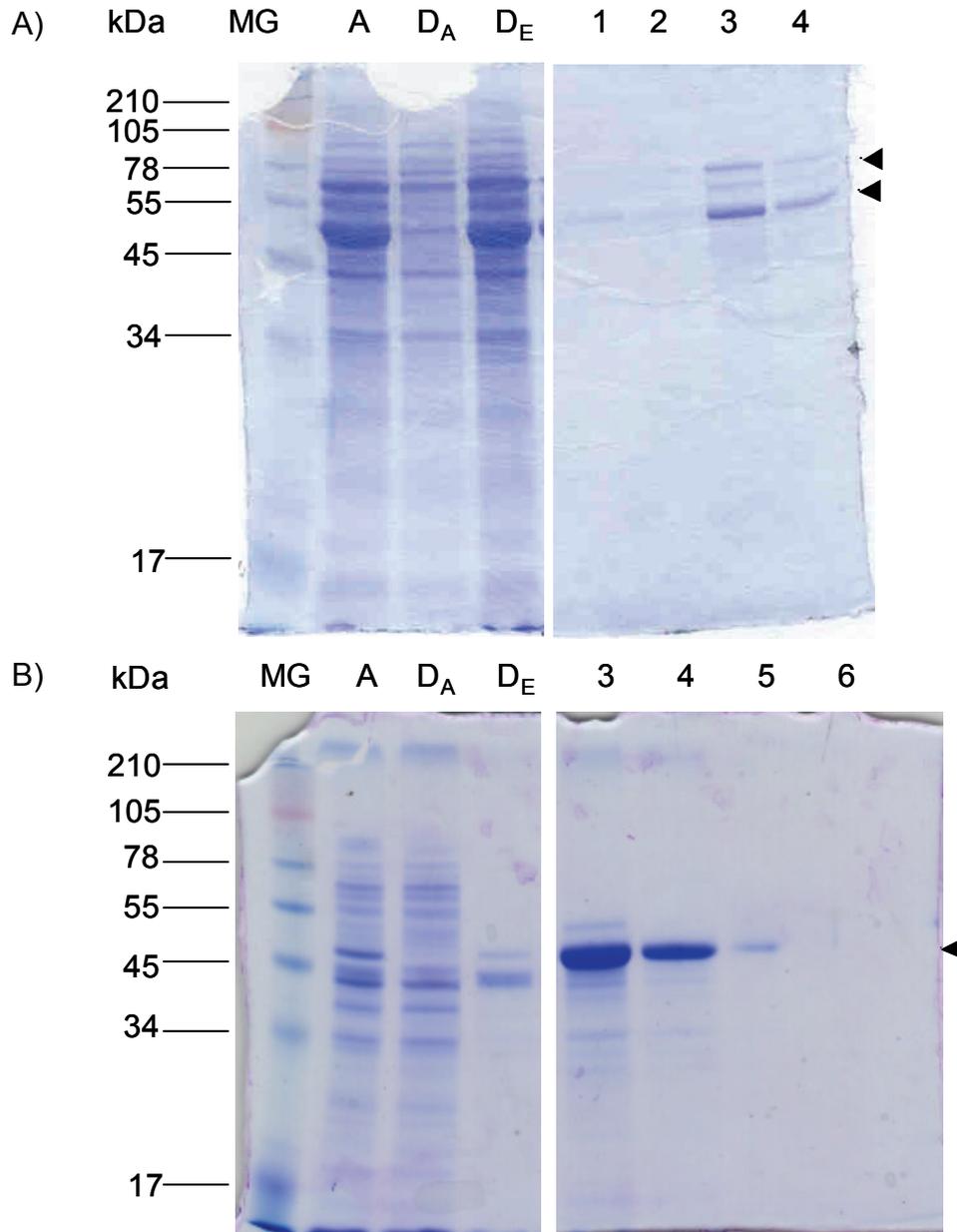
**Abb. 10: Auftrennung der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE zur Darstellung von MBP und MBP-Int<sub>280</sub>γ.** MG= Molekulargewichtsmarker Sea Blue Plus 2 Pre-Stained Standard



**Abb.11: Detektion von MBP-Int<sub>280</sub>β, MBP-Int<sub>280</sub>γ und Maltose-bindenden Protein mit Anti-MBP-Antiserum im Immunoblot.** Auf die SDS-PAGE aufgetragen wurden je 5,0 µg MBP-Fusionsproteine, 1,7 µg des Maltose-bindenden Proteins und 5,0 µg *C. perfringens* α-Toxin als Positivkontrolle. Letzteres wurde mit Anti-α-Toxin Antikörper (Anti-Maus-Ig-Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper, Fa. Amersham Pharmacia) detektiert. MG= Sea Blue Plus 2 Pre-Stained Standard

### 3.2.3 Optimierung von Anzucht, Induktion und Aufreinigung

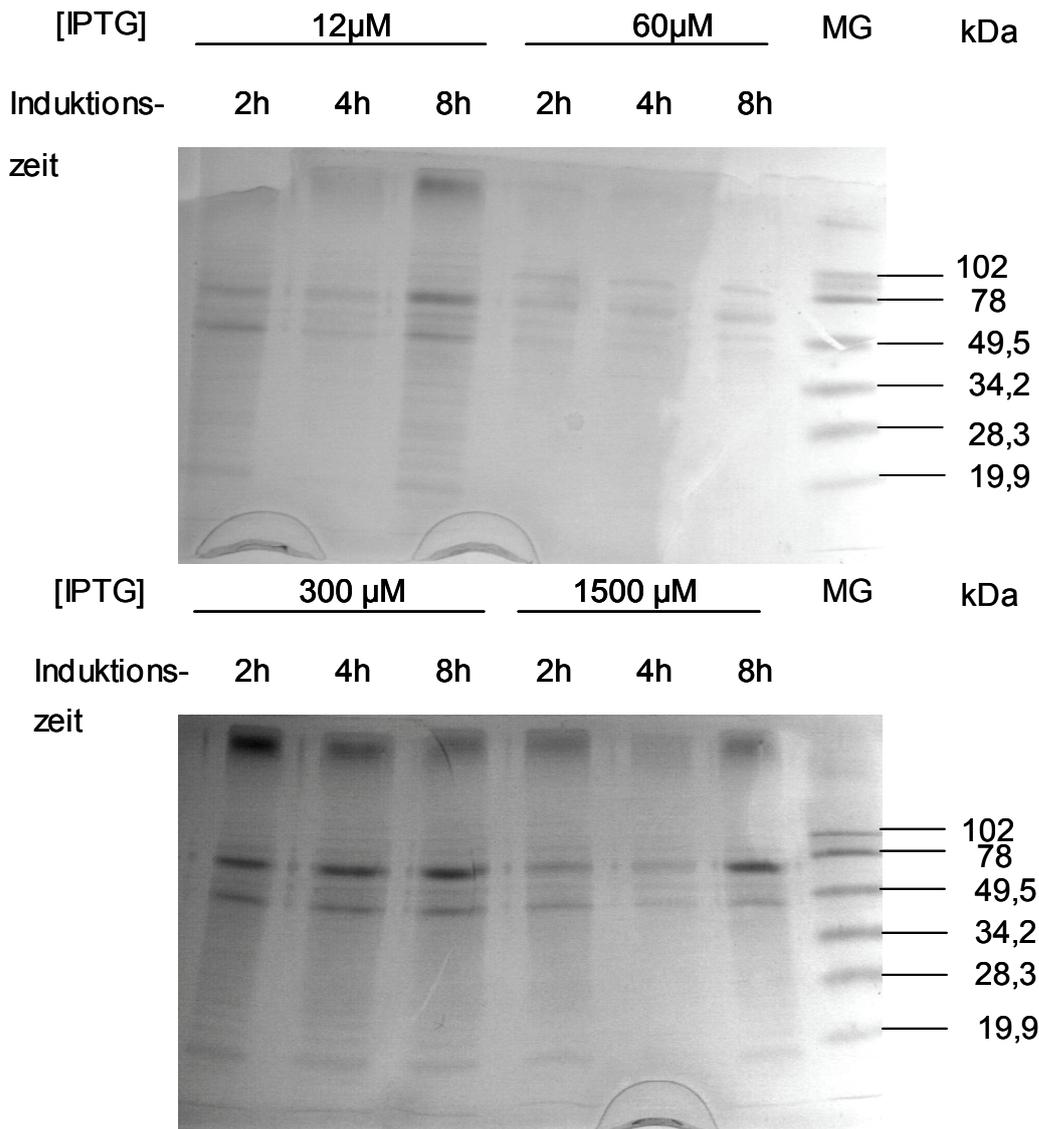
Um eine effiziente Produktion der Proteine zu erreichen, wurden zunächst die in der Literatur beschriebenen Angaben zur Anzucht, Induktion und Aufreinigung der transformierten *E. coli*-Stämme [33] unter den eigenen Laborbedingungen überprüft (Abb. 12A&B, 15A).



**Abb. 12: SDS-PAGEs zur Überprüfung der Reinheit und Ausbeute der aufgereinigten Fusionsproteine MBP-Int<sub>280</sub>β (A) und des Maltose-bindenden Proteins (B) nach Induktion bei 37°C, 300 μM IPTG und 6 Stunden Inkubationsdauer. MG = Molekulargewichtsmarker Low Range Biorad (A) bzw. Sea Blue Plus 2 (B), A = Auftrag, D<sub>A</sub> = Anfang des Durchlaufs, D<sub>E</sub> = Ende des Durchlaufs, 1,2,3,4 (oben) bzw. 3,4,5,6 = Eluate**

Auch das zum Bakterienaufschluß beschriebene Verfahren des Ultraschalls wurde gemäß Literaturangaben [33] durchgeführt. Da die in Abb. 12 dargestellten Proteine nach der Aufreinigung nur in sehr geringer Menge vorlagen, wurde eine Optimierungsstudie durchgeführt. Da insbesondere für MBP-Int<sub>280</sub>  $\alpha$  (vgl. Abb. 15) das Ergebnis nicht zufriedenstellend war, wurde der Versuch mit diesen transformierten *E. coli* durchgeführt.

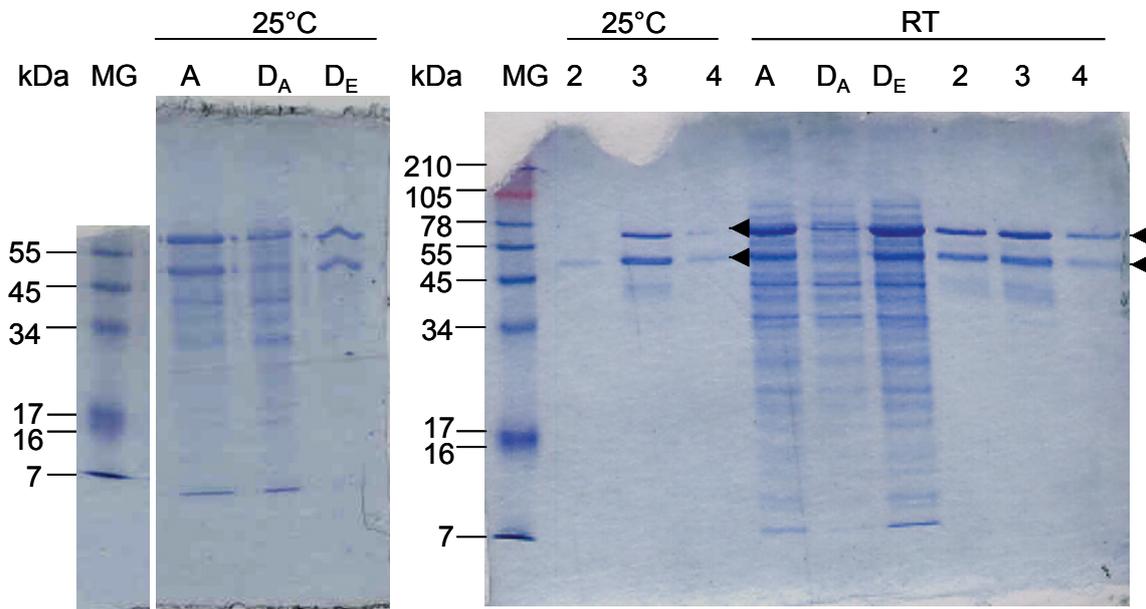
In einem schachbrettartig angelegten Versuchsaufbau wurde sowohl die IPTG-Konzentration als auch die Inkubationsdauer variiert. Bei der Induktion mit 300  $\mu$ M IPTG, 8 h Inkubationszeit und einer Anzuchttemperatur von 37°C erschien eine deutliche Bande bei dem errechneten molekularen Gewicht für 72 kDa (Abb. 13).



**Abb. 13:** SDS-PAGEs zur Darstellung des MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$  nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (in  $\mu$ M) und unterschiedlicher Induktionsdauer (in h) bei 37°C. MG= Molekulargewichtsmarker Low Range Biorad

Allerdings war nach affinitätschromatographischer Aufreinigung die Menge des exprimierten Proteins nicht zufriedenstellend. Da jedoch Deibel [22] schon auf die temperaturabhängige Proteinseznernierung von *E. coli* hingewiesen hatte, wurden die Untersuchungen bei niedrigeren Anzuchttemperaturen durchgeführt (Abb. 14). Dabei wurde deutlich, daß die herabgesetzte Temperatur einen entscheidenden Einfluß auf die gewonnene Proteinmenge besaß und bei Raumtemperatur (entsprechend 18-20 °C) die besten Ergebnisse erzielt wurden. Zusätzlich zu den Anzuchtbedingungen der Keime wurde in einer weiteren Versuchsreihe auch die Zusammensetzung des Lauf- und des Elutionspuffers für die Aufreinigung variiert. Da durch den Zusatz eines

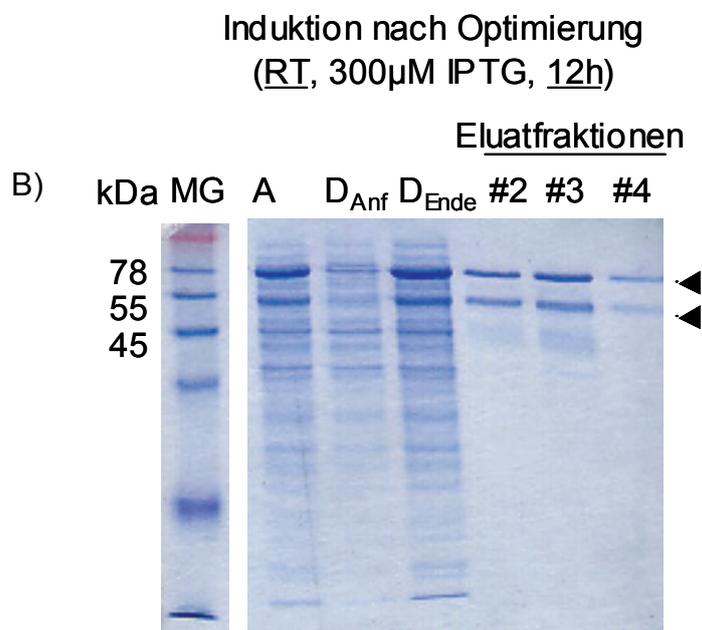
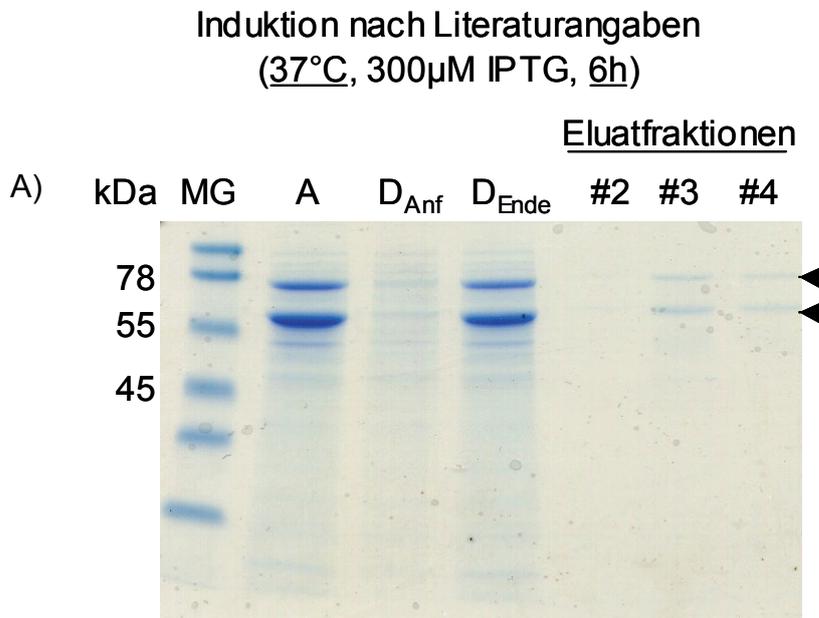
Proteaseinhibitors (Complete™ EDTA-free, Fa. Roche) die gewonnene Proteinmenge nicht erhöht werden konnte, wurde auf seinen weiteren Einsatz verzichtet.



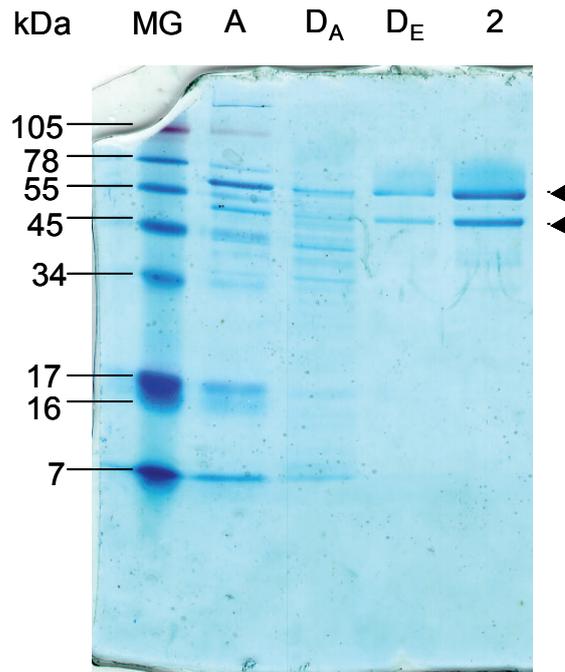
**Abb. 14: Darstellung von Proben der Aufreinigungen des MBP-Int<sub>280</sub>α** nach 12 stündiger Anzucht nach Induktion mit 0,3mM IPTG und verschiedenen Anzuchttemperaturen mittels SDS-PAGE. MG = Molekulargewichtsmarker Sea Blue Plus 2, A = Auftrag, D<sub>A</sub>= Anfang des Durchlaufs, D<sub>E</sub> = Ende des Durchlaufs, 2,3,4 = Eluate

Zur endgültigen Gewinnung und Aufreinigung der Proteine wurden dann Puffer ohne denaturierendes Agens eingesetzt. Gemäß Literaturangaben [33] wurden die Expressionsklone mit 300 µM IPTG induziert und bei 37 °C 6 h inkubiert. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 12 h bei RT (entsprechend 18-25 °C) konnte die Proteinausbeute gesteigert werden (Abb. 15A&B). Der Aufschluß der Bakterien zur Proteinfreisetzung erfolgte durch French Press anstelle der von Frankel eingesetzten Lyse durch Ultraschall. Die modifizierten Inkubationsbedingungen konnten unverändert auf die Gewinnung des MBP-Int<sub>280</sub>β und des neu klonierten MBP-Int<sub>280</sub>γ übertragen werden (Abb. 16). Zur Versuchsoptimierung wurde der MBP-Int<sub>280</sub>α exprimierende Klon eingesetzt. Mit dem gewonnenen Protein wurde jedoch nicht weitergearbeitet, da (im Gegensatz zu den Fusionsproteinsproteinen MBP-Int<sub>280</sub>β und -γ) keine Bindung an HeLa-Zellen (vgl. Kap 3.2.4) nachweisbar war und somit keine

Positivkontrolle vorlag. Die Proteinmengen nach Detoxifizierung und Sterilfiltration betragen 282,85  $\mu\text{g/ml}$  für MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$ , 160,8  $\mu\text{g/ml}$  für MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$  und 130,8  $\mu\text{g/ml}$  für MBP.



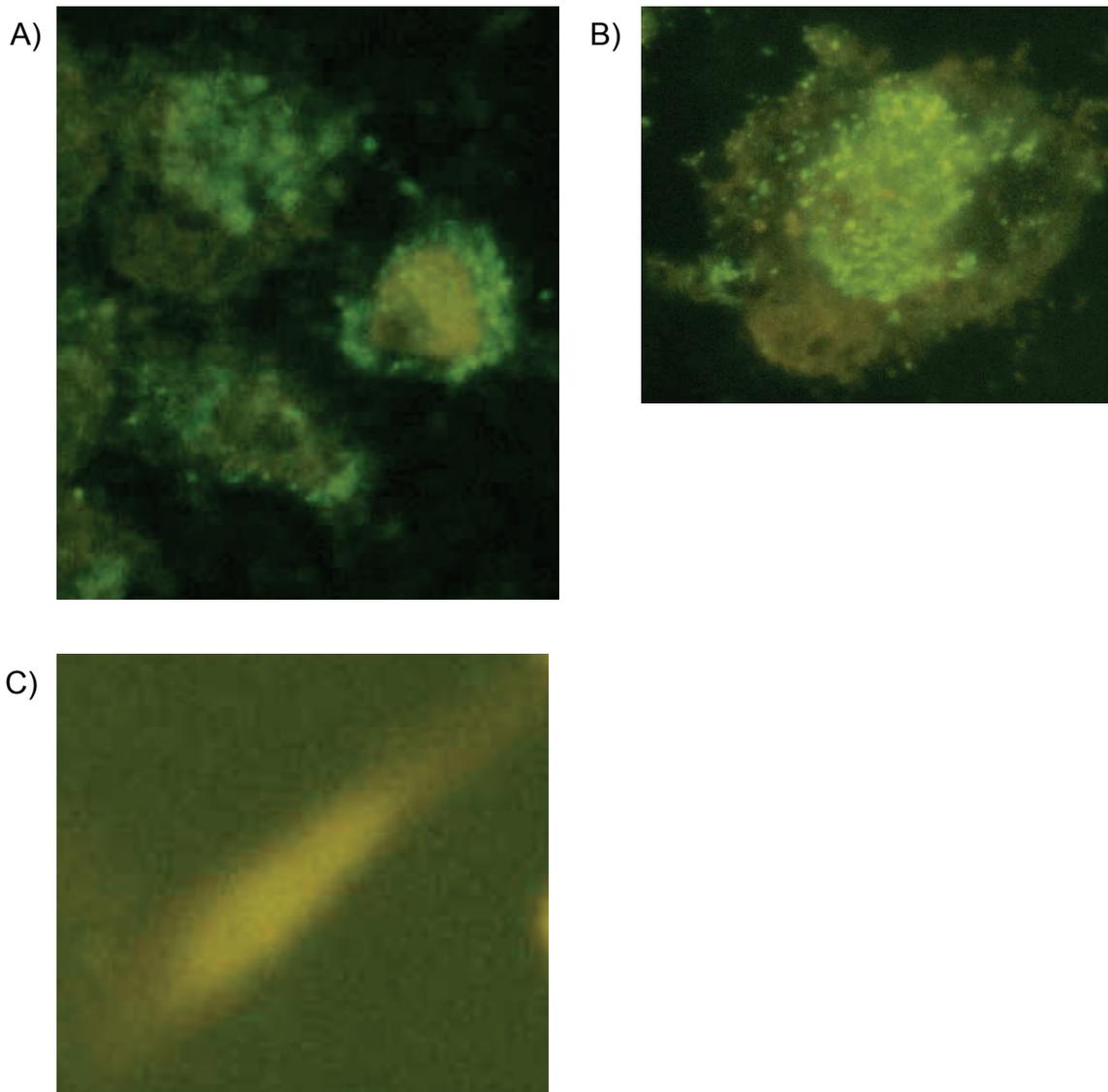
**Abb. 15:** Darstellung verschiedener Aufreinigungen des MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$  nach Induktion gemäß Literaturangaben (A). MG= Molekulargewichtsmarker Low Range Biorad) und nach Optimierung der Induktion (B); MG = Molekulargewichtsmarker Sea Blue Plus 2)



**Abb. 16:** Auftrag von Fraktionen der FPLC-Aufreinigung des MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$  nach Anzucht bei 25°C, 0,3mM IPTG und 12 Stunden Inkubationsdauer auf der SDS-PAGE. MG = Molekulargewichtsmarker Sea Blue Plus 2, A = Auftrag, D<sub>A</sub> = Anfang des Durchlaufs, D<sub>E</sub> = Ende des Durchlaufs, 2 = Eluat

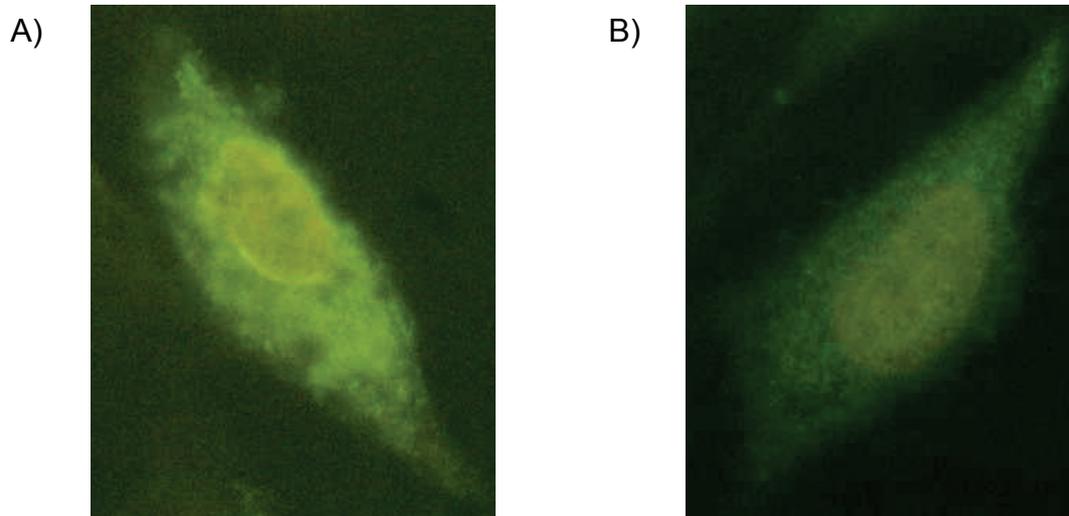
### 3.2.4 Funktionelle Charakterisierung der Intimine

Es sollte getestet werden, ob die verwendeten Fusionsproteine an bakterielle Tirs binden können. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit Bakterien des Stammes RDEC-1, der das Intimin Subtyp  $\beta$  exprimiert, vorinkubiert. Dies geschah in einem weiteren Ansatz für HeLa-Zellen mit dem Stamm EDL 933, der das Intimin Subtyp  $\gamma$  exprimiert. Nach Zugabe des homologen Intimin-Fusionsproteins konnte mit dem monoklonalen Anti-MBP-Antikörper die Bindung der Fusionsproteine an die Zellen nachgewiesen werden (Abb. 17).



**Abb. 17 : Bindung von MBP-Int<sub>280</sub>β (A) bzw. MBP-Int<sub>280</sub>γ (B) an mit den *E. coli*-Stämmen RDEC-1 (A) bzw. EDL 933 (B) und infizierte HeLa-Zellen. Detektion mit monoklonalem Anti-MBP-Antikörper und FITC-Konjugat. C: Vergleichend mit RDEC-1 vorinkubierte HeLa-Zellen, die anschliessend mit MBP inkubiert wurden, so daß keine Bindung stattfinden konnte (Negativkontrolle)**

Auch nach der Inkubation von nicht-infizierten HeLa-Zellen mit den jeweiligen Fusionsproteinen war eine Bindungen der Fusionsproteine detektierbar (Abb. 18A-B ). Die Lokalisation der Signale in der Zelle unterschied sich dabei nicht von den bei infizierten Zellen. Ein Foto der mitgeführten Negativkontrolle war wegen der überlangen Belichtungszeit technisch nicht möglich.

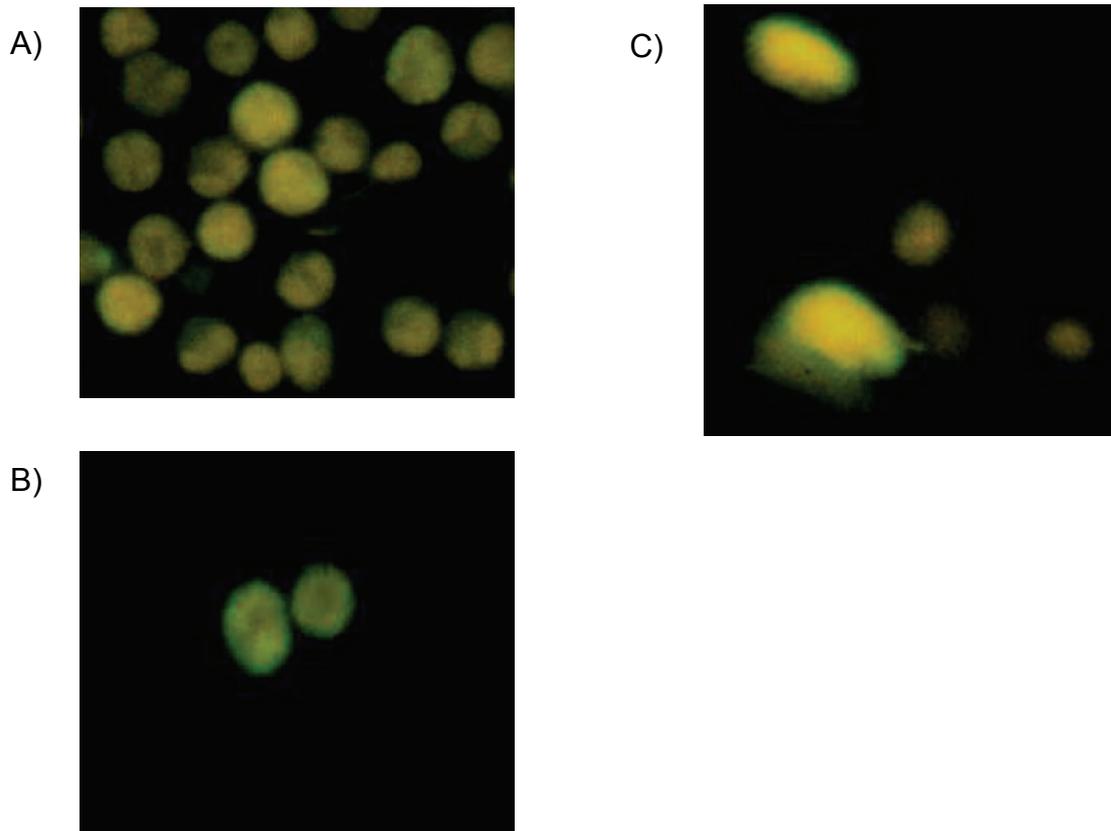


**Abb. 18: Bindung von MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$  (A) bzw. MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$  (B) an HeLaZellen.** Detektion mit monoklonalem Anti-MBP-Antikörper und FITC-Konjugat, das durch die vorliegenden Bindungen als grüne punktförmige Signale erscheint.

### **3.2.5 Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit der Intimine an bovine Leukozyten**

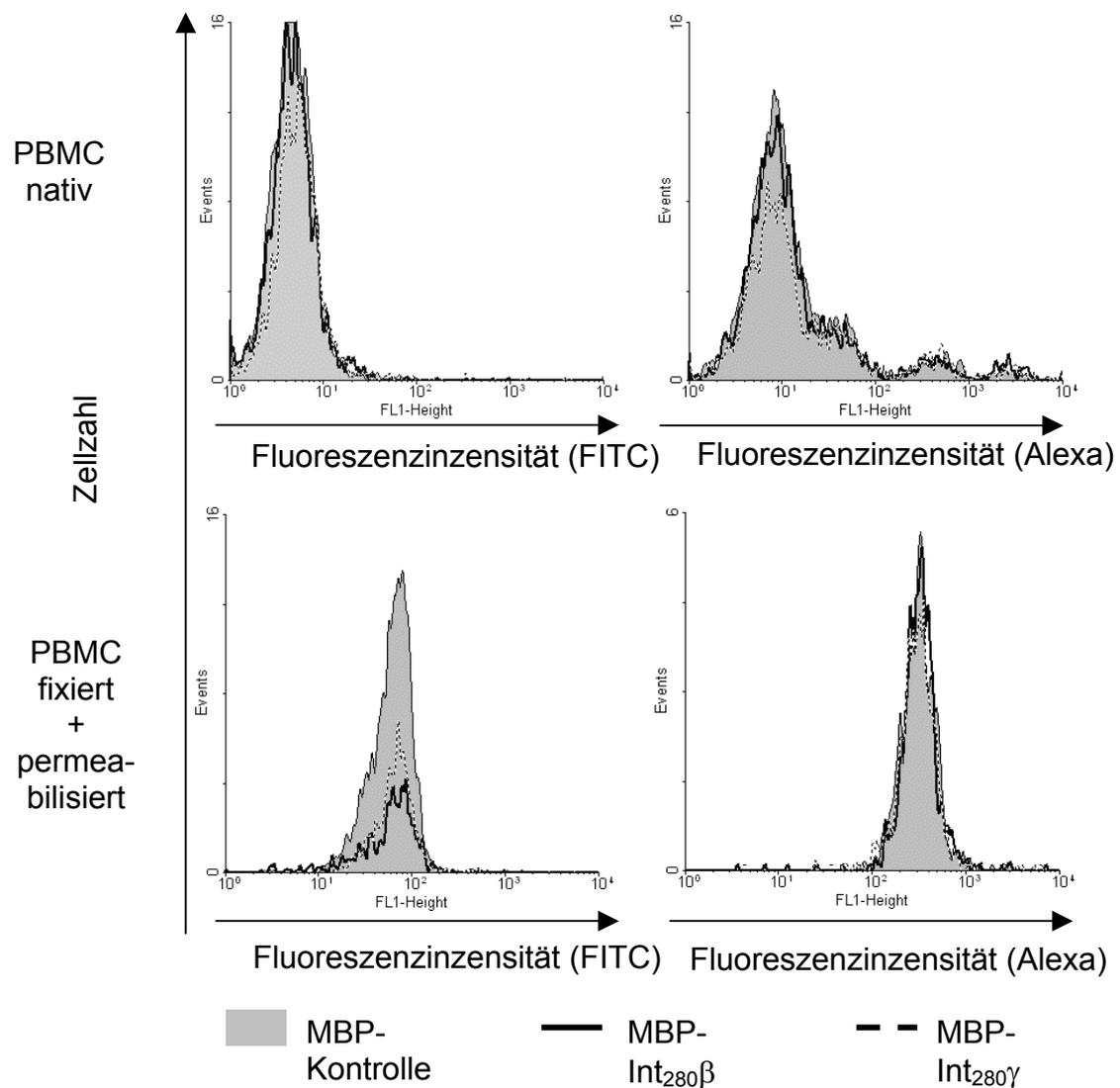
Die Pathogenese von A/E-induzierenden Erregern bei Mäusen wird über die direkte Bindung der Bakterien an Lymphozyten vermittelt. Um die Gesamtheit der Leukozyten des Rindes auf eine mögliche Bindung der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden zunächst Zellen aus Vollblut nach Lyse der Erythrozyten eingesetzt. An den Gesamtleukozyten von zwei untersuchten Tieren war in zwei Zytometern (BD FACS Calibur<sup>®</sup>, EPICS Elite-Analyser<sup>®</sup>) kein FITC-Signal detektierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur Kontrolle wurde auch die Fluoreszenzmikroskopie als sensitivere Methode hinzugezogen. Bei den analog vorbereiteten Proben war im Fluoreszenzmikroskop ebenfalls keine Bindung detektierbar (Abb. 19A-C). Im Vergleich zu den HeLa-Zellen, bei denen durch das FITC ein grünleuchtendes Signal vorhanden war (Abb. 18), erschienen die Gesamtleukozyten nur aufgrund der extrem langen Belichtungszeit orange; dies

wurde nicht als spezifisches Signal im Sinne einer spezifischen Bindung gewertet.



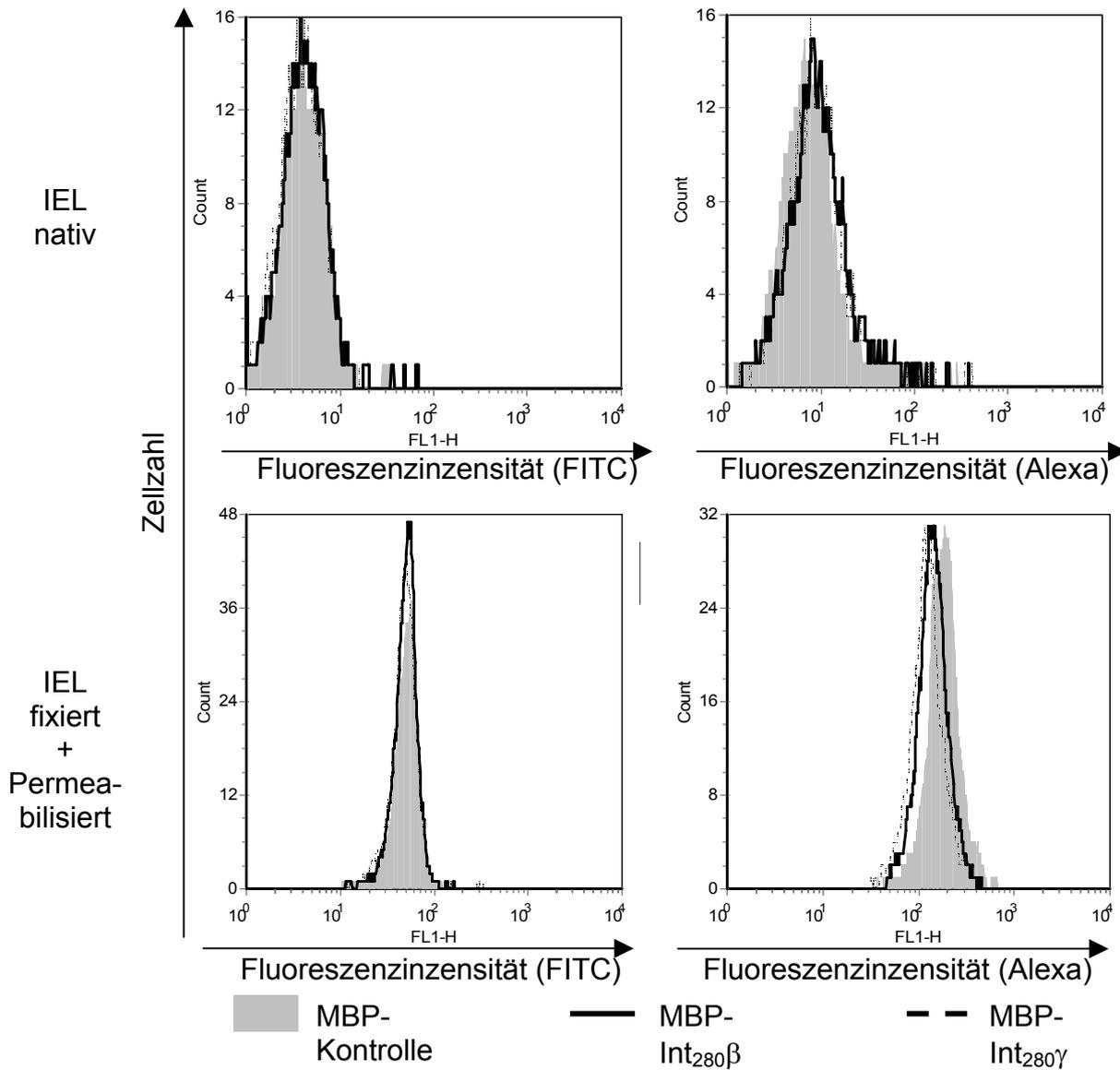
**Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopisches Bild von bovinen Leukozyten nach Inkubation mit Fusionsproteinen** und anschließender Detektion mit dem FITC-konjugierten Antikörper nach Cytospin. Es sind keine spezifischen Signale wie in Abb. 18A&B zu sehen. Inkubation der Zellen mit MBP (A), MBP-Int<sub>280</sub>β(B) bzw. MBP-Int<sub>280</sub>γ (C)

Um eine Bindung der Intimine an bovine Lymphozyten und insbesondere an die für die funktionellen Studien verwendeten PBMC, die durch die Präparation aktiviert worden sein könnten, sicher auszuschliessen, wurden auch bovine PBMC durchflußzytometrisch untersucht, die mit den Fusionsproteinen, mono- bzw. polyklonalen Antikörpern und mit entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Konjugaten inkubiert worden waren. Eine Bindung der Fusionsproteine MBP-Int<sub>280</sub>β und MBP-Int<sub>280</sub>γ an bovine PBMC war nicht zu sehen (Abb. 20).



**Abb. 20:** Bindungsverhalten der Fusionsproteine an bovine PBMC *ex vivo* unter den Inkubationsbedingungen „nativ“ oder „fixiert & permeabilisiert“; Detektion mittels monoklonalem Antikörper (FITC-gekoppelt) oder polyklonalem Antiserum (ALEXA-gekoppelt). Gegatet (eingegrenzt) nach Lymphozyten, repräsentative (für drei Tiere) Darstellung der Zellen eines Tieres.

Schließlich wurde die Bindung der Fusionsproteine an bovine intraepitheliale Lymphozyten, die von den PBMC phänotypisch und funktionell sehr unterschiedlich sind, *ex vivo* zytometrisch untersucht. Auch hier war keine Bindung detektierbar (Abb. 21).



**Abb. 21:** Untersuchung zur Bindung von Fusionsproteinen an native bzw. fixierte und permeabilisierte bovine IEL *ex vivo*, Inkubation mit monoklonalem Anti-MBP-Antikörper (FITC-gekoppelt) bzw. polyklonalem Anti-MBP-Antiserum (ALEXA-gekoppelt). Zellen eines Tieres repräsentativ für n=3 Tiere. Gegattet nach Lymphozyten.

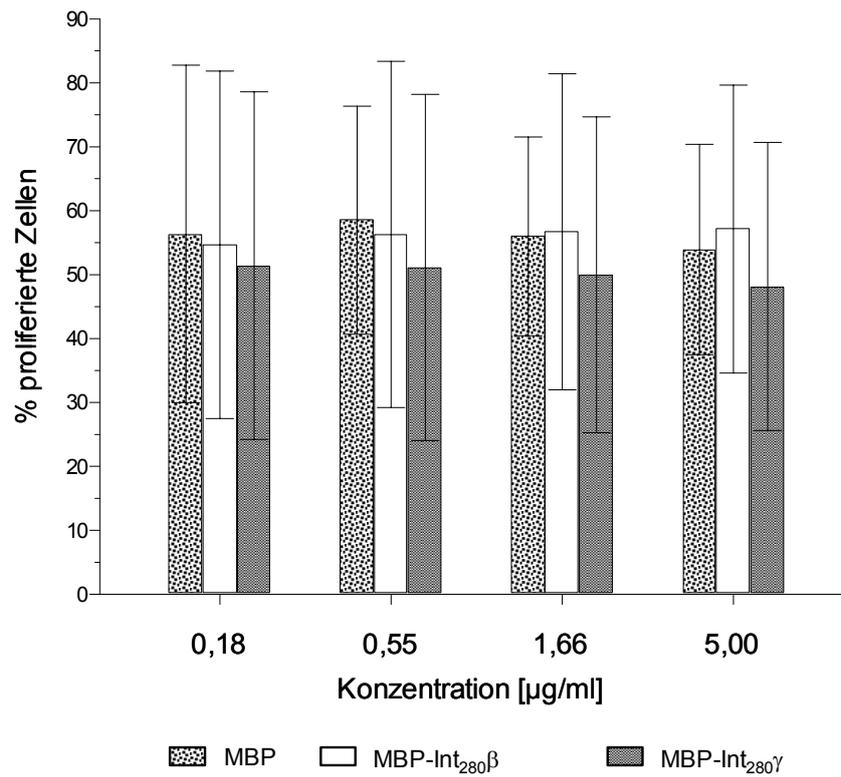
### 3.2.6 Untersuchungen zur Wirkung der Intimine auf bovine Lymphozyten

Eine Bindung der Intimine an bovine Immunzellen lag nicht vor. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß Lymphozyten des Rindes anders sind als

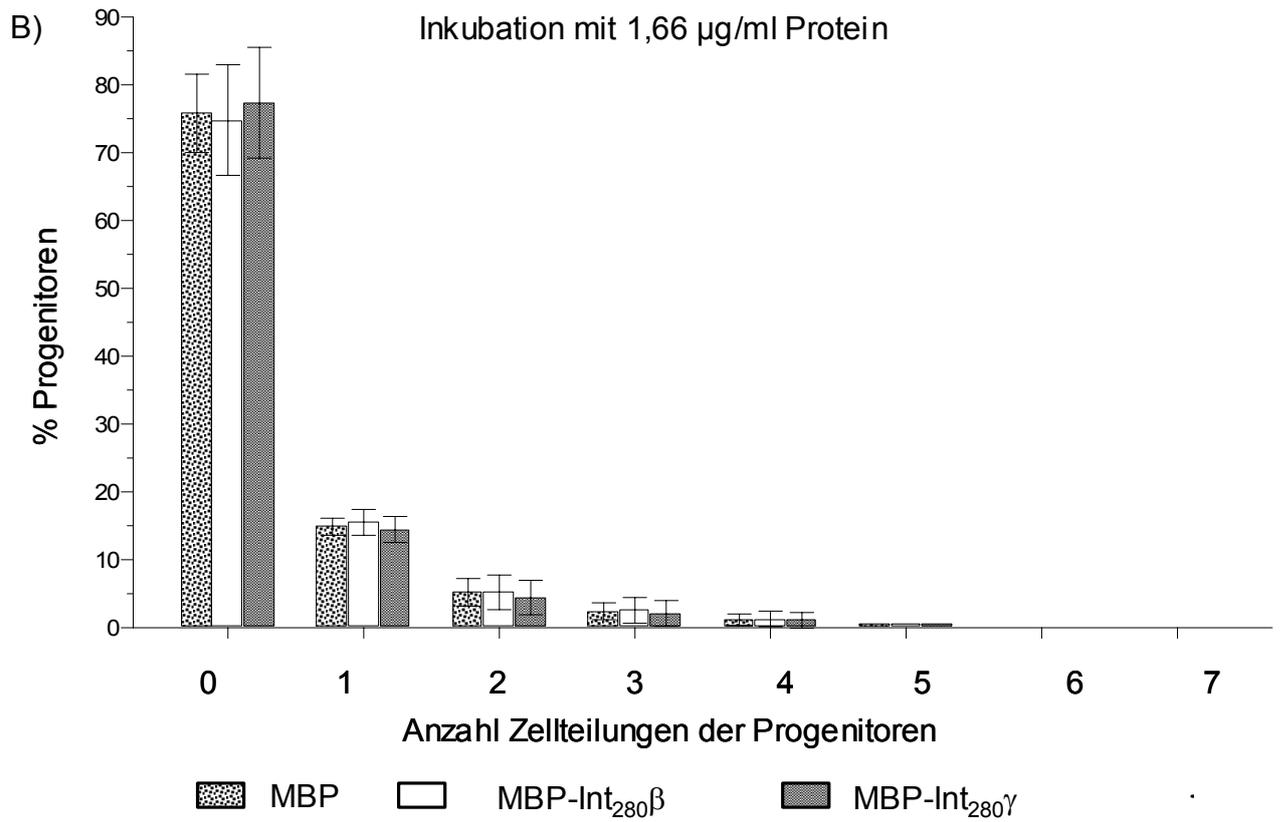
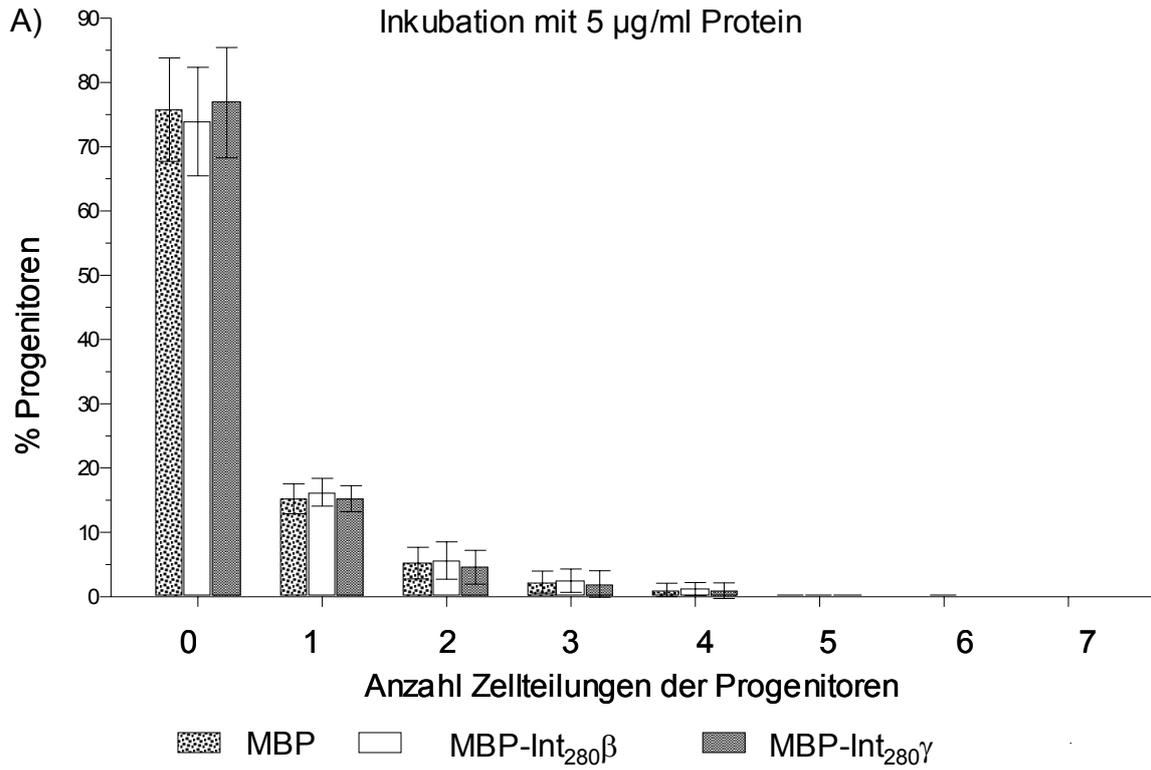
die der Maus. Eine fehlende Bindung allein ist jedoch nicht beweisend dafür, daß bovine Lymphozyten gänzlich unempfindlich für das Intimin sind. Deshalb sollte mit einer weiteren Untersuchungsmethode festgestellt werden, ob trotzdem ein Effekt der Fusionsproteine auf bovine PBMC vorhanden war.

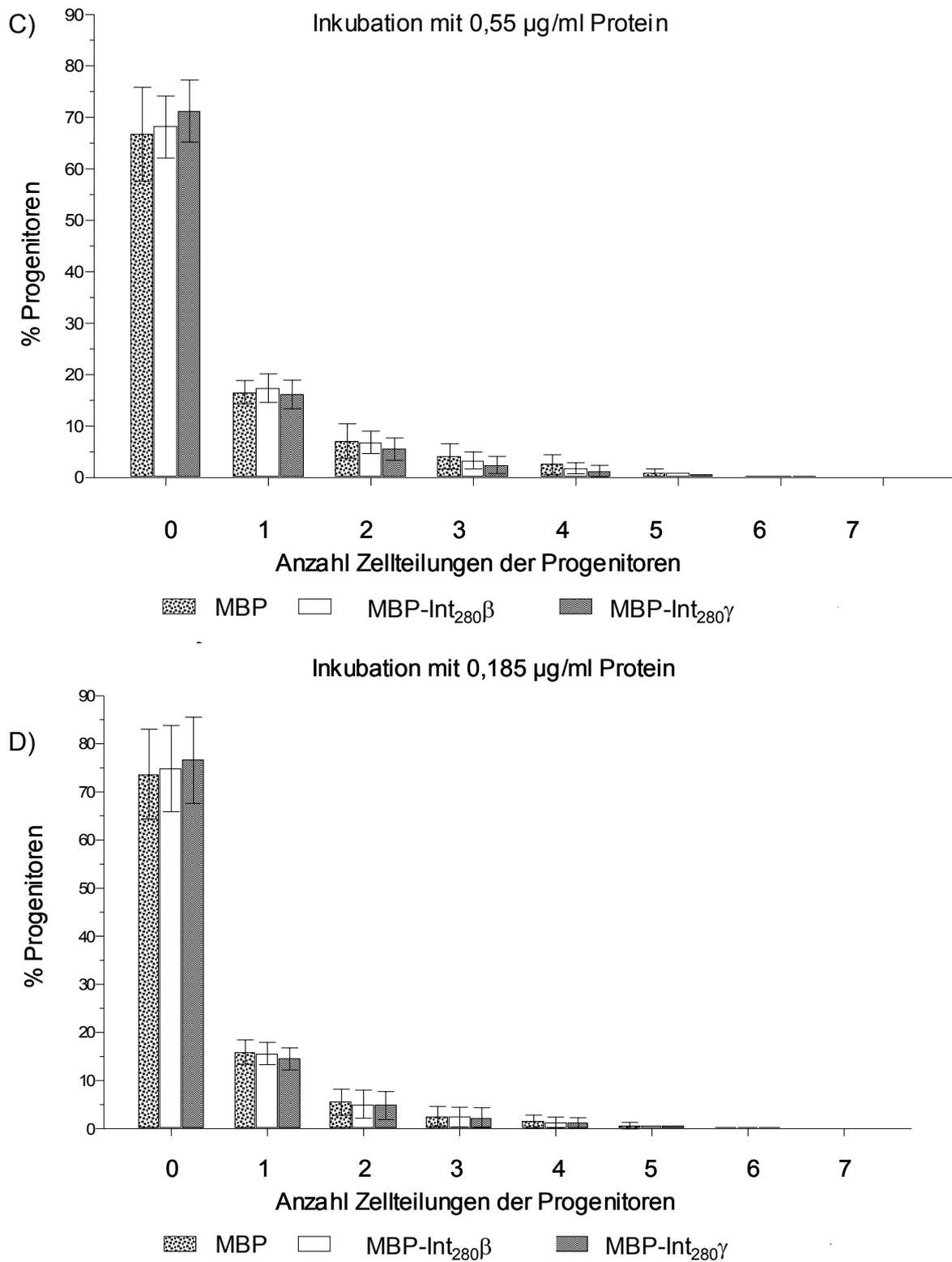
### **3.2.6.1 *Blastenquantifizierung mittels Zytometrie***

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von mit Intimin inkubierten Zellen sollte zeigen, ob ein Effekt der Fusionsproteine hinsichtlich der Zellteilung sichtbar wird. Zum Zeitpunkt der Untersuchung 4 Tage nach Versuchsbeginn waren ca. 60 % der Zellen durch Proliferation entstanden bzw. hatten mindestens eine Zellteilung durchlaufen (Abb. 22). Für die detaillierte Betrachtung der einzelnen Zellgenerationen, die eine sehr präzise Beurteilung der Proteinwirkung erlaubt, wurden die Zellen zytometrisch bis zur siebten Generation verfolgt. Bei der Aufteilung in je zwei Tochterzellen bei jedem Teilungsschritt war jedoch kein Effekt sichtbar, der den Fusionsproteinen hätte zugeschrieben werden können. Auch die Inkubation mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen brachte keinen Hinweis auf ein möglicherweise verändertes Verhalten oder einen toxischen Effekt der Fusionsproteine auf die stimulierten PBMC von vier Tieren (Abb. 23A-D).



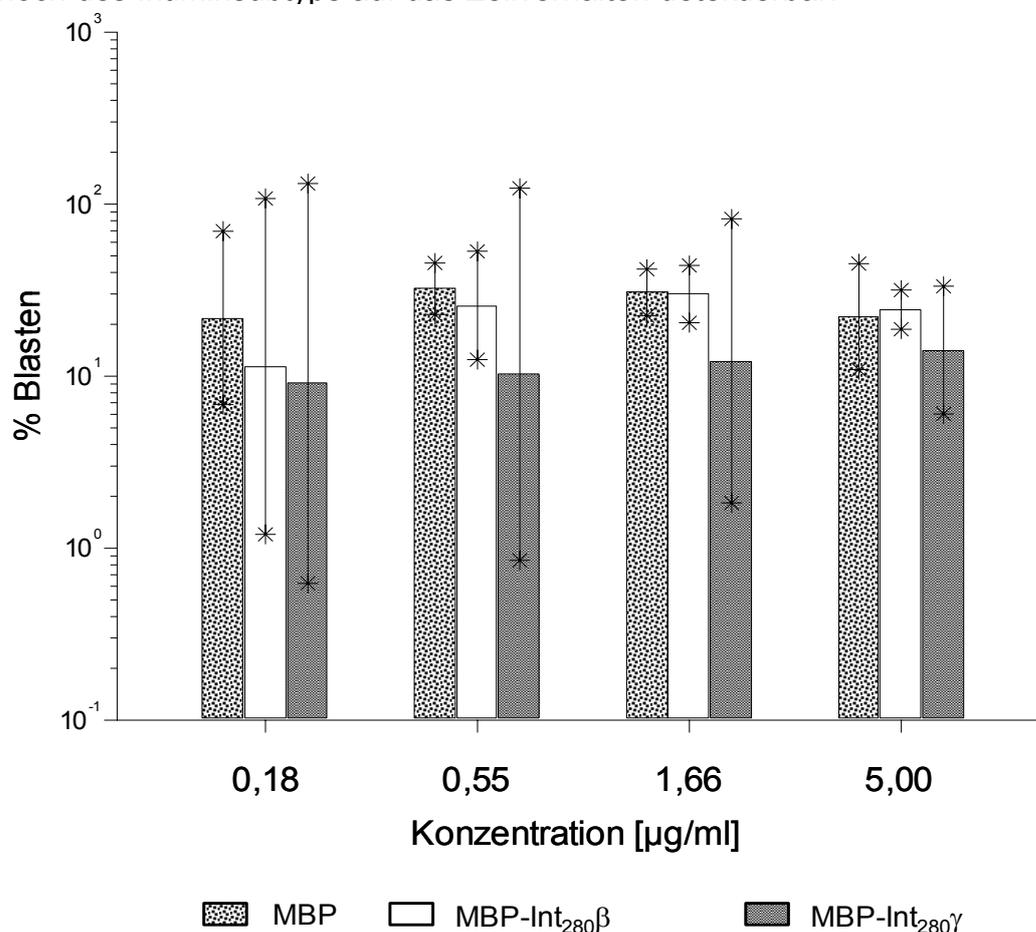
**Abb. 22:** Darstellung der proliferierten Zellen (Gesamtheit aller Zellen mit teilungsbedingt reduziertem CFSE-Signal). n=4 Tiere, Mittelwerte und Standardabweichungen. Es lag keine signifikante Proliferation vor ( $p > 0,05$ ).





**Abb. 23: Proliferation Con A stimulierter boviner PBMC nach 96-stündiger Inkubation** mit den jeweiligen Proteinen; Messung der Fluoreszenzintensität für CFSE mittels Durchflusszytometrie. Mittelwert und Standardabweichungen von 4 Tieren. Auf der X-Achse aufgetragen ist die Anzahl der Generationen, die eine Zelle seit Beginn der Inkubation durchlaufen hat. Auf der Y- Achse ist der Anteil der Progenitoren in Prozent ausgedrückt.

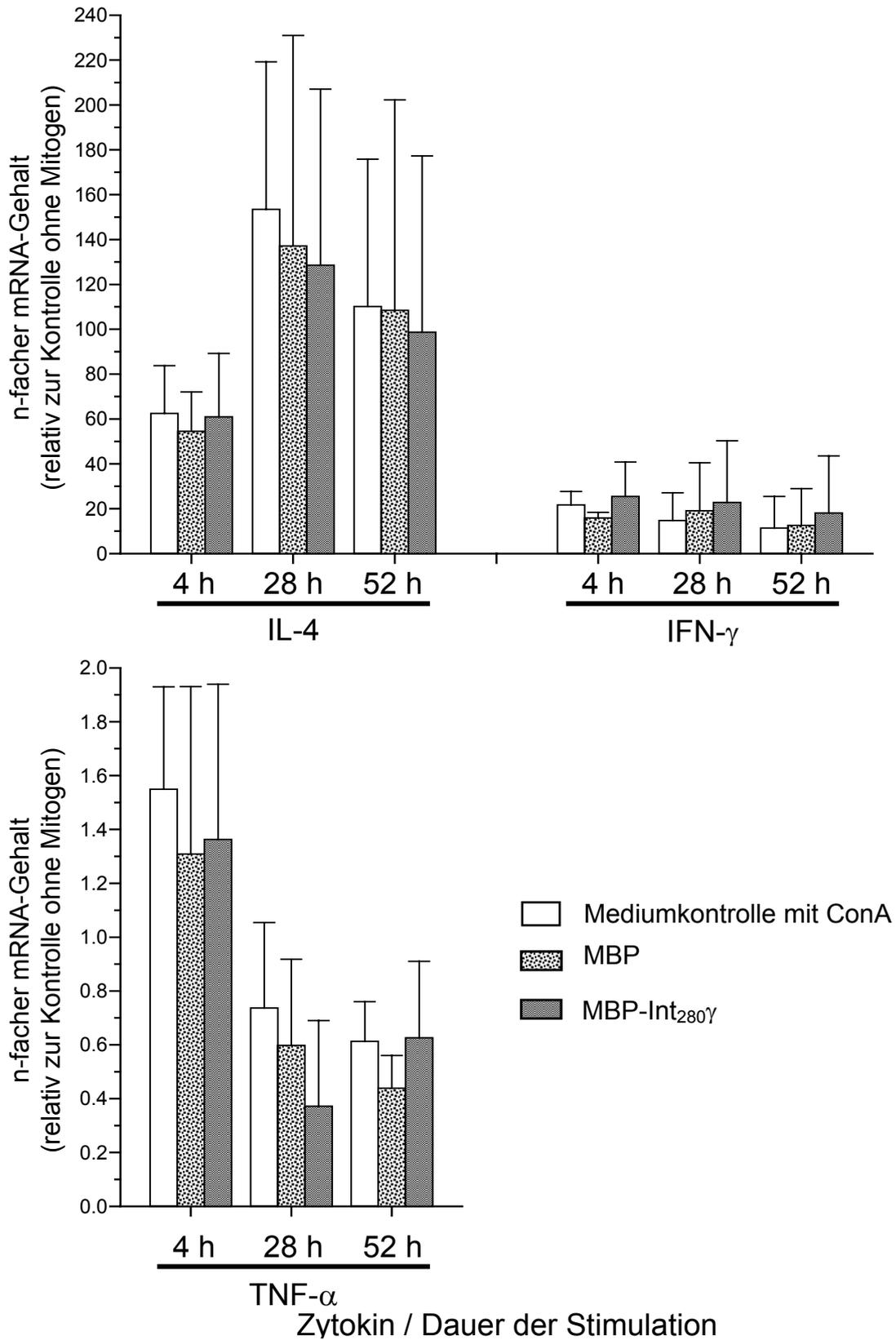
Vor der Proliferation findet eine morphologische Veränderung statt, die als Transformation (der Zellen zu Blasten) bezeichnet wird. Die Transformation sollte deshalb bei verschiedenen Inkubationsbedingungen zur Prüfung eines Effektes der Intimine auf die PBMC quantifiziert werden. Dafür wurden die Zellen über vier Tage mit den Fusionsproteinen bzw. dem MBP inkubiert. Nach der 96-stündigen Inkubation transformierten unabhängig von der Proteinkonzentration etwa 30 % der Zellen zu Blasten (Abb. 24). Es war keine intiminspezifische Wirkung auf die Blastenbildung sichtbar. Bei der Zellproliferation war weder eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration noch des Intiminsubtyps auf das Zellverhalten detektierbar.



**Abb. 24:** Verhalten der Con A stimulierten bovinen PBMC nach 96-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Proteinen im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten. Messung im FACS. Dargestellt ist die durchflußzytometrische Quantifizierung der Transformation ConA stimulierter PBMC zu Blasten nach 4-tägiger Inkubation mit den Proteinen verschiedener Konzentrationen (geometrischer Mittelwert und Streufaktoren; n= 4 Tiere). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Einfluß der Proteine ( $p > 0,05$ ).

### **3.2.6.2 Untersuchungen zum Effekt der Intimine auf die mRNS boviner PBMC**

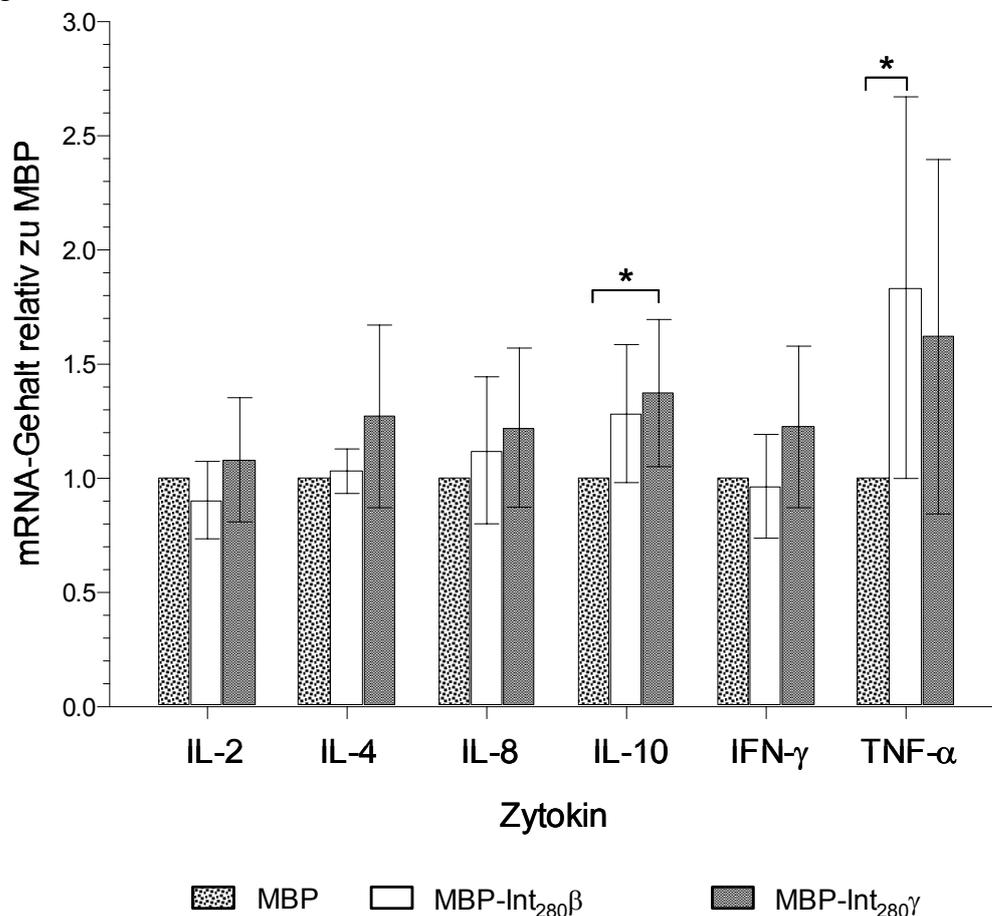
Intimine könnten auf die Zytokinexpression wirken, ohne durchflußzytometrisch nachweisbar an Zellen zu binden oder deren Proliferation zu beeinflussen. Deshalb wurde die Expression verschiedener Zytokingene auf der RNS-Ebene untersucht. In einem Screening wurde deshalb die RNS der PBMC dreier Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, umgeschrieben und mittels Realtime-PCR die Signale bestimmter Zytokingene amplifiziert. Die Inkubation boviner PBMC erfolgte unstimuliert in Medium, mit Concavalin A stimuliert in Medium, mit dem Maltose-bindenden Protein in Concavalin A-haltigem Medium und mit MBP-Int<sub>280</sub> $\gamma$  in Concavalin A-haltigem Medium. Die Inkubationsdauer betrug 4 Stunden, 28 Stunden und 52 Stunden, damit der Zeitpunkt zur Darstellung eines möglichen Effektes optimiert werden konnte (Abb. 25). Dabei stellte sich heraus, daß ein Effekt auf die Expression nur auf der Anwesenheit von Concavalin A, nicht aber auf den Fusionsproteinen beruhte. Zwischen den mit den verschiedenen Proteinen inkubierten Proben war kein statistisch signifikanter Unterschied detektierbar.



**Abb. 25:** Einfluß verschiedener Faktoren auf die Zytokingenexpression aus der RNA boviner PBMC. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse mit PBMC von 3 Tieren (relativ zur Mediumkontrolle ohne ConA=1).

Insgesamt waren die Signale bei dem Zeitpunkt "4 Stunden" in ihrer Ausprägung schwächer als zu den späteren Zeitpunkten. Um einen intiminspezifischen Effekt auf ConA-stimulierte Zellen möglichst sensitiv detektieren zu können, wurde dieser Zeitpunkt dennoch ausgewählt.

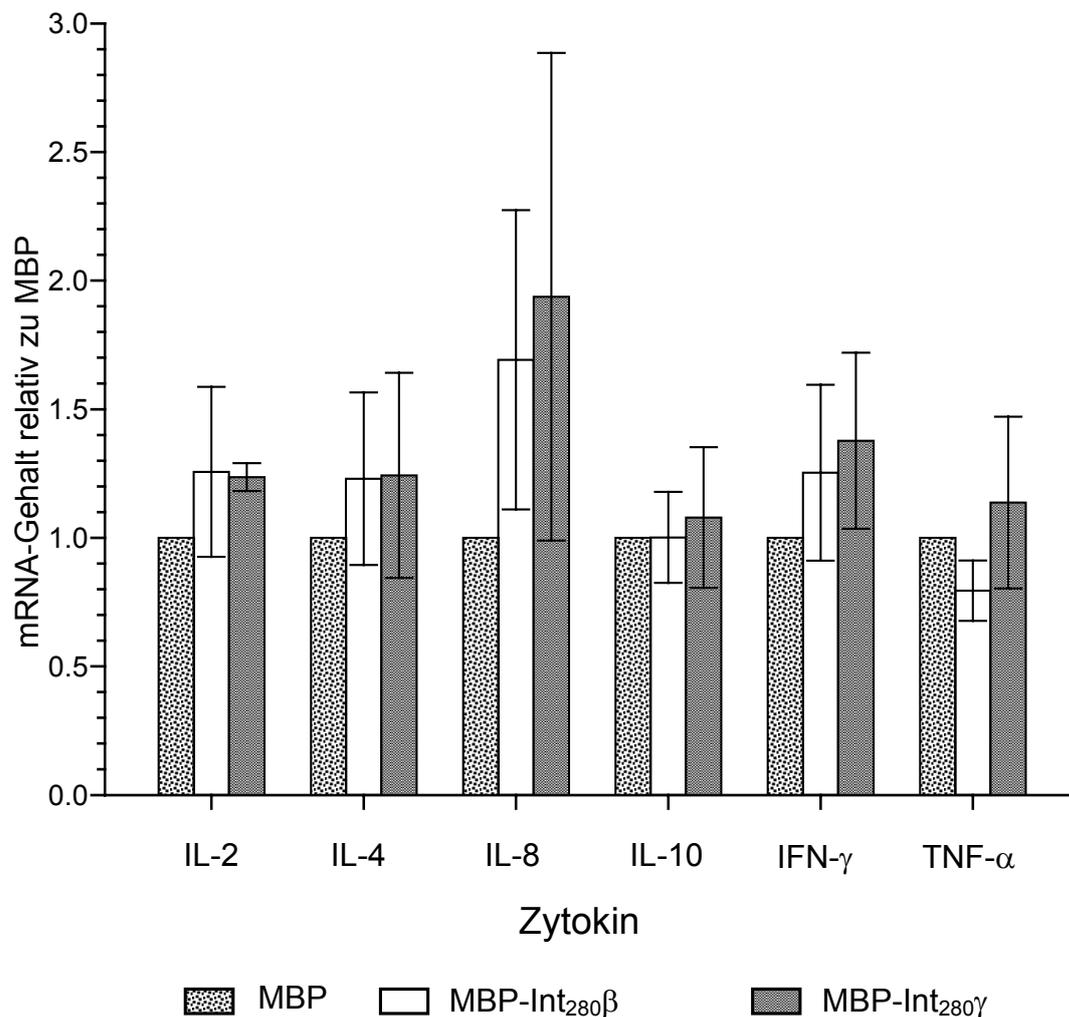
Zur Ergänzung der Untersuchungen wurden noch Primer zur Amplifikation weiterer Zytokingensequenzen eingesetzt und die Proben ebenfalls mit MBP-Int<sub>280</sub>β inkubiert. Dabei zeigte sich bei der mRNS von 6 Tieren für mit MBP-Int<sub>280</sub>β und mit MBP-Int<sub>280</sub>γ inkubierte PBMC eine leichte Induktion von IL-10 und TNF α (Abb. 26). Diese Ergebnisse waren zwar z.T. statistisch gesichert, lagen aber unterhalb des Zweifachen der MBP-Kontrolle.



**Abb. 26: Untersuchung zur Wirkung von Maltose-bindenden (Fusions-) Proteinen** auf die Zytokingenexpression boviner PBMC mittels Realtime-PCR: Ergebnisse der Zytokingenexpression der präparierten mRNS von bovinen PBMC nach Inkubation mit dem jeweiligen Protein für 4 Stunden. Die relative Menge ist im Bezug auf MBP („Kalibrator“) dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Tieren. \* =  $p \leq 0,05$  (signifikant)

### 3.2.6.3 Zytokinexpression nach vierstündiger Inkubation der mRNS boviner IEL

Analog zu den PBMC wurde auch mit bovinen IEL zur Gewinnung der mRNS und der Amplifikation der entsprechenden Transkripte vorgegangen. Die Veränderungen lagen immer jeweils unterhalb des Zweifachen der MBP-Kontrolle (Abb. 27). Die Unterschiede waren auch statistisch nicht signifikant.



**Abb. 27: Ergebnisse der Realtime-PCR der mRNA aus bovinen IEL**

nach vierstündiger Inkubation mit den Proteinen. Zytokinexpression dargestellt im Bezug auf MBP (=1) als Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Tieren.  $p > 0,05$  (keine Signifikanz)

#### 4. DISKUSSION

Der Mensch kann sich vor allem durch die orale Aufnahme von mit Rinderkot verunreinigten Nahrungsmitteln mit Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* (STEC) bzw. enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) infizieren [93] [53] [103]. Da es keine spezifische Therapie für das EHEC-bedingte HUS des Menschen gibt [123], hat die Verhinderung der Infektion größte Priorität. Dabei besitzt neben lebensmittelhygienischen Maßnahmen die Reduktion der STEC-Ausscheidung durch Rinder eine zentrale Bedeutung [93] [6] [121]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die der Fähigkeit der STEC zugrunde liegen das Rind über längere Zeit kolonisieren zu können, bislang nur unzureichend verstanden [117]. Bei experimentellen Infektionen von Kälbern wurde gezeigt, daß das auf dem *locus of enterocyte effacement (lee)* kodierte OMP Intimin bei der Kolonisierung der Schleimhaut essentiell ist [20] [19]. Das an der Ausbildung von „attaching and effacing“-Läsionen beteiligte Intimin sowie Bestandteile des vom *lee* kodierten Typ III-Sekretionsapparates tragen, möglicherweise durch die Induktion der sehr engen Adhäsion der *E. coli*-Bakterien an Epithelzellen, zur Persistenz von A/E-verursachenden *E. coli* bei Rindern und Schafen bei [15] [25] [128]. Intimine wirken bei Mäusen während der Aktivierung von T-Zellen aber auch als Kostimulus und induzieren eine T<sub>H</sub>1-dominierte Entzündung der Darmschleimhaut [94] [50]. Damit könnte der persistente aber asymptomatische Charakter der STEC-Infektion von Rindern auch auf einem Unvermögen der Intimine bei Lymphozyten dieser Tierart als Kostimulus zu wirken. Mit Hilfe von Fusionsproteinen, die die für die Rezeptorbindung verantwortlichen, die C-terminalen 280 Aminosäuren umfassenden Fragmente der Intimine  $\beta$  und  $\gamma$  enthielten, konnte nun gezeigt werden, dass die Intimine an bovine PBMC oder iIEL nicht binden können. Das Fehlen von Intiminrezeptoren auf bovinen Lymphozyten wurde auch durch funktionelle Untersuchungen bestätigt. So beeinflussten die Intiminfragmente weder die Proliferation mitogen-stimulierter PBMC noch die Transkription der untersuchten Zytokin-Gene in PBMC und iIEL. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass bovine Lymphozyten gegenüber einer kostimulatorischen Aktivität von Intiminen anerg sind. Diese Anergie trägt möglicherweise im Zusammenwirken mit der aktiven Suppression der mukosalen Immunantwort

durch die Sekretion der Shigatoxine [84] dazu bei, dass das bovine Immunsystem nicht in der Lage ist eine langandauernde Kolonisation der Darmschleimhaut durch die STEC zu verhindern.

Das Intimin von *C. rodentium* [vorliegend als Int<sub>280</sub>] entfaltet seinen kostimulatorischen Effekt durch die Bindung an ConA-stimulierte murine T-Lymphozyten, wohingegen ein Einfluß des Int<sub>280</sub> auf Zellen, die mit Medium ohne Mitogenzusatz inkubiert waren, kaum meßbar war [50]. Bei früheren Untersuchungen hatte sich die Durchflusszytometrie als Nachweisverfahren für die Bindung der B-Untereinheit des Shigatoxins 1 von *Escherichia coli* an bovine Lymphozyten bereits als geeignet erwiesen [119].

Deshalb wurde für die eigenen Untersuchungen die Methodik analog eingesetzt. Um das gesamte Spektrum boviner Immunzellen des Blutes zu erfassen, wurden zunächst Leukozyten aus dem bovinen Vollblut untersucht. Mithilfe der Durchflusszytometrie war jedoch keine Bindung der Intimine detektierbar. Auch ein Nachweis der Bindung der Intimine an bovine iIEL gelang mit diesen Methoden nicht. Die Fluoreszenzmikroskopie ist allerdings noch sensitiver als die Durchflusszytometrie. So liegt bei dem verwendeten Beckton Dickinson "FACS Calibur" der MESF (Molecules of equivalents soluble fluorophores) bei 750 [12], der des eingesetzten Fluoreszenzmikroskopes nach Angaben der Firma Leica deutlich darunter. Aber selbst bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung war keine spezifische Bindung der Intimine an Leukozyten des Rindes detektierbar. Allerdings muss man berücksichtigen, dass die Bindung der Intimine an Lymphozyten mit herkömmlichen Methoden nicht ohne weiteres nachzuweisen ist. Frankel *et al.* verwendeten Festphasen-Bindungsassays, um die Bindung der Intimine an Integrine humaner Lymphozyten zu demonstrieren [30]. Dabei mussten die Autoren zunächst die Integrine an einer Festphase immobilisieren und die Intiminfragmente biotinylieren, bevor sie eine Bindung sichtbar machen konnten. In einem alternativen Verfahren wurden von den Autoren zunächst die Intimine in Festphase gebracht und humane CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten radioaktiv markiert, um eine Bindung detektieren zu können [30]. Zum Nachweis der Intiminbindung an Lymphozyten aus verschiedenen Organen der Maus (Milz, Peyersche Plaques, Mesenteriallymphknoten) wurde sogar die Verwendung

fluoreszierender Latexkügelchen mit 1 µm Durchmesser erforderlich, deren Oberfläche mit MBP-Intimin<sub>280</sub>-Proteinen bedeckt war [38]. Es ist demnach denkbar, dass die in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht sensitiv genug waren, um das Vorkommen von Intiminbindungsstellen auf bovinen Lymphozyten sicher ausschließen zu können. So zeigten nämlich Sinclair *et al.* an Gewebeschnitten aus dem Intestinum von Ferkeln, neugeborenen Kälbern und Mäusen, daß in der Nähe der adhären EHEC 0157:H7 Tir bzw Nucleolin mikroskopisch sichtbar gemacht werden konnten. Bei den porcinen und bovinen Gewebeschnitten waren sogar größere Ansammlungen von  $\beta$ 1-Integrinen in der Nähe der Bakterien sichtbar [114].

Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Studien erbrachten keine Anhaltspunkte für eine biologisch relevante Wirkung der Intimine auf das bovine Immunsystem. Sollten jedoch tatsächlich wenige Intimin-Bindungsstellen an bovinen Leukozyten vorhanden sein, scheinen sie für den Verlauf der STEC-Infektion beim Rind keine Bedeutung zu besitzen.

Intimin wurde als Kostimulans beschrieben, das zusammen mit Con A einen synergistischen Effekt auf die Blastenproliferation muriner T-Lymphozyten hat [50]. Für vergleichbare Untersuchungen mit bovinen PBMC wurden die Zellen mit dem Farbstoff CFSE markiert, der eine sehr sensitive Quantifizierung der Zellproliferation ermöglicht [98]. In allen getesteten Intimin-Konzentrationen war jedoch das Proliferationsvermögen der Zellen auf die polyklonale Stimulation mit ConA hin unverändert. Dieser mitogen-induzierten Proliferation *in vitro* geht als morphologisches Äquivalent der Zellaktivierung die Transformation der Zellen zu Lymphoblasten voraus. Diese ist aufgrund der Größenzunahme der Zellen durchflusszytometrisch leicht darstellbar. Die Quantifizierung der Transformation der vier Tage inkubierten bovinen PBMC zu Blasten unterstrich jedoch das Ergebnis des CFSE-Tests. Unabhängig von den eingesetzten Intiminkonzentrationen waren in diesem Zeitraum jeweils etwa 30 % der Zellen zu Blasten transformiert. Die Expression oberflächlicher Marker lymphozytärer Aktivierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Ergebnisse zur Transformation deuten aber bereits daraufhin, dass Intimine bei Lymphozyten des Rindes nicht als kostimulatorische Faktoren wirken können.

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes sind einfacher zu gewinnen und gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen weniger empfindlich als IEL. Da IEL sich nach einer STEC-Infektion zuerst mit den Bakterien auseinandersetzen [7], wurden zunächst Lymphozyten aus dem peripheren Blut untersucht, um festzustellen, ob Intimine die Expression ausgewählter Zytokingene bei ConA-stimulierten Lymphozyten beeinflussen können. Für diese Versuche wurde eine Inkubationsdauer von 4h gewählt, damit ein möglicherweise nur geringer intiminspezifischer Effekt durch die zu einem späteren Zeitpunkt sein Maximum erreichende Wirkung des ConA nicht maskiert wird. Außerdem hatten frühere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe unter Einsatz derselben Methodik gezeigt, dass die Induktion des IL-4-Gens in bovinen Lymphozyten durch einen anderen Virulenzfaktor der STEC, das Shigatoxin 1, nach 4 bis 8 Stunden Einwirkungszeit sein Maximum erreicht [7]. Nach Austestung der optimalen Inkubationszeit sollte ein größeres Spektrum von Zytokingenen und eine größere Anzahl von Stichproben die Untersuchungen vervollständigen. Dabei konnte eine signifikante Steigerung der Transkription des antiinflammatorischen IL-10 für MBP-Int<sub>280</sub>γ inkubierte bovine Zellen beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit Untersuchungsergebnissen der Enterozyten von REPEC-infizierten Kaninchen, bei denen sich eine leichte Steigerung des IL-10-mRNA-Gehaltes beobachten ließ. Auch die mRNA-Expression für TNF-α war in dieser Studie erhöht [105]. Bei den eigenen Untersuchungen ergab sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der mRNA für TNF-α von bovinen PBMC, die mit MBP-Int<sub>280</sub>β und MBP-Int<sub>280</sub>γ inkubiert worden waren. Um pipettier- und systeminterne Fehler auszuschließen, muss der relative Anstieg der Transkriptmenge der zu untersuchenden Proben im Vergleich zur Kontrolle jedoch mindestens das 2,5-fache betragen ([80], persönl. Mitteilung Taubert). Da ein solcher Anstieg aber im Mittel mehrerer unabhängiger PBMC-Präparationen durch die Intimine nicht induziert werden konnte, wurden die nachgewiesenen Steigerungen als nicht spezifisch im biologischen Sinne gewertet.

Untersuchungen am Ende des Mäusekolons zeigten, daß die Transkription der Zytokingene der T<sub>H</sub>1-Immunantwort (IL-1, TNF-α, IFN-γ) nach oraler Infektion mit *C. rodentium* signifikant erhöht war [51]. Um festzustellen, ob die Intimine eventuell auf der Ebene lokaler Immunzellen das Zytokinprofil beeinflussen

können, wurden auch ConA-stimulierte iIEL diesbezüglich untersucht. Nur bei zwei von vier untersuchten iIEL-Präparationen war eine leichte Induktion von IL-8-mRNA nachweisbar. Da aber bekannt ist, daß bei anderen Spezies eine sehr deutliche Transkriptionssteigerung für die mRNA proinflammatorischer Zytokingene nach Inokulation mit intimin-exprimierenden Pathogenen besteht [51] und das eigene Ergebnis nicht statistisch signifikant war, wurden die Daten dieser Tiere als Ausreisser betrachtet. Zudem lag die Steigerung der Transkription unterhalb des Zweieinhalbfachen der Kontrolle, so daß die Transkription von IL-8 nicht als spezifisch angesehen werden kann. Im gleichen Nachweissystem sind iIEL in der Lage, die Transkription von IL-4 nach Inkubation mit Stx1 um das 20-40fache zu steigern [91]. Dies spricht zum einen dafür, dass bovine iIEL *in vitro* noch außerordentlich reaktiv sein können und unterstützt andererseits die Interpretation der eigenen Ergebnisse, dass die Immunzellen des Rindes durch Intimin nicht signifikant stimuliert werden.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe rekombinant hergestellter Fusionsproteine durchgeführt. Diese bestanden aus den C-terminalen 280 Aminosäuren, die die Bindungsdomäne der Intimine umfassen, und dem Maltose-bindenden Protein (MBP). Die Intiminsubtypen  $\alpha$  und  $\beta$  wurden ausgewählt, da sie bereits eine immunmodulierende Wirkung bei Mäusen gezeigt hatten [50]. Desweiteren wurde der Subtyp Intimin  $\gamma$  in die Untersuchungen einbezogen. Dazu wurde das Gen für das Intimin  $\gamma$  des humanpathogenen Referenzstammes EDL933 nach der gleichen Klonierungsstrategie wie die Intimine  $\alpha$  und  $\beta$  in den Expressionsvektor kloniert. Zu Beginn der Untersuchungen wurde nämlich berichtet, dass sich der Intiminsubtyp  $\gamma$  von den anderen Intiminen durch seine Fähigkeit unterscheidet auch Tir-unabhängig an Nucleolin auf eukaryotischen Zellen zu binden [115]. Allerdings konnte diese Fähigkeit mittlerweile auch für weitere Intiminsubtypen nachgewiesen werden [116].

Das Bandenmuster der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fusionsproteine stimmte mit den bereits publizierten Befunden überein [34], jedoch wurden die Klonierungsprodukte auch genotypisch überprüft. Die Sequenzierung der doppelsträngigen Plasmid-DNS des Klons, der die Information für den

Intiminsubtyp  $\gamma$  exprimierte, ergab eine 100 %ige Übereinstimmung zum Datenbankeintrag AE005595. Bei der Sequenzierung eines PCR-Produktes aus dem Klon, der für MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$  kodierte, fielen 2 Aminosäureaustausche an Position 276 bzw. 277 auf, welche den Aminosäuren 945 bzw. 946 des Intiminmoleküls in der Gesamtlänge (948 Aminosäuren) entsprachen. An Position 945 wurde ein Serin statt eines Alanins und an Position 946 ein Valin anstatt eines Isoleucins exprimiert. Bei dem ersten Austausch wird somit eine Aminosäure mit einer Hydroxykette durch eine Aminosäure mit einer aliphatischen Seitenkette substituiert. Die Hydroxygruppen nehmen an Wasserstoffbrückenbindungen teil, während aliphatische Seitenketten nicht reaktiv entscheidend zu den hydrophoben Bindungen im Protein beitragen [70]. Damit könnte diese Mutation eher eine Veränderung in den Eigenschaften des Fusionsproteins bewirken als die Aminosäureaustausche zweier Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten. Die in der Literatur beschriebenen Aminosäuren Cys 860 und Cys 937, die die Aminosäureschleife bilden, die für die Bindung an den Tir essentiell ist [32] [3], sind jedoch bei dem verwendeten Fusionsprotein nicht von Mutationen betroffen. Da die Funktionsfähigkeit des MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$  hinsichtlich einer Bindung an HeLa-Zellen bewiesen werden konnte, wurde trotz der genotypischen Veränderungen mit dem Klonierungsprodukt weitergearbeitet.

Nach der Sequenzierung eines PCR-Produktes aus dem Klon, aus dem das Fusionsprotein MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$  gewonnen wurde, ließen sich ebenfalls zwei Aminosäureaustausche nachweisen. An Position 78 (bzw. 746) befand sich ein Isoleucin anstelle eines Serins, an Position 248 (bzw. 916) ein Valin anstelle eines Alanins. Valin und Alanin sind jeweils Aminosäuren mit aliphatischen Resten, die eine relativ ähnliche Molmasse (99 vs 71) haben. Kritischer hingegen ist der Austausch von Isoleucin gegen Serin, da Isoleucin mit seiner aliphatischen Seitenkette die hydrophoben Bindungen innerhalb des Proteins steigert [70]. Eine Bindung des Fusionsproteins mit dem Subtyp  $\alpha$  an HeLa-Zellen war nicht detektierbar. Deshalb wurde das Fusionsprotein MBP-Int<sub>280</sub> $\alpha$  nicht für funktionelle Studien mit bovinen Lymphozyten verwendet.

Bei Untersuchungen mit Intiminen werden in der Literatur häufig Fusionsproteine aus den C-terminalen 280 Aminosäuren und MBP eingesetzt [3] [30] [35] [106] [46] [81]. MBP als alleiniges Vektorprodukt wurde ebenfalls aufgereinigt und in die Untersuchungen einbezogen, um eine Kontrolle für diesen Teil der Fusionsproteine zu haben. Im Immunoblot konnte unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers sowie eines polyklonalen Antiserums der MBP-Teil detektiert werden. Die errechnete Größe der Proteine entsprach den Literaturangaben [34]. Auch die Doppelbande, die mit einer proteolytischen Anfälligkeit im Maltose-bindenden Teil des Fusionsproteins nach Auftrennung der Proteine in einem denaturierenden Gel begründet wird [34], war bei den eigenen Untersuchungen sichtbar. Ihr wurde keinerlei Einfluß auf die Bindung oder Detektion der Proteine zugeschrieben.

Zunächst wurde die Induktion, Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine gemäß Literaturangaben durchgeführt [33]. Dabei erschien die gewonnene Proteinmenge nach Entfernung des Lipopolysaccharids und Sterilfiltration sehr gering. Deshalb wurde die Proteingewinnung schrittweise optimiert. Aufgrund des Hinweises von Deibel *et al.* [22], dass die Expression sezernierter EPEC-Proteine (Esp's) extrem temperatursensitiv ist, wurde die Anzuchttemperatur herabgesetzt. So konnte die Proteinausbeute um ein Vielfaches erhöht werden.

Auch die Zusammensetzung von Lauf- und Elutionspuffer wurde variiert. Von den angegebenen 1 mM DTT wurde Abstand genommen, da DTT stark anfällig für die Hydrolyse ist [7]. Deshalb wurde es durch  $\beta$ -Mercaptoethanol ersetzt, das ein stärker denaturierendes Agens [70] und weniger hydrolyseanfällig ist. Aufgrund der Herstellerangaben zu der verwendeten Amylosesäule (Fa. NEB) betrug die eingesetzte Konzentration an  $\beta$ -Mercaptoethanol im Vergleich zu DTT jedoch das Zehnfache. Bei Bindungsstudien an HeLa-Zellen mit Intiminfusionsproteinen, die mit  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Puffern aufgereinigt worden waren, war keine Bindung detektierbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Es war nicht festzustellen, inwieweit sich die Proteine in der Natriumchloridlösung, gegen die sie vor der Endotoxinentfernung und Sterilfiltration dialysiert wurden, renaturieren. Um auszuschließen, dass eine Bindung durch Verlust der

Tertiärstruktur nicht zustande kam, wurde das  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht mehr eingesetzt.

Zum Aufschluß der zytosolisch vorliegenden Proteine setzten Frankel *et al.* Ultraschall ein [33]. Allerdings stellte sich bei der Überprüfung des Verfahrens im eigenen Labor heraus, dass hierbei eine ausreichende mechanische Zerstörung und damit ein vollständiger Aufschluß der transformierten Bakterien nicht gewährleistet war (Ergebnisse nicht gezeigt). Zum Aufschluss wurde deshalb ausschliesslich die *French Press* eingesetzt.

Durch eine verlängerte Induktionsdauer (12h vs. 6h), herabgesetzte Anzuchttemperatur (18 °C vs. 37 °C), einem anderen Aufschlussverfahren (*French Press* vs. Ultraschall) und dem Verzicht auf ein denaturierendes Agens konnte so die Proteinausbeute der verschiedenen Intiminsubtypen von 16  $\mu\text{g/ml}$  auf bis zu 280  $\mu\text{g/ml}$  gesteigert werden.

Um die Funktionalität der in den Versuchen verwendeten Intiminfusionsproteine zu überprüfen, wurde ihre Bindungsfähigkeit an Zellen der gut charakterisierten Linie „HeLa“ getestet. Diese Zellen wurden dazu in einem Ansatz mit Bakterienstämmen vorinkubiert, die den translozierten Intiminrezeptor (Tir) in Zellen injizieren. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Tir-unabhängigen Bindungsfähigkeit die Fusionsproteine auch direkt mit den HeLa-Zellen inkubiert. In beiden Fällen konnte fluoreszenzmikroskopisch ein spezifisches Signal für die Bindung der Proteine MBP-Int<sub>280</sub> $\beta$  und  $-\gamma$  detektiert werden. Der Erhalt der Fähigkeit der rekombinant erzeugten Fusionsproteine an eukaryotische Wirtszellen wie in der Literatur beschrieben zu binden [22] wurde somit als erwiesen angesehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen, dass Intimine die Immunzellen des Rindes nicht in unspezifischer Weise aktivieren. Allerdings war in den Stimulationsversuchen *in vitro* auch keine antigenspezifische Stimulation der Lymphozyten durch Intimin detektierbar. Bei der hohen Prävalenz von STEC in der Rinderpopulation [101] hätte während dieser Untersuchung mit dem Auftreten Intimin-spezifischer T-Zellen zum Zeitpunkt der Blutentnahme durchaus gerechnet werden müssen. Die Immunogenität der Intimine beim Menschen und den verschiedenen Tierspezies wird durch den Nachweis von

Antikörpern gegen Intimin im Kolostrum [21] [112] und im Blut [62] [118] auch prinzipiell belegt. Deshalb stellt sich die Frage, warum intiminspezifische Immunzellen mit den hier verwendeten Methoden nicht nachweisbar waren.

Elsaed *et al.* konnten mittels radioaktiv markiertem Thymidin Immunzellen mit einer Spezifität für Peptide mit einer Länge von nur 6 AS nachweisen [27]. Das unterstreicht die extreme Sensitivität dieser Methodik. Prinzipiell ist ein Nachweis antigenspezifischer Immunzellen jedoch auch mittels Durchflusszytometrie möglich. So postulieren Zella *et al.*, dass ein durchflusszytometrisches Nachweissystem zur Analyse der Zellvitalität den Einsatz von Radioaktivität ersetzen kann, wenn die Kulturbedingungen vor der eigentlichen Analyse modifiziert werden [139]. So supplementierten die Autoren das Zellkulturmedium mit exogenem IL-2, verzichteten aber auf starke Zellstimuli wie PHA-P oder CD3-Antikörper, so dass eine physiologischere Zellinteraktion erreicht wurde. Die Fähigkeit der kultivierten Zellen mit CD14<sup>+</sup>-Zellen, d.h. Antigen-präsentierenden Makrophagen, zu interagieren soll dann die Sensitivität der T-Zell-Aktivierung und die Proliferationskapazität der Zellen erhöhen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit publizierten Studien zur immunmodulierenden Wirkung der Intimine bei der Maus und mit Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe zur Wirkung des Shigatoxins 1 auf bovine PBMC [119] wurden die Lymphozyten mit einem Mitogen stimuliert. Die starke polyklonale Stimulation durch ConA könnte dabei die diskrete Stimulation Intimin-spezifischer Immunzellen maskiert haben.

Dies gilt umso mehr, da die Frequenz Intimin-spezifischer T-Zellen in den Kulturen vermutlich sehr niedrig war. Der Nachweis antigenspezifischer T-Zellen beim Rind erfolgte bislang meist gegen Viren [108]. Im Unterschied zu einer viralen Infektion aktivieren die extrazellulär verbleibenden STEC aber möglicherweise nur wenige T-Zellen. Das Intimin als äusseres Membranprotein wird vermutlich nur mittels MHC-II präsentiert und induziert vor allem die klonale Expansion von CD4<sup>+</sup>-Zellen, nicht aber von CD8<sup>+</sup>-Zellen. In Kulturen boviner PBMC sind jedoch meist nur wenige CD4<sup>+</sup>-Zellen vorhanden, da diese unter den *in vitro*-Bedingungen schlechter lebensfähig sind als die CD8<sup>+</sup>-Zellen [85].

Zum Nachweis Intimin-spezifischer T-Zellen müssten deshalb die Versuchsbedingungen modifiziert werden. Neben einer Anreicherung von

CD4<sup>+</sup>-Zellen und dem Verzicht einer zusätzlichen polyklonalen Stimulation sollte vor allem ein möglichst sensitives Nachweisverfahren angewendet werden. Statt die Proliferation der Zellen zu quantifizieren bietet sich dafür vor allem die Quantifizierung von Zytokinen an. So gelingt der Nachweis *M. tuberculosis*-spezifischer T-Zellen sogar im Vollblut infizierter Rinder mithilfe eines bovinen IFN- $\gamma$ -spezifischen ELISAs (Bovigam<sup>®</sup>) [136]. Durch Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Quantifizierung der Zytokin-spezifischen mRNA mittels Realtime-PCR könnte die Sensitivität des Nachweisverfahrens sogar noch weiter gesteigert werden.

Da Rinder das wichtigste STEC-Reservoir darstellen sind prophylaktische Maßnahmen zur Reduktion bzw. Elimination der STEC im Rind indiziert [103] [20]. Intimin wurde im Saugferkelmodell bereits erfolgreich als Impfstoff eingesetzt. Das Intimin wurde hierbei als gereinigtes Antigen verwendet [21]. Auch der Einsatz von Intimin zusammen mit anderen *lee*-kodierten Proteinen bei Kälbern bzw. Bullen zeigte eine Verkürzung der Ausscheidung der STEC [103]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde, dass Intimine auf bovine Lymphozyten nicht polykonal stimulierend wirken, reduzieren die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenwirkungen beim Impfling und besitzen deshalb auch Relevanz für die Impfstoffentwicklung beim Rind.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten die für die Rezeptorbindung verantwortlichen, die C-terminalen 280 Aminosäuren umfassenden Fragmente der Intimine  $\beta$  und  $\gamma$  von STEC auf ihr Bindungsvermögen an bovine Lymphozyten hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Fragmente als Fusionsproteine mit Maltose-bindendem Protein (MBP) rekombinant hergestellt und affinitätschromatographisch gereinigt. Über durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Bindungsstudien hinaus wurden funktionelle Untersuchungen mit mitogen-stimulierten Lymphozyten durchgeführt. Dazu wurde das Proliferationsverhalten während der Inkubation der Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit der Intimin-Fragmente durchflusszytometrisch untersucht. Die reverse Realtime-PCR diente zur Quantifizierung der Transkription ausgewählter Zytokine der  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Immunreaktion. Um die Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse für die mukosale Immunantwort beurteilen zu können, wurden die Untersuchungen sowohl mit peripheren (PBMC) als auch mit intraepithelialen Lymphozyten aus dem Ileum (iIEL) durchgeführt.

Vergleichsexperimente bestätigten, dass die gewonnenen Fusionsproteine in der Lage waren an HeLa-Zellen zu binden. Selbst unter Verwendung verschiedener Nachweissysteme konnte eine Bindung der Intiminfragmente an bovine PBMC oder iIEL jedoch nicht nachgewiesen werden. Das Fehlen von Intiminrezeptoren auf bovinen Lymphozyten wurde auch durch die funktionellen Untersuchungen bestätigt. So beeinflussten die Intiminfragmente weder die Proliferation mitogen-stimulierter PBMC noch die Transkription der untersuchten Zytokin-Gene.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass bovine Lymphozyten gegenüber einer kostimulatorischen Aktivität von Intiminen anerg sind. Dies stellt einen weiteren Schritt zum Verständnis der molekularen Mechanismen dar, mit denen STEC die Darmschleimhaut von Rindern persistent kolonisieren können.

## 6. SUMMARY

Ruminants -especially adult cattle- are asymptotically and persistently infected by Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) that colonize the intestine in commensal-like fashion. An important prerequisite for persistent infections may be a lack of inflammatory reactions of the host organism.

During the process of colonization, bacterial intimins cause a tight adhesion between the pathogen and the epithelial cell. In mice, intimins also act as a costimulus and induce an inflammation of the T<sub>H</sub>1 type during T-cell activation.

Thus, the persistent type of STEC induced infection in cattle may be related to the intimin's failure to act as costimulus.

Therefore, the aim of this investigation was to elucidate the binding capacity of the COOH-terminal 280 amino acids that represent the intimin-receptor-binding domain on eukaryotic cells. Recombinant engineering was performed in order to construct a fusion protein consisting of a maltose binding protein (MBP) and the 280 amino acids of the carboxy terminus of different intimin subtypes. FPLC served to purify the created fusion proteins. In addition to flow cytometry and fluorescence microscopy, functional assays with mitogen stimulated lymphocytes were accomplished. For this purpose, proliferation of the incubated cells in presence and absence of the intimin fragments was analyzed cytometrically. RT realtime-PCR was applied to quantify the transcription of certain cytokines of T<sub>H</sub>1- and T<sub>H</sub>2-type immune response.

To properly interpret the achieved results concerning the mucosal immune response, experiments were done with bovine mononuclear cells of the peripheral blood as well as with intraepithelial cells extracted from the ileum (iIEL). It was shown that -in contrast to cells of bovine origin- the purified fusion proteins were able to bind to HeLa cells under the same conditions.

Despite the use of different detection systems no proof of binding between the intimin fragments and bovine PBMC and IEL, respectively, could be given. Functional assays confirmed the lack of bovine lymphocyte intimin receptors as well.

Therefore, the intimin fragments influenced neither the proliferating mitogen-stimulated PBMC nor the transcription of the evaluated cytokine genes.

These results confirm the hypothesis of bovine lymphocytes being anergic to the costimulatory activity of intimins and thus presenting a further contribution to the understanding of molecular mechanisms responsible for persistent colonization of STEC on the bovine intestinal mucosa.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Acheson, D.W.K., et al., *Shiga Toxin interaction with intestinal epithelial cells*, in *Escherichia coli O157:H7 and other higa Toxin-Producing E. coli strains*, Kaper, J.B. and O'Brien, A.D., Editors. 1989, ASM. p. 140-7.
2. Adams, T.M., et al., *Intimin-mediated export of passenger proteins requires maintenance of a translocation-competent conformation*. J Bacteriol, 2005. **187**(2): p. 522-33.
3. Adu-Bobie J., T.L., Carneiro-Sampaio M., Dougan G., Frankel G., *Identification of Immunodominant regions within the C-Terminal Cell Binding Domain of Intimin alpha and Intimin beta from Enteropathogenic E. coli*. Infection and Immunity, 1998. **66**, #12: p. 5643-5649.
4. Alberts and Johnson, *Molekularbiologie der Zelle (4. Auflage)*. 4th ed. 2004, Weinheim: Jaenicke. 1801.
5. Alberts B., B.D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J., *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft. 1990. 768, 950.
6. Baljer, G. and Wieler, L.H., *[Animals as a source of infections for humans--diseases caused by EHEC]*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1999. **106**(8): p. 339-43.
7. Blessenohl, M., *Untersuchungen zur Modulation intraepithelialer Lymphozyten des Rindes durch Shigatoxin 1 von Escherichia coli*. Inaugural-Dissertation, JLU Gießen, 2003.
8. Campellone, K.G., et al., *A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic Escherichia coli Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals*. Mol Microbiol, 2002. **43**(5): p. 1227-41.
9. Cantarelli, V.V., et al., *Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic Escherichia coli, and is essential for pedestal formation*. Cell Microbiol, 2001. **3**(11): p. 745-51.
10. Cavalieri, S. and Snyder, I., *Effect of Escherichia coli Alpha-Hemolysin on Human Peripheral Leukocyte Function In Vitro*. Infection and Immunity, 1982. **37**(3): p. 966-974.
11. Celli, J., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways*. EMBO J., 2001. **20**(6): p. 1245-1258.
12. Chapman, G.V., *Instrumentation for flow cytometry*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 3-12.
13. Christopher-Hennings, J., et al., *Immunocompromise in gnotobiotic pigs induced by verotoxin-producing Escherichia coli (O111:NM)*. Infect. Immun., 1993. **61**(6): p. 2304-2308.
14. Cohen, A., et al., *Expression of glycolipid receptors to Shiga-ike toxin on human B-lymphocytes: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease*. Int. Immunol., 1990(2): p. 1-8.
15. Cornick, N.A., et al., *Intimin facilitates colonization by Escherichia coli O157:H7 in adult ruminants*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2704-7.
16. Creasey, E.A., et al., *CesT is a bivalent enteropathogenic Escherichia coli chaperone required for translocation of both Tir and Map*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 209-21.
17. De Vinney, R., *Tyrosine phosphorylation of eukaryotic proteins and translocated intimin receptor by enteropathogenic Escherichia coli*. Methods Enzymol, 2002. **358**: p. 370-81.
18. Dean, P., et al., *Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic Escherichia coli-injected effector proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1876-81.
19. Dean-Nystrom, E.A., et al., *Pathogenicity of Escherichia coli O157:H7 in the intestines of neonatal calves*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1842-8.

20. Dean-Nystrom, E.A., et al., *Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves. *Infect. Immun.*, 1998. **66**(9): p. 4560-4563.
21. Dean-Nystrom, E.A., et al., Vaccination of Pregnant Dams with Intimin(O157) Protects Suckling Piglets from *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *Infect Immun*, 2002. **70**(5): p. 2414-2418.
22. Deibel, C., *Zell- und molekularbiologische Untersuchungen zum "Attaching and Effacing"-Mechanismus bei Shiga Toxin-produzierenden Escherichia coli (STEC)*. 2000, Gießen.
23. DeVinney, R., et al., Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(6): p. 1445-1458.
24. Donnenberg, M.S., et al., Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol*, 1997. **5**(3): p. 109-14.
25. Dziva, F., et al., Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 11): p. 3631-45.
26. Elliott, S.J., et al., EspG, a Novel Type III System-Secreted Protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* with Similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 2001. **69**(6): p. 4027-4033.
27. Elsayed, S., et al., T cell recognition pattern of bovine milk alphaS1-casein and its peptides. *Mol Immunol*, 2004. **41**(12): p. 1225-34.
28. Finlay, B.B., et al., Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun*, 1992. **60**(6): p. 2541-3.
29. Finlay, B.B., et al., Enteropathogenic *E. coli* exploitation of host epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. **797**: p. 26-31.
30. Frankel, G., et al., The Cell-binding Domain of Intimin from Enteropathogenic *Escherichia coli* Binds to beta 1 Integrins. *J. Biol. Chem.*, 1996. **271**(34): p. 20359-20364.
31. Frankel, G., et al., Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol*, 1998. **30**(5): p. 911-21.
32. Frankel G., et al., Intimin and the host cell- is it bound to end in Tir(s)? *TRENDS in Microbiology*, May 2001. **9**, #5 May 2001: p. 214-218.
33. Frankel G., C.D., Everest P., Dougan G., Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infection and Immunity*, May 1994. **62**, #5: p. 1835-1842.
34. Frankel G., C.D., Fabiani E., Adu-Bobie J., Gil S., Novakova M., Philips A., Dougan G., Molecular Characterization of a Carboxy-Terminal Eukaryotic-Cell-Binding-Domain of Intimin from Enteropathogenic *E. coli*. *Infection and Immunity*, 1995. **63**,#11: p. 4323-4328.
35. Ghaem-Maghani, M., et al., Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, 2001. **69**(9): p. 5597-605.
36. Ginisty, H., et al., Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, 1999. **112**(6): p. 761-772.
37. Giron, J.A., et al., The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol*, 2002. **44**(2): p. 361-79.
38. Goncalves, N.S., et al., Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to lymphocytes and its functional consequences. *Infect Immun*, 2003. **71**(5): p. 2960-5.
39. Goosney, D.L., et al., Enteropathogenic *Escherichia coli* Inhibits Phagocytosis. *Infect. Immun.*, 1999b. **67**(2): p. 490-495.

40. Goosney, D.L., et al., *Enteropathogenic E. coli translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin*. *Curr Biol*, 2000a. **10**(12): p. 735-8.
41. Goosney, D.L., et al., *Gut feelings: enteropathogenic E. coli (EPEC) interactions with the host*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000b. **16**: p. 173-89.
42. Goosney, D.L., et al., *Enteropathogenic E. coli, Salmonella, and Shigella: masters of host cell cytoskeletal exploitation*. *Emerg Infect Dis*, 1999a. **5**(2): p. 216-23.
43. Gruenheid, S., et al., *Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(9): p. 856-9.
44. Hamburger Z., B.M., Isberg R., Bjorkman P., *Crystal Structure of Invasin: A Bacterial Integrin-Binding Protein*. *Science*, 1999. **286**: p. 291-295.
45. Hartland, E.L., et al., *Binding of intimin from enteropathogenic Escherichia coli to Tir and to host cells*. *Mol Microbiol*, 1999. **32**(1): p. 151-158.
46. Hartland, E.L., et al., *Expression of intimin gamma from enterohemorrhagic Escherichia coli in Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, 2000. **68**(8): p. 4637-46.
47. Hauf, N. and Chakraborty, T., *Suppression of NF- $\kappa$ B Activation and Proinflammatory Cytokine Expression by Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 2074-2082.
48. Hecht, G., *Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions: VII. Enteropathogenic Escherichia coli: physiological alterations from an extracellular position*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. **281**(1): p. G1-7.
49. Henderson, B., et al., *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis*. *Microbiol Rev*, 1996. **60**(2): p. 316-41.
50. Higgins, L.M., et al., *Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation*. *Science*, 1999a. **285**(5427): p. 588-91.
51. Higgins, L.M., et al., *Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease*. *Infect Immun*, 1999b. **67**(6): p. 3031-9.
52. Hoey, D.E.E., et al., *Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity*. *Cell Microbiol*, 2003. **5**(2): p. 85-97.
53. Hornitzky, M.A., et al., *Bovine feces from animals with gastrointestinal infections are a source of serologically diverse atypical enteropathogenic Escherichia coli and Shiga toxin-producing E. coli strains that commonly possess intimin*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(7): p. 3405-12.
54. Hueck, C.J., *Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998. **62**(2): p. 379-433.
55. Hughes, A.K., et al., *Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human proximal tubule cells*. *Kidney Int*, 1998. **54**(4): p. 1093-1106.
56. Hurley, B.P., et al., *Shiga Toxin Translocation across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration*. *Infect. Immun.*, 2001. **69**(10): p. 6148-6155.
57. Ismaili, A., et al., *Epithelial cell responses to Shiga toxin-producing Escherichia coli infection, in Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*, Kaper, J.B.a.O.B., A.D., Editor. 1998, ASM Press: Washington D.C.
58. Isogai, E., et al., *Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Gnotobiotic Mice Infected with an Escherichia coli O157:H7 Strain*. *Infect. Immun.*, 1998. **66**(1): p. 197-202.
59. Jordan, D.M., et al., *Escherichia coli O157:H7 does not require intimin to persist in pigs*. *Infect Immun*, 2005. **73**(3): p. 1865-7.

60. Jordan, D.M., et al., *Long polar fimbriae contribute to colonization by Escherichia coli O157:H7 in vivo*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 6168-71.
61. Kaper, J.B. and O'Brien, A.D., *Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains*. 1998, American Society for Microbiology: Washington D.C. p. 163-181 (Chapter 18).
62. Karpman, D., et al., *Antibodies to intimin and Escherichia coli secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic Escherichia coli infections*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(3): p. 201-11.
63. Kaye, S., et al., *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro*. Infect. Immun., 1993. **61**(9): p. 3886-3891.
64. Kenny, B., *Mechanism of action of EPEC type III effector molecules*. Int J Med Microbiol, 2002. **291**(6-7): p. 469-77.
65. Kenny, B., et al., *Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells*. Cell, 1997. **91**(4): p. 511-20.
66. Kiarash, A., et al., *Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11138-46.
67. Klapproth A., S.I., McNamara b., Lai L., Malstrom C., James S., Sonnenberg M., *A Large Toxin from Pathogenic E. coli Strains That Inhibits Lymphocyte Activation*. Infection and Immunity, 2000. **68**, #4: p. 2148-2155.
68. Klapproth, J.M., et al., *Products of enteropathogenic E. coli inhibit lymphokine production by gastrointestinal lymphocytes*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. G841-8.
69. Klapproth, J.M., et al., *Products of enteropathogenic Escherichia coli inhibit lymphocyte activation and lymphokine production*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2248-54.
70. Knippers, *Molekulare Genetik*. 8. Auflage ed. 2001: Thieme Verlag. 508.
71. Kresse, A.U., et al., *Modulation of host cell signalling by enteropathogenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 2001. **291**(4): p. 277-85.
72. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
73. Law, D., *Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E. coli*. J Appl Microbiol, 2000. **88**(5): p. 729-745.
74. Leutenegger, C.M., et al., *Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction*. Vet Immunol Immunopathol, 2000. **77**(3-4): p. 275-87.
75. Lodish H., B.D., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Darnell J., *Molekulare Zellbiologie*. Verlag de Gruyter, 1996. **2. Auflage, 1996**: p. 1059-1064.
76. Lommel, S., et al., *Enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 243-254.
77. Louise, C.B., et al., *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin*. Infect Immun, 1995. **63**(7): p. 2766-9.
78. Luo, Y., et al., *Crystal structure of enteropathogenic Escherichia coli intimin-receptor complex*. Nature, 2000. **405**(6790): p. 1073-7.
79. Mahan, J.D.a.M., C., *Mechanisms of neutrophil mediated damage to Verocytotoxin-1 (VT-1) exposed human glomerular capillary endothelial (GCEC) and umbilical vein endothelial (HUVEC) cells*. Abstr. 3rd Int.

- Symp. Workshop on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections; Baltimore, U.S.A 1997, 1997.
80. Mangold-Gehring, *Bestimmung der Interferon-gamma-Expression bei Baypamune behandelten Hunden mittels "Real Time PCR"*. 2005(Inaugural-Dissertation).
  81. Matthews, S., *NMR: keeping pace with microbiology*. Microbiology today, 1999. **26**: p. 62-63.
  82. McGraw Elizabeth A., L.J., Selander Robert K., Whittam Thomas S., *Molecular Evolution and Mosaic Structure of alpha, beta and gamma Intimins of Pathogenic Escherichia coli*. Mol.Biol.Evol., 1999. **16 (1)**(1): p. 12-22.
  83. McNally, A., et al., *Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine Escherichia coli O157*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5107-14.
  84. Menge, C., unpublished data.
  85. Menge, C., *persönliche Beobachtung*. 2005.
  86. Menge, C., et al., *Verotoxin 1 from Escherichia coli Affects Gb3/CD77+ Bovine Lymphocytes Independent of Interleukin-2, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Interferon- $\alpha$* . Experimental Biology and Medicine, 2003. **228**(4): p. 377-386.
  87. Menge, C., et al., *Phenotypic and functional characterization of intraepithelial lymphocytes in a bovine ligated intestinal loop model of enterohaemorrhagic Escherichia coli infection*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 6): p. 573-9.
  88. Menge, C., et al., *Shiga toxin 1 from Escherichia coli blocks activation and proliferation of bovine lymphocyte subpopulations in vitro*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2209-17.
  89. Molostvov, G., et al., *Interaction of cytokines and growth factor in the regulation of verotoxin-induced apoptosis in cultured human endothelial cells*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 891-7.
  90. Morigi, M., et al., *Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4553-8.
  91. Moussay, E., unpublished.
  92. Moxley, R.A., *Edema disease*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2000. **16**(1): p. 175-85.
  93. Moxley, R.A., *Escherichia coli O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms*. Anim Health Res Rev, 2004. **5**(1): p. 15-33.
  94. Mundy, R., et al., *Citrobacter rodentium of mice and man*. Cell Microbiol, 2005. **7**(12): p. 1697-706.
  95. Nataro, J.P. and Kaper, J.B., *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clinical Microbiology Rev., 1998. **11**(1): p. 142-201.
  96. Nougayrede, J.P., et al., *Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to host cells*. Cell Microbiol, 2003. **5**(6): p. 359-72.
  97. Palmeira, P., et al., *Inhibition of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adherence to HEp-2 cells by bovine colostrum and milk*. Allergol Immunopathol (Madr), 2001. **29**(6): p. 229-37.
  98. Parish, C. and Warren, H., *Use of the Intracellular Fluorescent Dye CFSE to Monitor Lymphocyte Migration and Proliferation*, in *Current Protocols in Immunology*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
  99. Phillips, A.D. and Frankel, G., *Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic Escherichia coli interaction with human intestinal organ cultures*. J Infect Dis, 2000. **181**(4): p. 1496-500.
  100. Phillips, A.D., et al., *Intimin from enteropathogenic Escherichia coli mediates remodelling of the eukaryotic cell surface*. Microbiology, 2000. **146**(6): p. 1333-1344.

101. Pirro, F., et al., *Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from Escherichia coli in colostrum and sera of cattle*. Vet Microbiol, 1995. **43**(2-3): p. 131-41.
102. Pohlenz, J.F. and Dean-Nystrom, E.A., *Colonisation of Escherichia coli O157:H7 on squamous epithelial cells at the rectal-anal junction*. The Veterinary Record, 2004.
103. Potter, A.A., et al., *Decreased shedding of Escherichia coli O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins*. Vaccine, 2004. **22**(3-4): p. 362-9.
104. Ramachandran, V., et al., *Distribution of Intimin Subtypes among Escherichia coli Isolates from Ruminant and Human Sources*. J. Clin. Microbiol., 2003. **41**(11): p. 5022-5032.
105. Ramirez, K., et al., *Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic Escherichia coli-infected rabbits*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 103-13.
106. Reece, S., et al., *Mutagenesis of conserved tryptophan residues within the receptor-binding domain of intimin: influence on binding activity and virulence*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 3): p. 657-65.
107. Reece, S., et al., *Tyrosine residues at the immunoglobulin-C-type lectin inter-domain boundary of intimin are not involved in Tir-binding but implicated in colonisation of the host*. Microbes Infect, 2002. **4**(14): p. 1389-99.
108. Renjifo, X., et al., *Susceptibility of bovine antigen-presenting cells to infection by bovine herpesvirus 1 and in vitro presentation to T cells: two independent events*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4840-6.
109. Ridell, J., et al., *Characterization of Hafnia alvei by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR, and partial sequencing of 16S rRNA gene*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2372-6.
110. Roe, A.J., et al., *Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 1): p. 98-103.
111. Rogers, T.J., et al., *Enhanced CXC Chemokine Responses of Human Colonic Epithelial Cells to Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic Escherichia coli*. Infect. Immun., 2003. **71**(10): p. 5623-5632.
112. Sanches, M.I., et al., *Human colostrum and serum contain antibodies reactive to the intimin-binding region of the enteropathogenic Escherichia coli translocated intimin receptor*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **30**(1): p. 73-7.
113. Simon, M., et al., *Shiga toxin 1 elicits diverse biologic responses in mesangial cells*. Kidney Int, 1998. **54**(4): p. 1117-27.
114. Sinclair, J.F., et al., *The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adherence to enterocytes in vivo*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1255-65.
115. Sinclair, J.F. and O'Brien, A.D., *Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2876-85.
116. Sinclair, J.F. and O'Brien, A.D., *Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33751-8. Epub 2004 Jun 1.
117. Smith, D.G., et al., *Consequences of EHEC colonisation in humans and cattle*. Int J Med Microbiol, 2002. **292**(3-4): p. 169-83.
118. Son, W.G., et al., *Immunological characterization of Escherichia coli O157:H7 intimin gamma1*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(1): p. 46-53.
119. Stamm, I., *Untersuchungen zum Mechanismus der Shigatoxin-Wirkung auf Immunzellen des Rindes*. Inaugural-Dissertation JLU Gießen. 2000.

120. Stamm, I., et al., *Bovine lymphocytes express functional receptors for Escherichia coli Shiga toxin 1*. Microb Pathog, 2002. **33**(6): p. 251-64.
121. Stevens, M.P., et al., *Options for the control of enterohaemorrhagic Escherichia coli in ruminants*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 12): p. 3767-78.
122. Tarr, C.L. and Whittam, T.S., *Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(2): p. 479-87.
123. Tarr, P.I., et al., *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1073-86.
124. Tesh, V., et al., *Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages*. Infect. Immun., 1994. **62**(11): p. 5085-5094.
125. Thorpe, C.M., et al., *Shiga Toxins Stimulate Secretion of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial Cells*. Infect. Immun., 1999. **67**(11): p. 5985-5993.
126. Tu, X., et al., *EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. **47**(3): p. 595-606.
127. Vallance, B.A., et al., *Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen Citrobacter rodentium in infected mice*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 6424-35.
128. van Diemen, P.M., et al., *Identification of enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H- genes required for intestinal colonization in calves*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1735-43.
129. van Setten, P., et al., *Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release*. Blood, 1996. **88**(1): p. 174-183.
130. Van Setten, P.A., et al., *Verocytotoxin inhibits mitogenesis and protein synthesis in purified human glomerular mesangial cells without affecting cell viability: evidence for two distinct mechanisms*. J. Am. Soc. Nephrol., 1997. **8**: p. 1877-1888.
131. Vlisidou, I., et al., *Role of intimin-tir interactions and the tir-cytoskeleton coupling protein in the colonization of calves and lambs by Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 758-64.
132. Waldvogel, A.S., et al., *Interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus*. Vet Immunol Immunopathol, 2000. **77**(3-4): p. 201-12.
133. Wales, A.D., et al., *Attaching-effacing Lesions Associated with Escherichia coli O157:H7 and Other Bacteria in Experimentally Infected Conventional Neonatal Goats*. J Comp Pathol, 2005a. **132**(2-3): p. 185-94.
134. Wales, A.D., et al., *Attaching-effacing bacteria in animals*. J Comp Pathol, 2005b. **132**(1): p. 1-26.
135. Wiesner E., R.R., *Wörterbuch der Veterinärmedizin*. 3. Auflage ed. 1991, Jena: Gustav Fischer Verlag.
136. Wood, P.R. and Jones, S.L., *BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2001. **81**(1-2): p. 147-55.
137. Yamasaki, C., et al., *Induction of cytokines in a human colon epithelial cell line by Shiga toxin 1 (Stx1) and Stx2 but not by non-toxic mutant Stx1 which lacks N-glycosidase activity*. FEBS Lett, 1999. **442**(2-3): p. 231-4.
138. Zaharik, M.L., et al., *Delivery of dangerous goods: Type III secretion in enteric pathogens*. Int J. Med. Microbiol., 2002. **291**: p. 593-603.
139. Zella, D., et al., *A novel sensitive assay to define immune status using short-term peripheral blood derived cell culture and dual-color flow cytometry*. Immunol Lett, 1998. **62**(1): p. 45-9.

140. Zhang, W.L., et al., *Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing Escherichia coli strains*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): p. 4486-92.
141. Zhou, X., et al., *Induction of interleukin-8 in T84 cells by Vibrio cholerae*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 389-97.

## 8. ANHANG

### 8.1 Verwendete Reagenzien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
1 kb DNA Ladder	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	15615-016
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Fa. Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe	6908.2
5B8 Hybridoma-Überstand	aus eigener Gewinnung	
Acrylamid	Fa. Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe	7871.2
Agarose D-1 Low EEG	Fa. Pronadisa, Conda, Spanien	8016
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) conjugate	Fa. Molecular Probes, Göttingen	A-21206
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	A-1433
Ampicillin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	10044
Anti-Kaninchen Ig, biotinylierter speziesspezifischer ganzer Antiörper (Esel)	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	109443
Anti-Maus-Ig-Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	NXA931
Anti-MBP-Antiserum	Fa. New England Biolabs, Frankfurt	E8030S
Anti-Pan-Cytokeratin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	F-3418
BSA (bovines Serumalbumin)	New England Biolabs, Frankfurt	B9001S
BSA (bovines Serumalbumin) Fraktion V	Fa. Serva, Heidelberg	11930
Carbenicillin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	C-1389
Cellstar PP-Röhrchen	Fa. Nunc, Frickenhausen	227261
CFSE	Fa. Molecular Probes, Göttingen	C1157
Collagen R	Fa. Serva, Heidelberg	47254
Complete <sup>™</sup> EDTA-free	Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	1873580
Concavalin A	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	C-2010
DEPC-behandeltes Wasser	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	R0601
Digitonin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie	37006

DNase I	GmbH, Steinheim GE Medical Systems 27-0514/ Deutschland, Solingen	
DNase I, RNase-frei	Fa. Roche Diagnostics 776785 GmbH, Mannheim	
DNaseI FPLC reinst™	GE Medical Systems 5000U Deutschland, Solingen	
DNTP-Mischung	Fermentas GmbH, St. Leon- Rot R0181	
EcoRI EcoRI-Puffer	Cambrex Sales Office, Apen 1040A Fa. New England Biolabs, Frankfurt B90015	
EDTA	Fa. Serva Electrophoresis 11280 GmbH, Heidelberg	
Ficoll-Paque™ Plus	GE Medical Systems 17-1440-03 Deutschland, Solingen	
Fluorescein (FITC)- konjugierter Anti-Maus IgG (H+L)-Antikörper aus der Ziege	Fa. Dianova, Hamburg 115-095-062	
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon- Rot SM0241	
Gentamycin	Fa. Biochrom KG, Berlin A 271-25	
Isopropyl-1-thio-β-D- galactopyranosid	Fa. Biomol, Hamburg 05684	
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker,3	Fermentas GmbH, St. Leon- Rot SM0191	
Mark 12 Protein Standard	Fa. Novex, San Diego, CA, USA LC5677	
Markierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper aus dem Esel	Fa. Molecular Probes, A-21206 Göttingen	
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie 63689 GmbH, München	
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H <sup>-</sup> Minus, Point Mutant (mit Puffer)	Fa. Promega, Mannheim M3681	
Monoklonaler Antikörper gegen MBP, Klon 8G1	New England Biolab, 2396 Frankfurt	
Mowiol (Polyvinylalkohol) Typ 4-88	Fa. Clariant, Sulzbach	
N-Lauroyl-Sarcosin Natriumsalz	Fa. Sigma-Aldrich Chemie L-5125 GmbH, Steinheim	
Nylonwatte	Biotest AG, Dreieich 830034	
Penicillin /Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	Fa. PAA, Cölbe P11-010	
Percoll®	Fa. Sigma-Aldrich Chemie- P-1644	

Prestained SDS-PAGE Standards Low Range Primer	GmbH, Steinheim Fa. Biorad, München	161-0305
Propidiumjodid	Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim	P-4170
Ribonuclease Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	EO0311
RPMI 1640 Medium mit stabilisiertem Glutamin	Fa. Biochrom AG, Berlin	FG 1215
RPMI 1640 Medium mit stabilisiertem Glutamin	Fa. PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	P04-18500
SDS (Dodezylsulfat Natriumsalz)	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	20763
Sea Blue® Plus 2 vorgefärbter Größenstandard Sequagel XR	Fa. Invitrogen, Karlsruhe	LC5925
TBE 10 x	National Diagnostics, München	EC-842
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylendiamine)	National Diagnostics, München	EC-860
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Fa. Serva, Heidelberg	35925
Wasser für die Molekularbiologie	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe	4855
Xbal	Fa. Roth, Karlsruhe	T143.2
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indol-β-D-Galactopyranosid für die Biochemie)	Cambrex Sales Office, Apen	1093, 3000U/μl, 15U/μl
Zitronensäure	Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe	2315.1
1,4-Diazobicyclooctan (DABCO)	Fa. Sigma, Steinheim	C 8532
	Fa. Sigma, Steinheim	D 2522

**Alle weiteren Reagenzien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.**

Zelllinien

CaCo

HeLa: ECACC 85060701

## 8.2 Benötigte Geräte

Gerät	Firma	Gerätenummer
Agarosegelkammer Minikeutz	Fa. Keutz, Reiskirchen	
Biofuge primo (Rotor Ø 178 mm)	Fa. Heraeus, Hanau	
Blotkammer	Eigenbau der institutseigenen Werkstatt	
Brutschrank Typ BB 6220 (Zellkultur)	Fa. Heraeus, Hanau	513003792
Cycler	Perkin-Elmer	Gene Amp PCR-System 9600)
LiCor DNA Sequencer	Fa. MWG, Ebersberg	4000L
ELISA Reader Multiskan Ascent	Fa. Labsystems, Frankfurt	354-0057
EPICS™ Elite Analyser	Fa. Beckmann-Coulter	
Eppendorf zentrifuge R5804	Eppendorf, Hamburg	5804 715.004 5804 709.004 5804 706.005
FACS Calibur™	Becton-Dickinson, Heidelberg	
Feinwaage AE 163	Mettler-Waagen GmbH, Essen	
Fluoreszenzmikroskop DMRB	Fa. Leica, Wetzlar	
French® Pressure Cell	SLM Aminco, Rochester, NY, USA	FA-030
Geltrockner	Fa. Bio-Rad, München	Gel Dryer 543
Gummiwischer	Fa. Roth, Karlsruhe	9548.1
Heraeus Sepatech	Fa. Heraeus, Hanau	3790
Omnifuge2.ORS		
Inkubator Typ VT 5042 BK	Fa. Heraeus, Hanau	7901161
Microprocessor pH-Meter	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim	0910027
Minigel-Twin Kammer Typ G42	Fa. Biometra GmbH, Göttingen	Nr. 010-130
Netzgerät: Modell 3000/300	Fa Bio-Rad GmbH, München	Modell 3000/300
Power Supply		
Neubauer-Zählkammer	Fa. Brand GmbH+CO KG, Wertheim	
Pharmacia-FPLC-System:	GE Medical Systems Deutschland, Solingen	
Photometer	Fa. Beckmann, München	DU® 640
Schüttelinkubator	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	3032/3033
Schüttelwasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	110125900

**Benötigte Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>	<b>Gerätenummer</b>
Sorvall Zentrifuge RC 5B Plus (Rotor: GS-3, SS 34) TaqMan <sup>®</sup>	Sorvall Dupont, Bad Homburg Applied Biosystems, Darmstadt	Gene Amp 5700 Sequence Detection System
Tischzentrifuge Hettich Micro 20	Fa. Hettich, Tuttlingen	
Transilluminator 312 nm	Fa. Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen	
Ultrazentrifuge Beckmann L8 55 (Rotor: Ti 45)	Beckmann, München	
Vortex Type RFAX 1R	Fa. Heidolph, Schwabach	54113
Waage: Bosch PE 600	Bosch, Jungingen	
Wasseranlage Seralpur Pro CN 90	Fa. Seralpur, Ransbauch- Baumbach	
WILD MPS 48/52 Mikrophotosystem	Fa. Leica, Wetzlar	
Wippe für Gele Zytokammer	Eigenbau Institutswerkstatt Fa. Hettich, Tuttlingen	ø= 17,5 mm

**Verbrauchsmaterial**

<b>Firma</b>	<b>Nummer</b>
Fa. Brand GmbH+CO KG, Wertheim	747720
SCHOTT GLAS Business Segment Labware, Mainz	
Fa. Braun, Melsungen	4606027V
Fa. Servopax GmbH, Wesel	L1 0201
Fa. Nunc, Frickenhausen	140675
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	R0611
Fa. Nunc, Frickenhausen	167008
Fa. Nunc, Frickenhausen	163320
Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, V	BB018018A1
Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, V	CB00120RA1
Fa. Serva, Heidelberg	44110
Fa. Schleicher & Schuell, Dassel	10426693
EPJ-36 Tungsten 320T	

Nitrozellulose Transfer Membrane Typ Protran® BA 85	Fa. Schleicher & Schuell, Dassel	10 401190
Objektträger 76x26mm	Fa. IdL GmbH+Co. KG, Nidderau	3872872
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Fa. Nerbe, Winsen/Luhe	040221100
Pipettenspitzen blau	Ratiolab, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb	Ratiolab, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen weiß	Ratiolab, Dreieich	
Polystyrolröhrchen steril	Sarstedt, Nümbrecht	55468.001
Reaktionsgefäße 1,5ml mit Sicherheitsverschluß	Eppendorf, Hamburg	0030120.086
Reaktionsgefäße 2,0ml mit Sicherheitsverschluß	Eppendorf, Hamburg	0030120.094
UV-Küvette mikro	Fa. Brand GmbH+CO KG, Wertheim	759200
Super Frost Ultra Plus® (Objektträger)	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG Braunschweig	
Petrischalen 92x16 mm	Fa. Nerbe plus GmbH Winsen/Luhe	09.031.0000
Kleenex Kimwipes® Lite 100	Fa. Kimberley-Clark®	7102
Culture Flask 25 cm <sup>2</sup>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte-Geisecke	397768

### Vorgefertigte Reagenzien

Reagenz	Firma	Bestellnummer
A-Addition-Kit	Qiagen, Hilden	159347
Affinity Pak™ Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel	Fa. Pierce	20344
Amylosesäule	Fa. New England Biolabs, Frankfurt	E8021S
BCA-Protein-Assay®	Perbio Science, Bonn	23225
DNS Gel Extraction Kit	Fa. Montage	LSKG ELO 50
Gene Amp® XL-PCR-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt	N808-0188
pGEM-T-Vektor-Kit	Fa. Promega, Mannheim	A3600
RNeasy® Minikit	Fa. Qiagen, Hilden	74106
Qiagen Plasmid Midikit (25)	Fa. Qiagen, Hilden	12143
Nukleobond-Säule -AX 100	Fa. Machery Nagel	740521

### 8.3 Allgemeine Puffer, Medien und Lösungen

#### Medien für die Bakterienanzucht

##### **Luria-Bertani-Medium mit Glucose und Carbenicillin**

Hefeextrakt	5,0	g
Trypton	10,0	g
NaCl	10,0	g
Glucose (40 %ig)	2,5	ml
Carbenicillin (50 mg/ml)	1,0	ml
A. bid.	ad 1000	ml
Carbenicillin und Glucose nach dem Autoklavieren bei < 50 °C zugeben		

##### **Starterkultur**

LB-Medium	5,0	ml
Glucose (40 %ig)	25	µl
Carbenicillin (50 mg/ml)		
Carbenicillin und Glucose nach dem Autoklavieren bei < 50 °C zugeben		

##### **LB-Agar mit Carbenicillin (100µg/ml)**

Hefeextrakt	5,0	g
Trypton	10,0	g
NaCl	5,0	g
NaOH 1N	4,0	ml
Bactoagar	16,0	g
A. bid.	ad 1000	ml
Carbenicillin (50 mg/ml)	2,0	ml
Carbenicillin nach dem Autoklavieren bei < 50 °C zugeben		

##### **Peptonwasser (pH 7,2)**

Pepton	25,00	g
A. bidest.	ad 1000	ml

##### **Blutagarplatten**

Blutagar	50,00	g
Schafschüttelblut	50,00	ml
A. bidest.	ad 1000	ml
das Schafblut nach dem Autoklavieren bei < 50 °C zugeben		

**Zellkultur****Digitonin 0,005 % in PBS zur Permeabilisierung**

Digitonin	0,005	g
1 x PBS pH 7,4	100,00	ml

**Erythrozyten-Lyse-Reagenz**

NH <sub>4</sub> Cl	8,26	g
NaHCO <sub>3</sub>	1,09	g
Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	0,037	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**NaCl-Lösung (0,89 %)**

NaCl	8,90	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Na-Citratlösung (3,8 %)**

Na <sub>3</sub> -Zitrat x 2H <sub>2</sub> O	38,00	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Paraformaldehyd 4 % in PBS zur Fixierung**

Paraformaldehyd	4,00	g
1 x PBS	ad 100	ml

**PBMC Medium**

RPMI-Seromed 1640	900	ml
FCS	100	ml
Mercaptoethanol (3 µM)	3,00	ml
	ad 1000	ml

**PBS (pH 7,4)**

PBS-Stammlösung	100,0	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**PBS-AB-EDTA-Puffer (pH 7,4)**

NaCl	8,00	g
KCl	0,20	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,42	g
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2H <sub>2</sub> O	0,75	g
Glucose (wasserfrei)	1,00	g
Penicillin/Streptomycin	100.000 U Penicillin; 100 mg Streptomycin	
Gentamycin	50	mg
PBS	ad 1000	ml

**PBS-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)**

NaCl	100,00	g
KCl	2,50	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,50	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	18,00	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**PBS-EDTA (pH 7,4)**

PBS-EDTA-Stammlösung	100,0	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**PBS-EDTA-Stammlösung (10-fach, pH 7,4)**

NaCl	80,00	g
KCl	2,00	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	14,20	g
Na-EDTA x 2H <sub>2</sub> O	20,00	g
A. bidest. ad 1000		ml

**RPMI 1640**

FCS	100	ml
Penicillin/ Streptomycin	100U/ml Pen, 100 µg/ml Strep.	
RPMI	ad 1000	ml

**Trypanblau-Lösung**

Trypanblau	0,20	g
NaCl-Lösung	1000	ml

**Mowiol-Mounting-Medium**

(zur Herstellung der mikroskopischen Präparate)

Mowiol	2,4	g
Glycerol	6,0	g
A. bid.	12,0	ml
Tris (pH 8,5), 0,2 M	24,2	g
1,4 Diazobicyclooctan	0,72	g

**Puffer für die Proteinaufreinigung****Laufpuffer (pH 7,4)**

EDTA pH 8,0	0,29	gr
Tris-HCl (500 mM, pH 6,8)	100	ml
NaCl	11,68	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Elutionspuffer (pH 7,4)**

EDTA 2,00 ml		
Tris-HCl (500 mM)	100,00	ml
NaCl	11,68	g
Maltose	18,016	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Vorbereitung von Dialyseschläuchen****Bicarbonat-Lösung (0,1 M)**

NaHCO <sub>3</sub>	8,401	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**EDTA-Lösung (1 mM)**

EDTA	0,3723	gr
A. bidest.	ad 1000	ml

**Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

Acrylamid: N,N'-Methylen-bis-acrylamid 50:1,5

Acrylamid	50,00	g
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	1,5	g
A. bidest.	ad 100,00	ml

**Ammoniumpersulfat 10%**

Ammoniumpersulfat	1,0	g
A. bidest.	10,00	ml

**Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung**

Coomassie-Brilliantblau	100	ml
Eisessig	10	ml
Methanol	40	ml
A. bidest	50	ml

---

**Coomassie-Entfärbelösung**

Essigsäure	70,00	ml
Methanol	50,00	ml
A. bid.	ad 1000	ml

**Elektrophoreselaufpuffer**

Tris (Base)	3,03	g
Glycin	14,40	g
SDS x 2H <sub>2</sub> O	1,00	g
A. bidest	ad 1000	ml

**Proteinprobenpuffer (2x) nach Lämmli**

Mercaptoethanol	6,0	ml
SDS	6,00	g
Bromphenolblau	0,013	g
Glyzerol	20,0	ml
Tris (Base)	1,50	g
A. bidest.	ad 100	ml

**Sammelgelpuffer (Tris-HCl 1 M, pH 6,8)**

Tris (Base)	121,14	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Trenngelpuffer (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8)**

Tris (Base)	181,71	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Puffer für den Elektrotransfer****Anodenpuffer I**

Tris-Lösung 1 M	300,00	ml
Methanol	200,00	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Anodenpuffer II**

Tris-Lösung 1 M	25,00	ml
Methanol	200,00	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Kathodenpuffer**

Tris-Lösung 1 M	25,00	ml
Methanol	200,00	ml
6-Aminocaprinsäure	5,25	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Puffer und Lösungen für den Immunoblot****Blockpuffer für den Immunoblot (1% BSA in PBS-Tween)**

BSA	10,00	g
PBS-Tween	ad 1000	ml

**PBS-Tween (pH 7,2)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,50	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,47	g
NaCl	8,18	g
Tween 20 <sup>®</sup>	0,5	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Substratstammlösung für den Immunoblot (3mg/ml)**

4-Chloro-1-naphthol	0,06	g
Methanol	20,00	ml

**Substratgebrauchslösung für den Immunoblot**

Substratstammlösung	2,0	ml
PBS	8,0	ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6	µl

**Puffer für die RNA-Präparation (Agarosegelelektrophorese)****TE-Puffer**

EDTA (pH 8,0), 0,1mM f.c.	0,029	g
TrisHCl (pH 8,0), 10 mM	1,21	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**0,5 mM EDTA-Lösung (pH 8,0)**

Na <sub>2</sub> -EDTA x 2H <sub>2</sub> O	18,66	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**TAE-Lösung 50-fach**

Tris-Base	242,28	g
Eisessig	57,1	ml
0,5 M EDTA-Lsg., pH 8,0	100,00	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**1 x TAE-Puffer**

TAE-Lsg 50-fach	20,00	ml
A. bidest.	ad 1.000	ml

**Agarosegel**

Agarose 1,5 % (w/v)	0,75	gr
1 x TAE-Puffer	ad 50.000	ml
Ethidiumbromid	0,5	ng/ml

**Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien****Transformationspuffer (TfB) I (pH 5,8)**

KCH <sub>3</sub> COO	2,94	g
RbCl	12,1	g
CaCl <sub>2</sub>	1,1	g
MnCl <sub>2</sub>	6,32	g
Glycerin	150	ml
A. bidest.	ad 1.000	ml

**Transformationspuffer (TfB) II**

MOPS	2,1	g
CaCl <sub>2</sub>	8,3	g
RbCl	1,2	g
Glycerin	150	ml

**LB-Medium mit Magnesiumsulfat und Kaliumchlorid (LB++)**

MgSO <sub>4</sub>	2,4	g
KCl	0,75	g
LB-Medium	ad 1000	ml

**Puffer und Lösungen für die Klonierung****LB-Plattenagar**

Agar-Agar in LB-Medium 2%(v/v)

**LB-Amp-Plattenagar**

100 µg Ampicillin/ml LB- Plattenagar;

Zugabe des Ampicillins erst bei einer Temperatur < 50 °C des autoklavierten Plattenagars

**Lösungen für Midipreps****Lösung S1 (pH 8,0)**

Tris (Base)	3,027	g
EDTA-Na <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	1,861	g
A. bidest.	ad 500	ml
RNase	100	µg/ml

**Lösung S2**

NaOH	4,0	g
A. bidest.	ad 475	ml
SDS (20 %)	25	ml

**Lösung S3 (pH 5,5)**

KCH <sub>3</sub> COO	147,2	g
A. bidest.	ad 500	ml

**Lösung N2 (pH 6,3)**

Tris (Base)	12,1	g
KCl	67,1	g
Ethanol	150	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Lösung N3 (pH 6,3)**

Tris (Base)	12,1	g
KCl	85,7	g
Ethanol	150	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Lösung N5 (pH 8,5)**

Tris (Base)	12,1	g
KCl	74,6	g
Ethanol	150	ml
A. bidest.	ad 1000	ml

**Lösungen für Minipreps****P1 = Lösung 1**

Tris pH 7,5	12,1	g
EDTA-Na <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	3,7	g
RNase	400	µg/ml

**P2 = Lösung 2**

NaOH	0,008	g
SDS	10	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**P3 = Lösung 3 (pH 5,75)**

KCH <sub>3</sub> COO (3M)	294,3	g
A. bidest.	ad 1000	ml

**Lösungen für Sequenzgele**

10 x TBE „long run“:

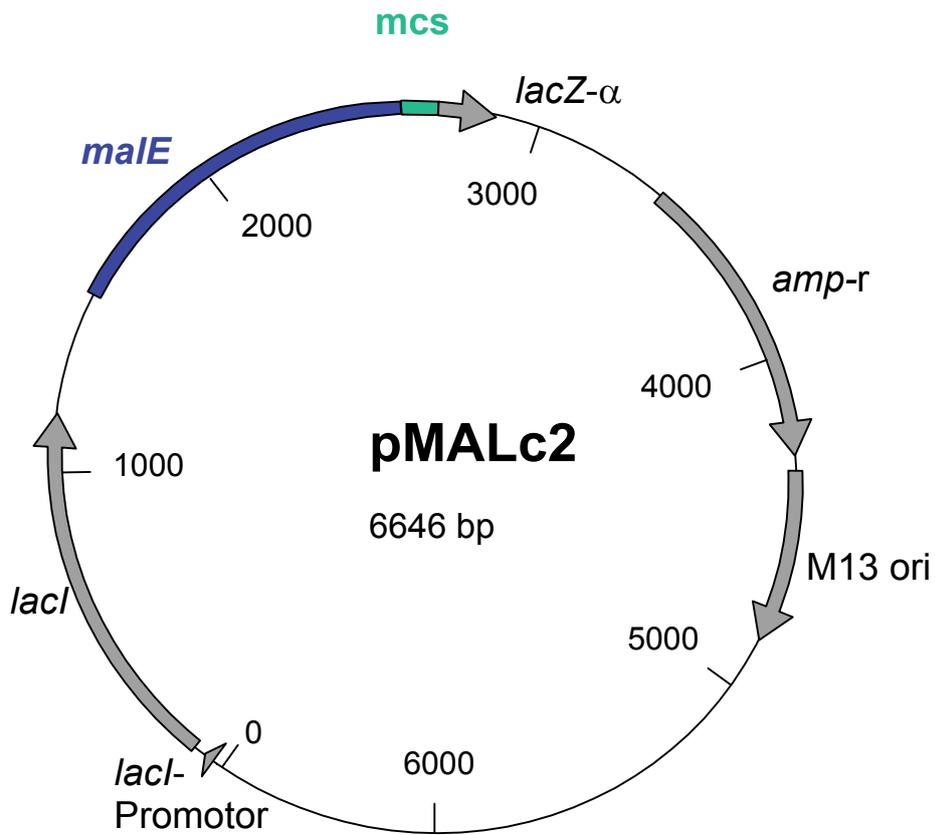
Tris (Base)	162	g
Borsäure	27,5	g
EDTA-Na <sub>2</sub>	9,3	g

**4 % Polyacrylamidlösung**

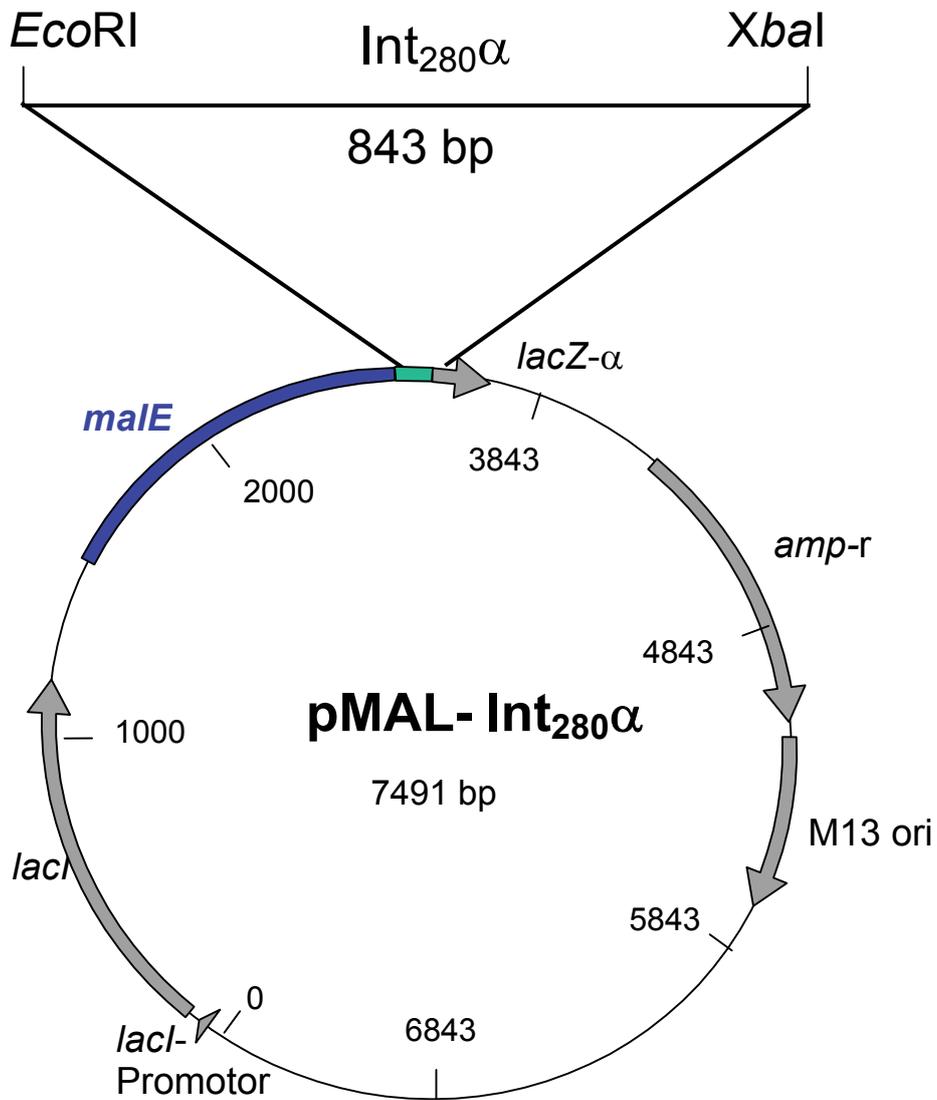
Ultra pure Sequagel XR	25,6	ml
Ultra pure Sequagel complete buffer	6,4	ml
Harnstoff	6,4	g
10xTBE	1,6	ml
A. bidest.	12	ml
TEMED	16	µl
10 %iges APS	320	µl

## Vektorkarten

Vektor pMALc2 ohne Insert zur Expression des MBP



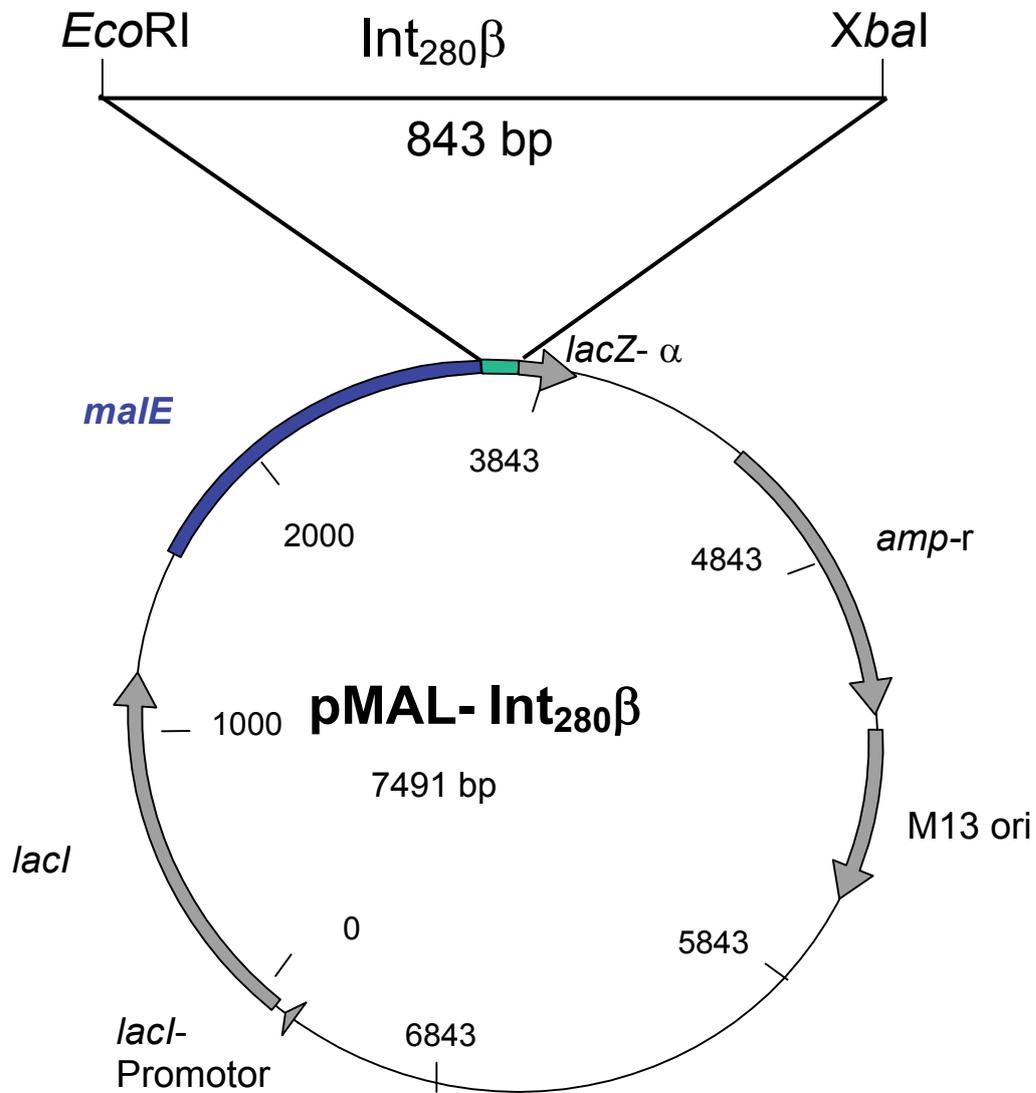
Plasmid zur Expression des Fusionsproteins MBP-Int<sub>280</sub>α



Lage der Primer:

- pMAL 1: 7414-7434 (umgreifend)
- pMAL 2: 974-994 (umgreifend)
- pMAL 3: 271-290 (im Insert)
- pMAL 4: 545-563 (im Insert)

Plasmid zur Expression des Fusionsproteins MBP-Int<sub>280β</sub>



Lage der Primer:

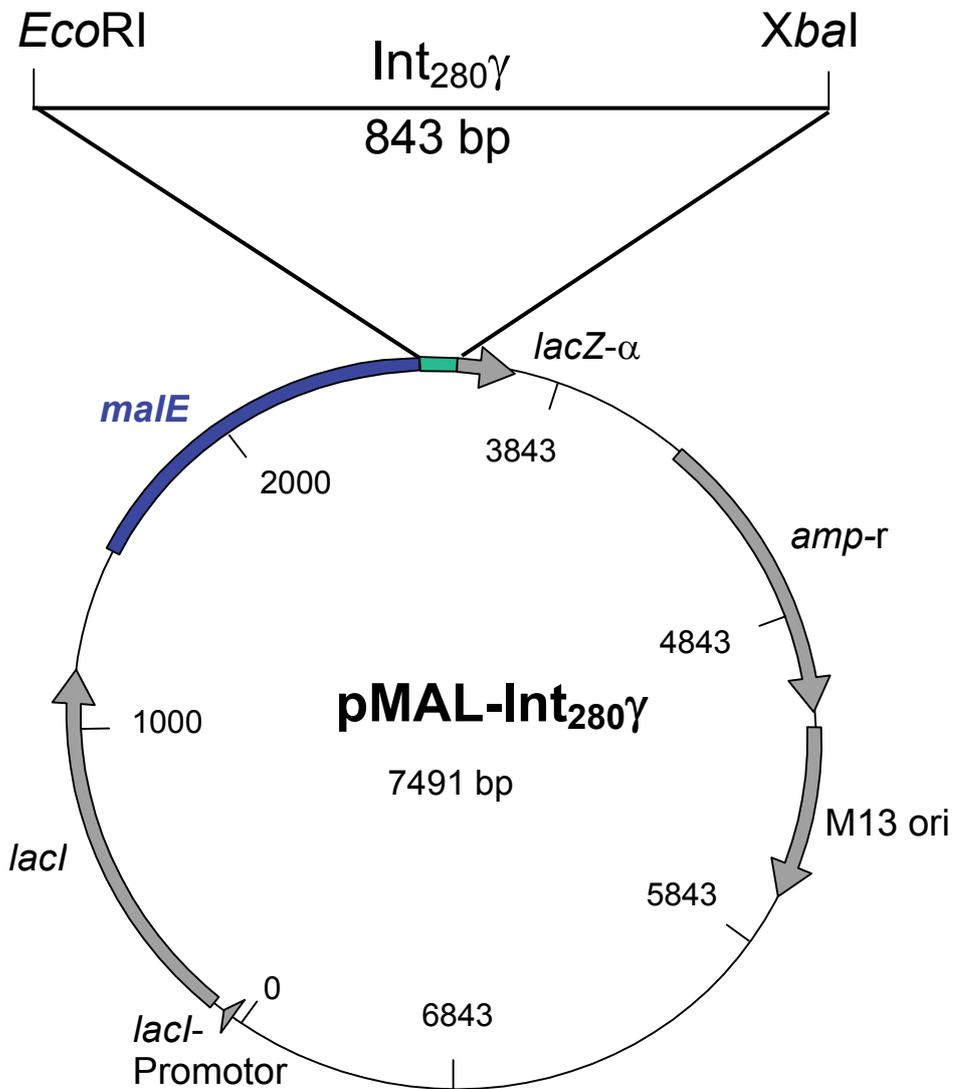
pMAL 1: 7414-7434(umgreifend)

pMAL 2: 974-994 (umgreifend)

pMAL 5: 397-416 (im Insert)

pMAL 6: 572-555 (im Insert)

Plasmid zur Expression des Fusionsproteins MBP-Int<sub>280</sub>γ



Gamma forward: 2704-2740  
Gamma reverse: 3567-3531

## 8.4 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Schematische Darstellung eines Intimin-Dimers, das an ein in die Eukaryotenzelle injiziertes Tir-Dimer bindet	14
Abb. 2	Schematische Darstellung der Struktur des <i>Yersinia</i> -Invasins mit einer porinartigen Struktur (grauer Zylinder) in der äußeren Yersinienmembran (ÄM) und den fünf Domänen (D1-D5)	16
Abb. 3	Grafische Darstellung der Aufreinigung einer Probe in der FPLC-Anlage	44
Abb. 4	Beispielhafte Darstellung der Auswertung des CFSE-basierten Proliferationstests (A: Scattergramm, B: Ein-Parameter-Histogram)	55
Abb. 5	Scattergramme von unstimulierten (A) und stimulierten (B) bovinen PBMC	56
Abb. 6	1,5 %iges Agarosegel zur Qualitätskontrolle der mRNA	59
Abb. 7	Abgleich der Sequenzen der C-terminalen 280 Aminosäuren der Intimine Subtyp $\alpha$ und $\beta$	65-66
Abb. 8	SDS-PAGE zur Illustration der Induzierbarkeit der transformierten <i>E. coli</i> durch 1,5 mM IPTG, Anzucht bei 37°C und 6h	67
Abb. 9	Immunoblot mit dem monoklonalen Anti-MBP-Antikörper zur Darstellung von MBP und den Fusionsproteinen MBP-Int <sub>280</sub> $\alpha$ bzw. - $\beta$ vor der Aufreinigung	67
Abb. 10	Auftrennung der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE zur Darstellung von MBP und MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$	69
Abb. 11	Detektion von MBP-Int <sub>280</sub> $\beta$ , MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$ und Maltosebindenden Protein mit Anti-MBP-Antiserum im Immunoblot	69

Abb. 12	SDS-PAGEs zur Überprüfung der Reinheit und Ausbeute der aufgereinigten Fusionsproteine MBP-Int <sub>280</sub> $\beta$ (A) und des Maltose-bindenden Proteins (B) nach Induktion bei 37°C, 300 $\mu$ M IPTG und 6 Stunden Inkubationsdauer	70
Abb. 13	SDS-PAGEs zur Darstellung des MBP-Int <sub>280</sub> $\alpha$ nach Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (in $\mu$ M) und unterschiedlicher Induktionsdauer (in h) bei 37°C	72
Abb. 14	Darstellung von Proben der Aufreinigungen des MBP-Int <sub>280</sub> $\alpha$ nach 12 stündiger Anzucht nach Induktion mit 0,3mM IPTG und verschiedenen Anzuchttemperaturen mittels SDS-PAGE	73
Abb. 15	Darstellung verschiedener Aufreinigungen des MBP-Int <sub>280</sub> $\alpha$ nach Induktion gemäß Literaturangaben (A) und nach Optimierung der Induktion (B)	74
Abb. 16	Auftrag von Fraktionen der FPLC-Aufreinigung des MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$ nach Anzucht bei 25°C, 0,3mM IPTG und 12 Stunden Inkubationsdauer auf der SDS-PAGE.	75
Abb. 17	Bindung von MBP-Int <sub>280</sub> $\beta$ (A).bzw. MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$ .(B) an mit den <i>E. coli</i> -Stämmen RDEC-1 (A) bzw. EDL 933 (B) und infizierte HeLa-Zellen. C: Vergleichend mit RDEC-1 vorinkubierte HeLa-Zellen	76
Abb. 18	Bindung von MBP-Int <sub>280</sub> $\beta$ (A).bzw. MBP-Int <sub>280</sub> $\gamma$ .(B) an HeLaZellen.	77
Abb. 19	Fluoreszenzmikroskopisches Bild von bovinen Leukozyten	78
Abb. 20	Bindungsverhalten der Fusionsproteine an bovine PBMC <i>ex vivo</i> unter den Inkubationsbedingungen „nativ“ oder „fixiert& permeabilisiert“	79
Abb. 21	Untersuchung zur Bindung von Fusionsproteinen an native bzw. fixierte und permeabilisierte bovine IEL <i>ex vivo</i>	80
Abb. 22	Darstellung der proliferierten Zellen	82
Abb. 23	Proliferation Con A stimulierter boviner PBMC nach 96-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Proteinen	83-84
Abb. 24	Verhalten der Con A stimulierten bovinen PBMC nach 96-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Proteinen im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten	85
Abb. 25	Einfluß verschiedener Faktoren auf die	87

Zytokingenexpression aus der RNA boviner PBMC nach 4, 28 und 52 Stunden

Abb. 26 Ergebnisse der Realtime-PCR der mRNA aus bovinen PBMC nach vierstündiger Inkubation mit den Proteinen 88

Abb. 27 Ergebnisse der Realtime-PCR der mRNA aus bovinen IEL nach vierstündiger Inkubation mit den Proteinen 89

## 8.5 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1 Bakterielle Verursacher von A/E-Läsionen 4

Tab. 2 Übersicht der bakteriellen Faktoren zur Entstehung der A/E-Läsionen 5-6

Tab. 3 Bezeichnung, Sequenzcharakteristik, Herkunft und Darmlokalisierung einiger bekannter Intiminallelen 9

Tab. 4 An der Ausbildung von A/E beteiligte Faktoren auf Wirtsseite 19-20

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. habil. G. Baljer, danke ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für seine Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge über diese Arbeit hinaus.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für das Stipendium im Graduiertenkolleg "Molekulare Veterinärmedizin".

Herrn Professor Dr. E. Petzinger und Herrn Professor Dr. R. Bauerfeind danke ich für ihren Einsatz für die Interessen des Kollegs und der Graduierten, die weit über das Selbstverständliche hinausgingen.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. Christian Menge, danke ich für die fortwährende Betreuung und Korrektur der Arbeit sowie für seine stete Hilfsbereitschaft.

Frau Gabriele Köpf danke ich für ihre Freundschaft und für ihre konstruktive Unterstützung im Labor, die die Fertigstellung dieser Dissertation wesentlich erleichtert haben.

Frau Dr. Ivonne Stamm danke ich für die Einweisung in zellbiologische Arbeitsmethoden sowie für ihre Hilfe während des gesamten praktischen Teils.

Bei allen Mitgliedern der AG PD Dr. Norbert Tautz bedanke ich mich für die Hilfe bei der Klonierung und die vielen guten Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Frau Dr. Stefanie Barth und Frau Dr. Judith Tyczka danke ich für ihre Hilfe beim molekularbiologischen Teil dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Frank Ebel danke ich für die Bereitstellung der HeLa-Zelllinie; Frau Dr. Anja Taubert für die Hilfe bei der Benutzung des Taqmans.

Herrn Dr. R. Weiß danke ich für seine fachliche und moralische Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Heike Schoepe.

Herrn Steffen Schmied danke ich für die Unterstützung bei Hard- und Software.

Den Doktoranden und den weiteren Mitarbeitern des Hauses danke ich für das kollegiale Arbeitsklima und fröhliche Stunden, die mir diesen Lebensabschnitt unvergeßlich gemacht haben.

Meiner Freundin und ehemaligen Mitbewohnerin Eva Hauf möchte ich - ebenso wie allen meinen Freunden - für Verständnis und viele Stunden des Zuhörens während der gesamten Promotionszeit danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und dafür, daß sie immer an mich geglaubt haben.

Von Herzen danke ich meinem Freund Christian für seine Geduld und seinen Beistand in allen Phasen der Erstellung dieser Arbeit.

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."